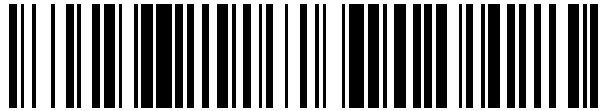


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 761**

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 06756232 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1909822**

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:
07.01.2014

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
THE 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 2 436 761 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).

Mutantes de interferón alfa 2 (IFN alfa 2) recombinante**Descripción****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a mutantes de interferón $\alpha 2$ (IFN $\alpha 2$) recombinantes, que tienen actividad agonista o antagonista específica mejorada en comparación con IFN $\alpha 2$ de tipo silvestre, y a composiciones farmacéuticas de los mismos, útiles para tratar o prevenir el cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas y trastornos asociados con una expresión aumentada de IFN $\alpha 2$.

Antecedentes de la invención

Los interferones (IFN) se descubrieron en 1957 por Isaacs y Lindenmann, y se nombraron por su capacidad de interferir con la proliferación viral. Los interferones también pueden combatir infecciones bacterianas y parasitarias, inhibir la división celular, inhibir la apoptosis espontánea, y promover o impedir la diferenciación de células. En base a su especificidad de receptor, se reconocen dos tipos de interferones: Tipo I y Tipo II. Los interferones de Tipo I son una familia de proteínas monoméricas que incluyen IFN α e IFN ω que son productos de leucocitos, IFN β que se produce por fibroblastos, e IFN τ que se ha descrito solamente en especies unguladas.

El único interferón de tipo II conocido es el IFN γ dimérico, que se produce exclusivamente por linfocitos. La familia del interferón alfa está compuesta por 13 genes completamente traducidos sin intrones (excluyendo pseudogenes). Cada miembro incluye proteínas maduras de 165 o 166 restos aminoácidos, con dos enlaces disulfuro conservados: Cys1-Cys98 y Cys29-Cys138. Se presenta un elevado nivel de homología de secuencia (80%) entre los diversos subtipos de interferón alfa, y existe aproximadamente un 35% de homología entre estos subtipos y el IFN β . A pesar de la elevada homología de los diferentes subtipos, sus actividades biológicas, entre ellas las antiproliferativas, antivirales e inmunomodulación, difieren notablemente.

La estructura de varios interferones de tipo I se ha resuelto incluyendo IFN β murino (1IFA, 1RMI), IFN β humano (1AU1), IFN $\alpha 2$ humano (1RH2, 1ITF), e IFN τ ovino (1BSL). Estructuralmente, los interferones son miembros de la familia de citoquinas de α -hélice. Todos los interferones de tipo I proporcionan señalización a través de un complejo receptor común compuesto por IFNAR1 e IFNAR2. El componente de unión a ligando principal del receptor de interferón tipo I es IFNAR2, con una afinidad de unión de ~ 10 nM para IFN $\alpha 2$. La estructura de la parte extracelular de IFNAR2 consiste en dos dominios tipo inmunoglobulina, estando localizado el sitio de unión de IFN $\alpha 2$ en el dominio N-terminal y el bucle de conexión.

IFNAR1 maduro es una proteína de 530 aminoácidos, con un segmento transmembrana compuesto por 21 restos, y un dominio citoplasmático de 100 restos. La estructura de la parte extracelular de IFNAR1 es desconocida, pero a partir de la secuencia se puede deducir que está compuesta por cuatro dominios tipo inmunoglobulina. La unión de IFN $\alpha 2$ a IFNAR1 es débil, siendo la afinidad medida en una membrana artificial de 1,5-5 μ M. IFNAR1 bovino (BoIFNAR1) e IFNAR1 humano (HuIFNAR1) son un 68% idéntico. Los subdominios 2 y 3 de HuIFNAR1 han demostrado desempeñar una tarea crítica en la unión a IFN $\alpha 2$. Intercambiando estos subdominios con BoIFNAR1 homólogo, la afinidad se aumentaba sustancialmente. El BoIFNAR1 soluble puede unirse a interferones humanos con una afinidad de 10 nM, que es 500 veces mayor que la de HuIFNAR1. Células murinas que expresan IFNAR2 se unen a IFN $\alpha 2$ con una afinidad 8 nM, mientras que células que expresan solamente IFNAR1 no muestran unión a ligando. Tras la co-expresión de IFNAR1 e IFNAR2, se observó un aumento de diez veces en la afinidad por IFN $\alpha 2$. Usando estudios *in vitro* sobre membranas artificiales se demostró que la magnitud del aumento inducido por IFNAR1 en la afinidad de unión del complejo ternario está relacionada con la concentración en superficie de este receptor. La localización del sitio de unión a IFNAR1 en el interferón se mapeó en IFN β localizado en las hélices B, C, y D y el bucle DE mientras que la mutagénesis por exploración con ala de IFN $\alpha 2$ ha sugerido que el sitio de unión a IFNAR1 está restringido a las hélices B y C.

Varios estudios han sugerido que la formación del complejo ternario sucede de un modo secuencial, comenzando con la unión al interferón de IFNAR2 para formar un complejo intermedio, y seguido por el reclutamiento de IFNAR1. El complejo IFNAR1-IFN β -IFNAR2 ha demostrado tener una estequiometría 1:1:1. El receptor IFNAR1 es un componente esencial del complejo receptor de interferón, provocando una mutación nula en IFNAR1, o la adición de Ab neutralizante contra este receptor en una ausencia completa de las respuestas antivirales y antiproliferativas para IFN α e IFN β . La asociación de IFNAR1 e IFNAR2, estimula la activación de las quinasas intracelulares asociadas de forma constitutiva Jak1 y Tyk2, que conduce a una cascada de fosforilación de tirosina que provoca la dimerización de los transductores de señales y activadores de la de la transcripción fosforilados (STAT), y el transporte al núcleo, donde se unen a secuencias de ADN específicas y estimulan la transcripción de cientos de genes sensibles.

La cuestión sigue abierta sobre cómo IFN muy similares inducen diferentes actividades en el mismo tipo celular. Se ha sugerido que las actividades biológicas de diferentes subtipos de IFN α se correlacionan con sus respectivas

afinidades de unión y el tipo celular usado.

Los interferones de tipo I de vertebrados se reconocen por un único receptor compartido, compuesto por dos proteínas transmembrana (IFNAR1 e IFNAR2), presentan su actividad a través de sus Jak quinasas asociadas con los factores de transcripción Stat como sus dianas principales (Brierley, M. M. y Fish, E. N. 2002. *J Interferon Cytokine Res.* 22, 835-845). Típicamente reconocidos por los plegamientos tipo IgG de sus dominios extracelulares (dominios hCR), IFNAR2 e IFNAR1 se consideran respectivamente proteínas de unión y factores de transducción accesorios - es decir, las cadenas alfa y beta de receptores heteroméricos. Una diferencia en las constantes de disociación de ligando de las dos cadenas es implícita a la definición. No obstante, ambas contribuyen a la creación de sitios de unión de alta afinidad. La combinación de una cadena beta "común" con diferentes cadenas de reconocimiento es una característica de receptores heteroméricos que responden de forma diferente a diferentes ligandos. La capacidad de interactuar con diferentes cadenas alfa establece conexiones de red potenciales para una expresión diferencial del receptor (Kotenko, S. V. y Langer, J. A. 2004. *Int Immunopharmacol* 4, 593-608). Cuando, como IFNAR1, tienen la capacidad de interactuar con elementos de diferentes vías de señalización, pueden establecer conexiones para una expresión génica diferencial (Platanias, L. C. y Fish, E. N. 1999. *Experimental Hematology* 27, 1583-1592).

Las IFN humanas ascienden a 12 proteínas alfas distintas no alélicas, una beta y una omega. Como se espera de una familia con marcada homología de secuencia, una estructura central 3D compartida y un receptor compartido, las actividades de los IFN de Tipo I solapan. No obstante, pueden reconocerse e incluso clasificarse por sus diferencias de aminoácidos y se han observado numerosos casos de diferencias relativas en la actividad. La imagen emergente es que diferencias funcionales aparecen solamente en contextos fisiológicos específicos. Además de su acción local para conferir protección antiviral en casi cualquier célula, están ligadas al desarrollo de las defensas antivirales de segunda línea. Se observó que una posible diferencia entre los IFN podría ser su potencial de unirse fuertemente a IFNAR1 (Roisman et al., 2005. *J Mol Biol.* 353, 271-281).

Las actividades diferenciales de los IFN de Tipo 1 ha sido objeto de intensas investigaciones durante muchos años. Particularmente, se observó que IFN β tiene un repertorio adicional de actividades sobre IFN α . Un análisis detallado de las diferencias entre estos dos IFN ha demostrado que IFN β tiene una actividad general mayor en la activación de la transcripción de genes sensibles a IFN, y es activo a niveles reducidos de IFN. Estudios de unión sugirieron que la afinidad hacia la subunidad accesoria IFNAR1 es la diferencia clave entre IFN α 2 e IFN β (Jaitin, 2006. *Mol Cell Biol.* 26, 1888-1897).

Se sabe que IFN α 2 tiene efectos anti neoplásicos. Sin embargo, este tratamiento no siempre es eficaz y a veces provoca efectos secundarios intolerables relacionados con la dosificación y duración de la terapia. El documento WO 97/12630 desvela el tratamiento de pacientes con cáncer con temozolomida en combinación con IFN α 2. El documento WO 01/54678 desvela el tratamiento de pacientes con cáncer con temozolomida e interferón pegilado.

La infección por el virus de la hepatitis C (HCV) es la infección crónica transmitida por la sangre más habitual en los Estados Unidos. Aunque han disminuido las cantidades de nuevas infecciones, la carga de infección crónica es sustancial; el Centro de Control de Enfermedades estima 3,9 millones (1,8%) de personas infectadas en los Estados Unidos. La enfermedad hepática crónica es la décima causa principal de muerte entre los adultos en los Estados Unidos, y representa aproximadamente 25.000 muertes anuales, o aproximadamente el 1% de todas las muertes. Estudios indican que el 40% de la enfermedad hepática crónica está relacionada con HCV, provocando una estimación de 8.000 - 10.000 muertes cada año. La enfermedad hepática en fase final asociada con HCV es la indicación más frecuente de trasplante hepático entre los adultos.

La terapia antiviral de hepatitis C crónica ha evolucionado rápidamente durante la última década, con mejoras significativas observadas en la eficacia del tratamiento. No obstante, incluso con terapia de combinación usando IFN α pegilado más ribavirina, del 40 al 50% de los pacientes rechaza la terapia, es decir, son no sensibles o recidivantes. Estos pacientes actualmente no tienen alternativa terapéutica eficaz. En particular, pacientes que tienen fibrosis avanzada o cirrosis en biopsia hepática están en riesgo significativo de desarrollar complicaciones de enfermedad hepática avanzada, incluyendo ascitis, ictericia, varices hemorrágicas, encefalopatía, y fallo hepático progresivo, así como un riesgo marcadamente aumentado de carcinoma hepatocelular.

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad desmielinizante autoinmune neurológica crónica. MS puede causar visión borrosa, pérdida de visión unilateral (neuritis óptica), pérdida del equilibrio, mala coordinación, dificultad para hablar, temblores, entumecimiento, fatiga extrema, cambios en la función intelectual (tales como memoria y concentración), debilidad muscular, parestesias, y ceguera. Muchos sujetos desarrollan discapacidades progresivas crónicas, pero largos periodos de estabilidad crónica pueden interrumpir periodos de deterioro. Los déficits neurológicos pueden ser permanentes o evanescentes. La patología de MS 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 causando desmielinización. En el proceso de desmielinización, la mielina se destruye y se reemplaza por cicatrices de tejido "esclerótico" endurecido que se conoce como placa. Estas lesiones aparecen en localizaciones dispersas en todo el cerebro, el nervio óptico, y la médula espinal. Los dos tipos de

interferón beta que están aprobados en los Estados Unidos para su uso en el tratamiento de MS son interferón beta 1a e interferón beta 1b.

5 La diabetes tipo I, también conocida como diabetes autoinmune o diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM), es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción selectiva de las células pancreáticas por linfocitos T autorreactivos (Bach, 1994, Endocr. Rev. 15:516-542). La patología de IDDM es muy compleja implicando una interacción entre un acontecimiento epigenético (posiblemente una infección vírica), las células de los islotes pancreáticos y el sistema inmune en un hospedador genéticamente susceptible. Varias citoquinas, incluyendo IFN- α e IFN- γ , se han implicado en la patogénesis de IDDM en seres humanos y en modelos animales de la enfermedad
10 (Campbell et al., 1991, J. Clin. Invest. 87:739-742). Parece que la expresión local de IFN- α por las células de los islotes pancreáticos en respuesta a estímulos diabotogénicos potenciales tales como virus pueden desencadenar el proceso insulítico.

15 El documento WO9304699 desvela un método para el tratamiento de diabetes mellitus insulino dependiente que comprende administrar una antagonista de IFN- α .

20 En base al nivel aumentado de expresión de IFN- α en pacientes con lupus sistémico eritematoso (SLE), IFN- α también se ha implicado en la patogénesis de SLE (Ytterberg y Schnitzer, 1982, Arthritis Rheum. 25: 401-406). El documento WO02066649 desvela anticuerpos específicos anti-IFN- α para el tratamiento de diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) y lupus sistémico eritematoso (SLE).

25 La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 20040230040 desvela variantes de cisteína de interferón- α 2. La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 20040002474 desvela homólogos de interferón- α que tienen actividad antiproliferativa en un ensayo basado en la línea celular Daudi humana.

30 La patente de Estados Unidos N° 4.588.585 desvela IFN- β -1b mutado en el que Cys17 está cambiado a Ser17 mediante una transición T a A en la primera base del codón 17, que evita la formación incorrecta del enlace disulfuro. El documento WO2005016371 desvela una composición farmacéutica que comprende una variante mejorada de IFN- β -1b humano recombinante con mayor actividad específica.

35 Los tratamientos disponibles para el cáncer, enfermedades infecciosas, esclerosis múltiple, y trastornos autoinmunes asociados con expresión aumentada de IFN α 2 son caros, eficaces solamente en un cierto porcentaje de pacientes y no son raros los efectos secundarios adversos. Sigue existiendo la necesidad médica no satisfecha de métodos terapéuticos adecuados que sean seguros, fiables, eficaces y económicos.

Sumario de la invención

La invención se refiere a las realizaciones definidas en las reivindicaciones.

40 La presente invención proporciona nuevos mutantes de IFN α 2 que tienen importante utilidad terapéutica. Las variantes de la invención tienen especificidad mejorada como agonistas o antagonistas en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre.

45 La presente invención desvela por primera vez el hallazgo de que un mutante de IFN α 2 recombinante imita las propiedades de unión de IFN β (SEC ID N° 3) y muestra características clave de actividad IFN β diferencial. Esto incluye actividad antiproliferativa aumentada *in vitro* e *in vivo*, y regulación negativa específica del receptor IFNAR2.

50 La invención se refiere a una molécula de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N° 15 y SEC ID N° 18. También se proporciona por la invención los polipéptidos correspondientes codificados por dichas moléculas de ADN.

55 De acuerdo con un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un polipéptido de interferón α 2 (IFN α 2) recombinante, fragmento activo, análogo, derivado y variante del mismo, donde dicho polipéptido comprende una mutación seleccionada entre al menos una sustitución de aminoácido dentro de los restos aminoácidos 57-89, y al menos una sustitución de aminoácido de los restos aminoácidos C-terminales 159-165, así como combinaciones de los mismos, donde dicho polipéptido tiene actividad agonista o antagonista específica mejorada, en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre (SEC ID N° 2).

60 De acuerdo con algunas realizaciones, el polipéptido comprende al menos una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en 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 las mismas, donde dicho polipéptido tiene actividad agonista o antagonista específica mejorada, en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre (SEC ID N° 2).

65 De acuerdo con una realización, la presente invención proporciona un triple mutante H57A, E58A, Q61A (SEC ID N° 5) que tiene actividad específica mejorada en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre (SEC ID N° 2).

De acuerdo con otra realización, la presente divulgación proporciona un mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A (SEC ID N° 6) que tiene actividad antagonista en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre.

5 De acuerdo con una realización adicional, la presente divulgación proporciona una proteína IFN α 2 que comprende una sustitución del extremo C termina ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 7) que tiene actividad específica mejorada en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre.

10 Las mutaciones específicas de los mutantes IFN α 2 de la invención están cada una localizada en una posición diferente en la proteína, y por lo tanto pueden combinarse para producir efectos adicionales o aumentados.

15 De acuerdo con una realización, la presente invención proporciona una variante de IFN α 2 que comprende una combinación del triple mutante H57A, E58A, Q61A y la sustitución del extremo C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 8) con actividad específica muy elevada.

20 De acuerdo con otra realización, la presente divulgación proporciona una variante de IFN α 2 que comprende una combinación del mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A y la sustitución del extremo C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 9), con una afinidad de unión aumentada por IFNAR2, pero con actividad biológica muy baja. Esta variante de IFN α 2 se ha desvelado ahora que actúa como antagonista de IFN, que bloquea la actividad natural de IFN a través de sus receptores.

De acuerdo con una realización adicional, la presente divulgación proporciona un triple mutante H57M, E58D, Q61L (SEC ID N° 10) que tiene actividad específica mejorada en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre (SEC ID N° 2).

25 De acuerdo con otra realización más, la presente divulgación proporciona un triple mutante H57Y, E58N, Q61S (SEC ID N° 11) que tiene actividad específica mejorada en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre (SEC ID N° 2).

30 De acuerdo con otra realización más, la presente divulgación proporciona una variante de IFN α 2 que comprende una combinación del triple mutante H57M, E58D, Q61L y la sustitución del extremo C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 12) que tiene actividad específica mejorada en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre (SEC ID N° 2).

35 De acuerdo con una realización adicional más, la presente divulgación proporciona una variante de IFN α 2 que comprende una combinación del triple mutante H57Y, E58N, Q61S y la sustitución del extremo C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 13) que tiene actividad específica mejorada en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre (SEC ID N° 2).

40 De acuerdo con algunas realizaciones, la presente invención proporciona mutantes de IFN α 2 pegilados con actividad específica aumentada.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ADN que codifican los polipéptidos de la invención. De acuerdo con una realización, las moléculas de ADN comprenden una secuencia seleccionada entre las SEC ID N° 15-23 SEC ID N° 30-35.

45 De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector que comprende una molécula de ADN de la invención, donde el vector es capaz de expresar un polipéptido IFN α 2 mutante en una célula hospedadora procarionota o célula hospedadora eucariota.

50 De acuerdo con otro aspecto más, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende un vector de la invención.

55 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo un polipéptido de interferón α 2 (IFN α 2) recombinante, fragmento activo, análogo, derivado y variante del mismo, donde dicho polipéptido comprende una mutación seleccionada entre al menos una sustitución de aminoácido dentro de los restos aminoacídicos 57-89, al menos una sustitución de aminoácido de los restos aminoacídicos C-terminales 159-165, así como combinaciones de los mismos, donde dicho polipéptido tiene actividad agonista o antagonista específica mejorada, en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre (SEC ID N° 2), que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 De acuerdo con algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende el polipéptido de interferón α 2 (IFN α 2) recombinante, tiene una cualquiera de las SEC ID N° 5-13 y SEC ID N° 24-29.

De acuerdo con una realización, dicha composición farmacéutica que comprende el polipéptido de interferón α 2 (IFN α 2) recombinante tiene una cualquiera de las SEC ID N° 5, 7, 8, 10, 11, 12 y 13, donde dicho polipéptido tiene

actividad agonista específica mejorada.

De acuerdo con otra realización, la composición farmacéutica que comprende el polipéptido de interferón α 2 (IFN α 2) recombinante tiene una cualquiera de las SEC ID N° 6 y 9, fragmentos, análogos, derivados y variantes del mismo, donde dicho polipéptido tiene actividad agonista específica mejorada.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno o enfermedad asociada con la modulación de IFN que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la invención, donde dicho trastorno o enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer, enfermedad autoinmune y enfermedad infecciosa. De acuerdo con una realización de la invención, dicha enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple (MS). De acuerdo con una realización preferida, dicha MS se selecciona entre el grupo que consiste en MS recidivante remitente, MS progresiva secundaria, MS progresiva primaria, y MS recidivante progresiva.

De acuerdo con algunas realizaciones, los mutantes de IFN α 2 que tienen una cualquiera de las SEC ID N° 5, 7, 8, 10, 11, 12 y 13 son útiles para tratar o prevenir la MS. De acuerdo con una realización de la invención, dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en leucemia de células capilares, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, leucemia mielogénica crónica, linfoma no Hodgkin y melanoma.

De acuerdo con otra realización, la presente divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento de células cancerosas, que comprende exponer las células cancerosas a una cantidad terapéuticamente eficaz de un mutante de IFN α 2 que tiene una cualquiera de las SEC ID N° 5, 7, 8, 10, 11, 12 y 13, fragmentos, análogos, y derivados del mismo.

De acuerdo con una realización de la invención, dicha enfermedad infecciosa es infección por virus de la hepatitis. De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, dicha hepatitis se selecciona entre el grupo que consiste en hepatitis A, hepatitis B, y hepatitis C.

De acuerdo con otra realización, los mutantes de IFN α 2 que tienen una cualquiera de las SEC ID N° 5, 7, 8, 10, 11, 12 y 13 son útiles para tratar o prevenir infección por virus de la hepatitis infecciosa.

De acuerdo con una realización adicional, se desvelan métodos de tratamiento o profilaxis de trastornos asociados con expresión aumentada de IFN α 2 incluyendo, aunque sin limitación, diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) y lupus sistémico eritematoso (SLE) que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un mutante de IFN α 2 que tiene las SEC ID N° 6 y 7, fragmentos, análogos y derivados del mismo.

De acuerdo con otro aspecto más se proporciona el uso de los mutantes de IFN α 2 desvelados para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de trastornos o enfermedades asociadas con la modulación de IFN.

Breve descripción de las figuras

Las **Figuras 1A-1C** muestran la inmovilización del dominio extracelular del receptor de Interferón tipo I (IFNAR1-EC) por captura de afinidad y unión de IFN α 2. La **Fig. 1A** muestra la curva unión para capturar IFNAR1 con mAb DB2 inmovilizado, seguido por entrecruzamiento con mAb AA3. La **Fig. 1B** muestra el análisis de afinidad estacionaria. Unión de IFN α 2 E58A (gris oscuro) y E96A (negro claro) a diferentes concentraciones entre 0,25 y 4 μ M (véanse los números en la figura), a IFNAR1 inmovilizado en la superficie. La **Fig. 1C** muestra la reacción de disociación de IFN α 2, IFN β y el triple mutante H57A, E58A, Q61A (SEC ID N° 5) de IFNAR1-EC inmovilizado en superficie seguido en tiempo real. La velocidad de disociación está directamente relacionada con la afinidad de unión, con los datos resumidos en las Tablas 1 y 3.

La **Figura 2** muestra análisis de mutantes de la unión de IFNAR1 e IFNAR2 a IFN α 2. Los interferones de tipo I están alineados con relación a IFN α 2. Los restos que están subrayados son aquellos que mutan a Ala que no cambiaban la unión a ningún receptor. Los signos "+" y "-" simbolizan si la mutación causaba un aumento o disminución de la afinidad de unión de IFN α 2 tras la mutación (véase la Tabla 1). El número por encima simboliza si el cambio se debe a la unión a IFNAR1 (1) o IFNAR2 (2). Los restos C-terminales de IFN α 8 están en negrita para marcar los cambios hechos en la SEC ID N° 7. Los restos en un recuadro son aquellos que se refieren a las SEC ID N° 5-13.

Las **Figuras 3A-3B** muestran el epítipo funcional para unión de IFNAR1 en IFN α 2. La **Fig. 3A** muestra el diagrama del cambio en la afinidad de unión de todas las proteínas mutantes analizadas por nosotros tanto en IFNAR1 como en IFNAR2. La **Fig. 3B** muestra una representación superficial de un modelo del complejo de IFN α 2 con IFNAR2 determinado previamente. Los restos que tras la mutación cambian la unión a IFNAR1 se dan en números. Los restos que tras la mutación aumentan la afinidad de unión en >2 veces están subrayados (57, 58, 61). Esta imagen se compuso con PyMol.

Las **Figuras 4A-4C** muestran la dependencia de la concentración de la respuesta antiviral y antiproliferativa de interferones en células WISH. La **Fig. 4A** muestra una serie de datos sin procesar de la respuesta antiproliferativa tras la administración de una dilución en serie de interferón a un intervalo de 250 nM - 0,48 pM de IFN α 2 y 125 nM - 0,24 pM de IFN β . Las **Figuras 4B y 4C** muestran las lecturas de densitometría para tres experimentos antiproliferativos (**4B**) y antivirales (**4C**) independientes incluyendo también el triple mutante H57A, E58A, Q61A (SEC ID N° 5). Los datos son de 6 repeticiones que se muestran, incluyendo el error típico. La curva se ajustó a una ecuación de respuesta a dosis, y representa el mejor ajuste para los datos combinados.

Las **Figuras 5A-5B** muestran las actividades biológicas de mutantes de interferón. La **Fig. 5A** muestra la actividad antiviral relativa (a wt) representada frente a la actividad antiproliferativa relativa de 21 mutantes sencillos de IFN α 2, el triple mutante H57A, E58A, Q61A (SEC ID N° 5), el cuádruple mutante N65A, L80A, Y85A, Y89A (SEC ID N° 6), (SEC ID N° 7), el triple mutante H57Y, E58N, Q61S (SEC ID N° 11) y de IFN β . La **Fig. 5B** muestra las actividades antivirales y antiproliferativas relativas de las mismas proteínas representadas frente a su afinidad de unión relativa por IFNAR1-EC. Todos los datos son de las Tablas 1-4. La línea longitudinal representa una relación teórica entre la actividad biológica y la afinidad. Los puntos por encima de la línea son para mutantes en los que el cambio en la actividad biológica (antiviral o antiproliferativa) es más débil que su cambio en la afinidad, y los puntos por debajo de la línea son lo opuesto.

Las **Figuras 6A-6C** muestran el efecto de interferón sobre la expresión génica controlada por experimento de microserie de oligonucleótido aplicado puntualmente. Se ensayaron cuatro tratamientos diferentes con interferón de 16 horas de duración: IFN α 2-wt 0,3 nM (1.000 unidades); IFN α 2-wt 3 nM (10.000 unidades); HEQ (SEC ID N° 5) 0,3 nM e IFN β 0,15 nM (1.000 unidades). Cada condición se representa por tratamiento con IFN frente a sin tratamiento en duplicados de microseries de intercambio de colorante. Además, cuatro réplicas de experimentos de microserie que consisten en sin tratamiento frente a sin tratamiento de otra muestra representan sin tratamiento con IFN como control. La **Fig. 6A** muestra los niveles de expresión relativa (respecto a sin tratamiento) de los 395 genes representados en orden ascendente de acuerdo con el factor de intercambio. La **Fig. 6B** muestra los niveles de expresión representados con relación a los niveles de expresión tras la adición de IFN β 0,15 nM. La única excepción es para el nivel de expresión del control no tratado (puntos negros), que se representa frente a una segunda serie de control para evaluar el nivel aleatorio de fluctuación. La **Fig. 6C** muestra el análisis de grupo de los genes inducidos por interferón para los cuatro tratamientos. Los perfiles de expresión génica de IFN β y HEQ (SEC ID N° 5) se agrupan juntos, con una distancia muy corta entre ellos. El perfil de expresión de células tratadas con IFN α 2-wt 3 nM se agrupa cerca, mientras que el perfil de expresión génica de IFN α 2-wt 0,3 nM está muy lejos.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona mutantes de IFN α 2 y fragmentos activos, análogos, derivados y variantes de los mismos que tienen actividad agonista o antagonista mejorada en comparación con IFN α 2 de tipo silvestre (SEC ID N° 2). Los mutantes de la invención proporcionan utilidad terapéutica mejorada que puede incluir al menos una ventaja seleccionada entre especificidad o selectividad mejorada, duración de acción, mejorada, estabilidad mejorada y menos efectos adversos.

La presente divulgación proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden mutantes de IFN α 2 útiles para tratar o prevenir el cáncer, la esclerosis múltiple, enfermedades y trastornos infecciosos asociados con expresión aumentada de IFN α 2 tales como diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) y lupus sistémico eritematoso (SLE).

Definiciones

El término interferón (IFN) o interferones (IFN) se refiere a la familia de proteínas secretadas, que son citoquinas con actividades antivirales, antiprozoarias, inmunomoduladoras, y reguladoras del crecimiento celular. Los IFN se clasificaron originalmente por sus fuentes: leucocitos IFN- α -1 (SEC ID N° 1), e IFN- α -2 (SEC ID N° 2), fibroblastos IFN- β (SEC ID N° 3), y células inmunes IFN- γ (SEC ID N° 4). Se pone especial atención en IFN alfa, beta, y gamma. El interferón alfa es el tipo principal de interferón producido por los glóbulos blancos.

Los términos "análogo", "fragmento", "derivado", y "variante", cuando hacen referencia a los polipéptidos IFN α 2 mejorados divulgados indican análogos, fragmentos, derivados y variantes de dichos polipéptidos IFN α 2 mejorados que retienen una actividad funcional sustancialmente similar o sustancialmente la misma función o actividad biológica que los polipéptidos IFN α 2 mejorados, como se describe en este documento.

Un "análogo" incluye un polipéptido IFN α 2 mejorado donde al menos un aminoácido está sustituido por otro aminoácido para producir un análogo activo de un polipéptido de la invención que tiene actividad, estabilidad

aumentada o semivida más larga en comparación con los polipéptidos enumerados en este documento.

Un "fragmento" es una parte de un polipéptido IFN α 2 mejorado que retiene una actividad funcional sustancialmente similar o sustancialmente la misma función o actividad biológica que un polipéptido IFN α 2 mejorado, como se muestra en los ensayos *in vitro* divulgados en este documento, como se describe adicionalmente a continuación.

Un "derivado" incluye todas las modificaciones de un polipéptido IFN α 2 mejorado que conserva sustancialmente las funciones divulgadas en este documento e incluye estructura adicional y función auxiliar, por ejemplo, polipéptidos PEGilados, que tienen mayor semivida.

Una "variante" incluye polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende una combinación de los polipéptidos IFN α 2 mutantes que retiene actividad funcional sustancialmente similar o una actividad funcional aumentada en comparación con los polipéptidos IFN α 2 mutantes originales.

"Actividad funcional sustancialmente similar" y "sustancialmente la misma función o actividad biológica" significan cada una que el grado de actividad biológica está dentro del 50% al 100% o más, preferiblemente dentro del 80% al 100% o más, y más preferiblemente dentro de aproximadamente el 90% al 100% o más, de esa actividad biológica demostrada por el polipéptido con el cual se está comparando cuando la actividad biológica de cada polipéptido se determina por el mismo procedimiento o ensayo.

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 aminoácido correspondiente de un segundo polipéptido si es idéntico o una sustitución conservativa de aminoácido. Las sustituciones conservativas incluyen aquellas descritas en Dayhoff, M. O., ed., *The Atlas of Protein Sequence and Structure* 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C. (1978), y en Argos, P. (1989) *EMBO J.* 8: 779-785. Por ejemplo, los aminoácidos que pertenecen a uno de los siguientes grupos representan cambios o sustituciones conservativas: 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.

"Actividad específica" como se usa en este documento con referencia a un mutante de IFN α 2 de la presente invención significa una actividad o función biológica de un IFN α 2. Las actividades o funciones biológicas de IFN α 2 son bien conocidas en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, actividad antiproliferativa. Dicha actividad específica puede detectarse y medirse usando los métodos descritos en este documento o usando cualquier método conocido en la técnica.

"Actividad específica mejorada" como se usa en este documento significa que la actividad específica o la actividad antagonista de la composición de IFN α 2 de la presente invención es mayor que la de una composición de IFN α 2 de tipo silvestre de referencia. La actividad específica de una composición de IFN α 2 de la presente invención puede ensayarse en comparación con la actividad específica de la composición de IFN α 2 de tipo silvestre de referencia, usando un método para detectar y/o medir una actividad específica de IFN α 2, por ejemplo, como se describe en este documento o como se sabe en la técnica.

"Composición de IFN α 2" se refiere a un polipéptido de IFN α 2, fragmento, análogo, derivado, o variante del mismo, o composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un polipéptido IFN α 2, fragmento, análogo, derivado, o variante del mismo.

La expresión "proteínas o polipéptidos recombinantes" se refiere a proteínas o polipéptidos producidos por técnicas de ADN recombinante, es decir, producidos a partir de células, procariontes o eucariotas, incluyendo, por ejemplo, microbianas o de mamífero, transformadas por una construcción de expresión de ADN recombinante exógena que codifica la proteína o polipéptido deseado. Las proteínas o polipéptidos expresados en la mayoría de los cultivos bacterianos típicamente estarán libres de glucano. Las proteínas o polipéptidos expresados en levadura pueden tener un patrón de glucosilación diferente al expresado en células de mamífero.

Un "vector de expresión" como se usa en este documento se refiere a una molécula de ácido nucleico con capacidad de replicación y que expresa un gen de interés cuando se introduce por transformación, transfección o transducción en una célula hospedadora. Los vectores de expresión comprenden uno o más marcadores fenotípicos de selección y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y para, si se desea, proporcionar amplificación dentro del hospedador. Los marcadores de selección incluyen, por ejemplo, secuencias que confieren marcadores de resistencia a antibióticos, que pueden usarse para obtener transformantes satisfactorios por selección, tal como secuencias de resistencia a ampicilina, tetraciclina y canamicina, o el suministro de nutrientes clínicos no disponibles del medio complejo. Los vectores de expresión adecuados pueden ser plásmidos derivados de, por ejemplo, pBR322 o diversos plásmidos pUC, que están disponibles en el mercado. Otros vectores de expresión pueden obtenerse de bacteriófagos, fagómidos, o vectores de expresión cósmidos, todos los cuales se describen en las secciones 1.12-1.20 de Sambrook et al., (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Los plásmidos aislados y los fragmentos de ADN se escinden, se adaptan, y se ligan juntos en un

orden específico para generar los vectores deseados, como se sabe bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *ibid*).

5 La expresión proteínas o polipéptidos "nativo", "de origen natural" o "de tipo silvestre" (wt) se refiere a proteínas o polipéptidos recuperados de una fuente que existe en la naturaleza. La expresión "IFN nativo" o "IFN de tipo silvestre" incluirá IFN nativo o de tipo silvestre e incluirá modificaciones post-traduccionales de IFN incluyendo, aunque sin limitación, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación, acilación, y escisión.

10 La expresión "vector o plásmido de expresión recombinante" es un vector de ADN replicable o construcción plasmídica usada para amplificar o expresar ADN que codifica las proteínas o polipéptidos de la presente invención. Un vector de expresión o plásmido contiene secuencias de control de ADN y una secuencia codificante. Las secuencias de control de ADN incluyen secuencias promotoras, sitios de unión al ribosoma, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores cadena arriba, y potenciadores. Los sistemas de expresión recombinantes definidos en este documento expresarán las proteínas o polipéptidos de la
15 invención tras la inducción de los elementos reguladores.

La expresión "células hospedadoras transformadas" se refiere a células que se han transformado y transfectado con ADN exógeno. El ADN exógeno puede estar o no integrado (es decir, unido covalentemente) al ADN cromosómico que compone el genoma de la célula hospedadora. En procariontes y levaduras, por ejemplo, el ADN exógeno puede
20 mantenerse en un elemento episómico, tal como un plásmido, o integrarse de forma estable en el ADN cromosómico. Con respecto a células eucariotas, una célula transformada estable es una en la que el ADN exógeno se ha llegado a integrar en el cromosoma. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de las líneas o clones celulares eucariotas de producir mediante replicación una población de células hijas que contienen el ADN exógeno.

25 El término "cebador" como se usa en este documento se refiere a un oligonucleótido, ya sea de origen natural como en una digestión de restricción purificada o ya sea producido de forma sintética, que es capaz de actuar como punto de inicio de síntesis cuando se coloca en condiciones en las cuales se induce la síntesis de un producto de extensión cebador, que es complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente de inducción tal como la ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser
30 monocatenario o bicatenario y debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente de inducción.

"Cantidad terapéutica eficaz" se refiere a la cantidad de un polipéptido IFN α 2 mejorado de la invención que, cuando se administra a un sujeto que lo necesita, es suficiente para efectuar el tratamiento de la afección o trastorno. Por ejemplo, para esclerosis múltiple (MS) remitente recidivante, cáncer, enfermedades o trastornos infecciosos asociados con expresión aumentada de IFN α 2 tales como diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) y lupus sistémico eritematosos (SLE).
35

El término "sujeto" se refiere a sujetos humanos y sujetos no humanos.

40 Se entiende que el término "cáncer" incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados de forma maligna, independientemente del tipo histopatológico o fase de invasión. Ejemplos de cánceres incluyen, aunque sin limitación, tumores sólidos y leucemias, incluyendo: apudoma, coristoma, branquioma, síndrome carcinoide maligno, enfermedad cardiaca carcinoide, carcinoma (por ejemplo, de Walker, de células basales, basoescamosos, de Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, pulmonar no microcítico, de células en avena, papilar, bronquiolar, broncogénico, de células escamosas, y de células transicionales), trastornos histiocíticos, leucemia (por ejemplo., de células B, de células mixtas, de células nulas, de células T, de células T crónica, asociada a HTLV-II, linfocítica aguda, linfocítica crónica, de mastocitos, y mieloides), histiocitosis maligna, enfermedad de Hodgkin, inmunoproliferativo pequeño, linfoma no Hodgkin, plasmacitoma, reticuloendoteliosis, melanoma, condroblastoma, condroma, condrosarcoma, fibroma, fibrosarcoma, tumores de células gigantes, histiocitoma, lipoma, liposarcoma, mesotelioma, mixoma, mixosarcoma, osteoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sinovioma, adenofibroma, adenolinfoma, carcinosarcoma, cordoma, craneofaringioma, disgerminoma, hamartoma, mesenquimoma, mesonefoma, miosarcoma, ameloblastoma, cementoma, odontoma, teratoma, timoma, tumor trofoblástico, adenocarcinoma, adenoma, cliolangioma, colesteatoma, cilindroma, cistadenocarcinoma, cistadenoma, tumor de células de la granulosa, ginandroblastoma, hepatoma, hidradenoma, tumor de células del islote, tumor de células Leydig, papiloma, tumor de células de Sertoli, tumor de células de la teca, leiomioma, leiomiosarcoma, mioblastoma, miosarcoma, rabdomioma, rabdomyosarcoma, ependimoma, ganglioneuroma, glioma, meduloblastoma, meningioma, neurilemoma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma, paraganglioma no cromafínico, angioqueratoma, hiperplasia angiomieloides con eosinofilia, angioma esclerosante, angiomatosis, glomangioma, hemangioendotelioma, hemangioma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, linfangioma, linfangiomioma, linfangiosarcoma, pinealoma, carcinosarcoma, condrosarcoma, cistosarcoma, tumores filoides, fibrosarcoma, hemangiosarcoma, leiomiosarcoma, leucosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, miosarcoma, mixosarcoma, carcinoma de ovario, rabdomyosarcoma, sarcoma (po ejemplo, de Ewing, experimental, de Kaposi, y de mastocitos), neurofibromatosis, y displasia cervical, y
65 otras afecciones en las cuales las células se han inmortalizado o transformado.

"Tratar la MS" como se usa en este documento cubre el tratamiento de la patología en un sujeto, estando la patología caracterizada por síntomas asociados con MS, tales como debilidad, entumecimiento, temblores, pérdida de visión, dolor, parálisis, pérdida de equilibrio, disfunción de vejiga e intestinal, y cambios cognitivos (síntomas primarios); infecciones repetidas del tracto urinario, debilidad por desuso, alineación postural y control del tronco deficientes, desequilibrio muscular, densidad ósea disminuida, respiración poco profunda o insuficiente, y llagas (síntomas secundarios); y depresión (síntomas terciarios), e incluye: (i) inhibir la afección, es decir, detener su desarrollo; o (ii) aliviar la afección, es decir, causar la regresión de la afección.

La expresión "infección por virus de la hepatitis" se refiere a infección con uno o más de los virus de la hepatitis A, B, C, D, o E, siendo la infección vírica de hepatitis transmitida por la sangre de particular interés.

Como se usa en este documento, la expresión "fibrosis hepática" usada de forma intercambiable en este documento con "fibrosis del hígado", se refiere al crecimiento de tejido cicatrizal en el hígado que puede suceder en el contexto de una infección crónica por hepatitis.

La expresión "mutantes de IFN α 2 pegilados" como se usa en este documento significa conjugados modificados por polietilenglicol de mutantes de IFN α 2. Los conjugados preferidos de polietilenglicol-mutante de IFN α 2 son conjugados reversibles que se convierten lentamente en los fármacos en condiciones fisiológicas, tal como se preparan de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO2004089280. Otros conjugados del mutante de IFN α 2 pueden prepararse acoplado un mutante de IFN α 2 con un polímero soluble en agua. Una lista no limitante de dichos polímeros incluye otros homopolímeros de óxido de polialquileno tales como polipropilenglicoles, polioles polioxi-etilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros de bloque de los mismos. Como alternativa a polímeros basados en óxido de polialquileno, pueden usarse materiales no antigénicos eficaces tales como dextrano, polivinilpirrolidonas, poli(acrilamidas), alcoholes polivinílicos, polímeros basados en carbohidrato y similares. Dichos conjugados de interferón alfa-polímero se describen en la patente de Estados Unidos N° 4.766.106 y la patente de Estados Unidos N° 4.917.888.

Como se define en este documento, una "microserie" se refiere a una pluralidad de moléculas de ácido nucleico o sondas oligonucleotídicas aisladas unidas a un soporte donde cada una de las moléculas de ácido nucleico o sondas oligonucleotídicas están unidas a un soporte en una región preseleccionada única. La expresión "ácido nucleico" es intercambiable con el término "polinucleótido". El término "polinucleótido" se refiere a una cadena de nucleótidos. Preferiblemente, la cadena tiene de aproximadamente 20 a 10.000 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 150 a 3.500 nucleótidos. El término "sonda" se refiere a una secuencia polinucleotídica capaz de hibridar con un transcrito génico o complemento del mismo para formar un complejo de sonda polinucleotídica/transcrito génico.

El término "gen" incluye una región que puede transcribirse en ARN, ya que la invención contempla la detección de ARN o equivalentes del mismo, por ejemplo, ADNc o ARNc. Un gen de la invención incluye, aunque sin limitación, genes específicos para o implicados en un proceso biológico particular y/o indicativo de un proceso biológico, tal como apoptosis, diferenciación, respuesta a estrés, envejecimiento, proliferación, etc.; genes de mecanismos celulares, por ejemplo, el ciclo celular, la transducción de señales, el metabolismo de compuestos tóxicos, y similares; genes asociados a enfermedad, por ejemplo, genes implicados en cáncer, esclerosis múltiple, infección y similares. Por ejemplo, el gen puede ser un oncogén, cuya expresión dentro de una célula induce que la célula llegue a convertirse desde una célula normal en una célula tumoral. Ejemplos adicionales de genes incluyen, aunque sin limitación, genes de citoquinas, genes de priones, genes que codifican moléculas que inducen la angiogénesis, genes que codifican moléculas de adhesión, genes que codifican receptores de superficie celular, genes que codifican proteínas que están implicadas en procesos de metástasis y/o invasivos, genes de proteasas así como de moléculas que regulan la apoptosis y el ciclo celular.

De acuerdo con la presente invención, el nivel de un transcrito génico puede determinarse midiendo el nivel del transcrito génico, por ejemplo, ARN, usando métodos semi-cuantitativos tales como hibridación en microserie o métodos más cuantitativos tales como qPCR cuantitativa.

Como se usa en este documento, la expresión "regulación de la expresión y/o actividad" generalmente se refiere a cualquier proceso que funcione controlando o modulando la cantidad o actividad (funcionalidad) de un componente celular. La regulación estática mantiene la expresión y/o actividad en algún nivel dado. La regulación positiva se refiere a un aumento relativo en la expresión y/o actividad. Por consiguiente, la regulación negativa se refiere a una disminución relativa en la expresión y/o actividad. La regulación negativa es sinónima de inhibición de la actividad de un componente celular dado.

Características de los polipéptidos IFN α 2 mejorados de la invención

Se introdujeron tres mutaciones individuales (H57A, E58A, Q61A) (SEC ID N° 5) en IFN α 2 que aumentan específicamente su afinidad de unión hacia el receptor IFNAR1 en aproximadamente 30 veces en comparación con la proteína de tipo silvestre (SEC ID N° 2). La afinidad de la proteína IFN α 2 mutante, como se usa en este

documento denominada HEQ, es similar a la medida para IFN β (Tabla 3), que está muy por encima de la de cualquier otro subtipo de interferón. La evaluación de la actividad biológica de HEQ demuestra claramente que obtenía características muy similares de IFN β (SEC ID N° 3). Por tanto, HEQ promueve solamente un aumento de 2 veces en su potencia antiviral, pero un aumento de 25 veces en su potencia antiproliferativa en relación a IFN α 2-wt (SEC ID N° 2) (Tabla 4).

Se introdujeron dos series adicionales de mutaciones en las mismas posiciones de IFN α 2 que HEQ: H57M, E58D, Q61L, en este documento denominada MDL (SEC ID N° 10), y H57Y, E58N, Q61S, en este documento denominada YNS (SEC ID N° 11). La actividad antiviral de ambas está dentro de 3 veces el tipo silvestre (Tabla 4). Sin embargo, su actividad antiproliferativa es mayor que la de HEQ de IFN β . Para MDL, la actividad es 40 veces superior en comparación con wt, y para YNS es 160 superior en células WISH y 70 veces superior en células MDA231, que es 3-7 veces la medida para IFN β (SEC ID N° 3).

El perfil de transcripción génica de HEQ (SEC ID N° 5) se controló por experimentos de microserie de oligonucleótidos. La activación del gen HEQ es mucho mayor que la de IFN α 2 en la misma concentración de proteína, similar a la activación génica registrada para IFN β (SEC ID N° 3). YNS o HEQ podrían ser fármacos potencialmente más eficaces en el tratamiento de enfermedad en comparación con IFN α 2-wt o IFN β . La ventaja de YNS o HEQ sobre IFN α 2-wt es en su mayor especificidad antiproliferativa, que podría ayudar a reducir los efectos secundarios y en el tratamiento de cáncer o esclerosis múltiple. La ventaja de YNS es su mayor efecto antiproliferativo en comparación con IFN β , particularmente medido en células de cáncer de mama humano, MDA231.

Se desvela adicionalmente un mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A (SEC ID N° 6), como se usa en este documento denominado NLYY, que tiene una actividad antiproliferativa reducida en 1000 veces y una actividad antiviral reducida en 100 veces en comparación con la proteína de tipo silvestre pero aún se une a IFNAR2 a la afinidad de tipo silvestre (Tabla 2).

La presente invención proporciona una proteína IFN α 2 que comprende una sustitución del extremo C-terminal ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 7), como se usa en este documento denominado α 8-tail. El mutante α 8-tail se diseñó para que tuviera una cola de interferón α 8 para optimizar la energía de unión electrostática entre IFN α 2 y su receptor IFNAR2. Las mediciones de unión han demostrado que el mutante α 8-tail tiene una afinidad de unión 18 veces mayor a IFNAR2 en comparación con el tipo silvestre (Tabla 2). La actividad antiviral del mutante α 8-tail es 2 veces mayor y la actividad antiproliferativa es 10 veces mayor en comparación con el tipo silvestre (Tabla 2).

Las mutaciones específicas de los tres mutantes de IFN α 2 de la invención se localizan cada una en una posición diferente en la proteína, y por lo tanto pueden combinarse para producir efectos adicionales o aumentados. La presente invención proporciona variantes que comprenden una combinación del triple mutante HEQ (SEC ID N° 5); y la sustitución del extremo C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 7). Estas variantes (SEC ID N° 8) pueden demostrar ser más eficaces en el tratamiento del cáncer específicamente, ya que su actividad antiproliferativa está aumentada. Además, su mayor potencia de unión, puede superar el problema de la regulación negativa del receptor en células cancerosas. Como HEQ está compuesto de tres mutaciones puntuales individuales en Ala, y el mutante α 8-tail comprende un reemplazo del extremo C-terminal de IFN α 2 con el extremo C-terminal de IFN α 8 nativo, la posibilidad de respuesta inmunogénica específica es pequeña.

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

Las composiciones de IFN α 2 mejoradas de la presente invención comprenden polipéptidos mutantes de IFN α 2, que tienen al menos 2 veces, preferiblemente al menos 10 veces, y más preferiblemente al menos 100 veces, incluso más preferiblemente 1000 veces, mayor actividad específica que la de una composición de IFN α 2 de tipo silvestre de referencia. En ciertas realizaciones, las composiciones de IFN α 2 de la presente invención tienen actividad antagonista para el IFN α 2 de tipo silvestre.

Los antagonistas de la invención

Un antagonista de IFN α se define como cualquier sustancia que sea capaz de interferir con una actividad biológica de IFN α *in vivo*. No es necesario que el agonista neutralice completamente la actividad IFN α , sino que solamente lo haga a un grado suficiente para ejercer una actividad terapéutica contra IDDM o SLE *in vivo*. Se sabe que IFN α posee una pluralidad de actividades biológicas. Los antagonistas para su uso en este documento reducirán, inhibirán o neutralizarán una cualquiera o más de estas actividades. Habitualmente el antagonista interferirá con al menos una (y preferiblemente todas) de la actividad antiviral, antiproliferativa o inmunomoduladora de IFN α .

Los antagonistas generalmente se seleccionan entre varias categorías: una forma soluble del receptor de interferón alfa, anticuerpos anti-receptor de interferón alfa que bloquean la unión del interferón alfa o la interacción apropiada con su receptor, anticuerpos capaces de unirse y neutralizar al propio interferón alfa, y polipéptidos no de interferón que compiten con el interferón alfa por los sitios de unión del receptor pero que en sí mismos no muestran actividad de interferón alfa sustancial. Los antagonistas de la presente invención son mutantes de IFN α que antagonizan la actividad IFN α e IFN β .

Mutagénesis de IFN α 2

Los efectos de alterar aminoácidos en posiciones específicas pueden ensayarse experimentalmente introduciendo sustituciones de aminoácidos y ensayando los polipéptidos IFN α 2 alterados para la actividad biológica usando ensayos descritos en este documento. Puede usarse cualquier técnica para mutagénesis conocida en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, mutagénesis química, mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* usando, por ejemplo, el kit de mutagénesis dirigido al sitio QuikChange (Stratagene), etc. Técnicas tales como mutagénesis por exploración de alanina son particularmente adecuadas para este enfoque.

Ácidos nucleicos

La presente invención proporciona adicionalmente moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos IFN α 2 mejorados de la invención.

Puede producirse una molécula de ácido nucleico usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación) o síntesis química. Las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias de ácido nucleico naturales y homólogos de las mismas que comprenden, aunque sin limitación, variantes alélicas naturales y secuencias de ácido nucleico modificadas en las que se han insertado, deletado, sustituido y/o invertido nucleótidos de tal modo que dichas modificaciones no interfieran sustancialmente con la capacidad de la molécula de ácido nucleico de codificar los polipéptidos IFN α 2 recombinantes de la presente invención.

Una secuencia polinucleotídica u oligonucleotídica puede deducirse a partir del código genético de una proteína, sin embargo, la degeneración del código debe tenerse en cuenta, y secuencias de ácido nucleico de la divulgación también incluyen secuencias que están degeneradas como resultado del código genético, pudiendo los especialistas en la técnica determinar fácilmente dichas secuencias.

Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" como se usan en este documento se refieren a un oligonucleótido, polinucleótido o nucleótido y fragmentos o partes de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético, que pueden ser mono o bicatenarios, y representan la cadena con sentido o antisentido. También debe entenderse que el término incluye, como equivalentes, análogos de ARN o ADN hechos de análogos de nucleótidos y, los aplicables a la realización que se está describiendo.

El término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 6 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos, y más preferiblemente de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos, que puede usarse en amplificación por PCR o un ensayo de hibridación, o una microserie. Como se usa en este documento, un oligonucleótido es sustancialmente equivalente a los términos "amplimeros", "cebadores", "oligómeros", y "sondas", como se define en la técnica.

Como se usa en este documento, las condiciones altamente rigurosas son aquellas que son tolerantes en hasta aproximadamente un 5% a aproximadamente un 25% de divergencia de secuencia, preferiblemente hasta aproximadamente un 5% a aproximadamente un 15%. Sin limitación, ejemplos de condiciones altamente rigurosas (-10°C por debajo de la T_m calculada del híbrido) usan una solución de lavado de SSC 0,1 x (citrate salino convencional) y SDS al 5% a la T_i (temperatura de incubación) apropiada por debajo de la T_m calculada del híbrido. La rigurosidad final de las condiciones se debe principalmente a las condiciones de lavado, particularmente si las condiciones de hibridación usadas son aquellas que permiten híbridos menos estables para formarse junto con híbridos estables. Las condiciones de lavado a rigurosidad mayor entonces retiran los híbridos menos estables. Una condición de hibridación habitual que puede usarse con las condiciones de lavado de altamente rigurosas a moderadamente rigurosas descritas anteriormente es hibridación en una solución de SSC 6 x (o SSPE 6 x), reactivo de Denhardt 5 x, SDS al 0,5%, 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado a una T_i apropiada. (Véase en líneas generales Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^o edición, Cold Spring Harbor Press (1989) para condiciones de elevada rigurosidad adecuadas).

Las condiciones de rigurosidad son una función de la temperatura usada en el experimento de hibridación y los lavados, la molaridad de los cationes monovalentes en la solución de hibridación y en la solución o soluciones de lavado y el porcentaje de formamida en la solución de hibridación. En general, la sensibilidad por hibridación con una sonda se ve afectada por la cantidad y actividad específica de la sonda, la cantidad del ácido nucleico diana, la

capacidad de detección del marcador, la tasa de hibridación, y la duración de la hibridación. La tasa de hibridación se maximiza a una T_i de aproximadamente 20°C-25°C por debajo de la T_m para híbridos ADN:ADN y aproximadamente 10°C-15°C por debajo de la T_m para híbridos ADN:ARN. También se maximiza por una fuerza iónica de Na^+ aproximadamente 1,5 M. La tasa es directamente proporcional a la longitud del dúplex e inversamente proporcional al grado de desapareamiento.

La especificidad en la hibridación, sin embargo, es una función de la diferencia en la estabilidad entre el híbrido deseado y los híbridos "de fondo". La estabilidad del híbrido es una función de la longitud del dúplex, la composición de bases, la fuerza iónica, el desapareamiento, y los agentes desestabilizantes (si los hay). La T_m de un híbrido perfecto puede estimarse para híbridos ADN:ADN usando la ecuación de Meinkoth et al., (Anal Biochem. 1984; 138 (2) : 267- 84) .

Expresión y purificación de polipéptidos IFN α 2 mejorados

Existen varios modos para expresar y purificar IFN α 2 humano recombinante en bacterias, en particular en *E. coli*, para obtener polipéptidos IFN α 2 que tengan actividad agonista o antagonista mejorada. Pueden usarse métodos conocidos para expresar los genes clonados en bacterias. Para obtener una expresión de alto nivel de un gen eucariota clonado en un sistema procariota, es preferible construir vectores de expresión que contengan un promotor fuerte para dirigir la transcripción de ARNm.

Ejemplos de regiones reguladoras adecuadas para este propósito son la región promotora y operadora del gen de la beta-glucosidasa de *E. coli*, la vía biosintética del triptófano de *E. coli*, o el promotor de movimiento a la izquierda del fago A. La inclusión de marcadores de selección en plásmidos de ADN introducidos por transformación en *E. coli* también es útil. Ejemplos de dichos marcadores incluyen los genes que especifican resistencia a ampicilina, tetraciclina, o cloranfenicol. Las modificaciones post-traduccionales, tales como glucosilación, no suceden en el sistema de expresión celular procariota de *E. coli*. Además, proteínas con patrones disulfuro complejos pueden plegarse mal cuando se expresan en *E. coli*. Con el sistema procariota, la proteína expresada está presente en el citoplasma celular en forma insoluble, en los llamados cuerpos de inclusión, en la fracción soluble después de haberse lisado la célula, o se dirige al periplasma por la adición de secuencias de señal de secreción apropiadas. Si la proteína expresada está en cuerpos de inclusión insolubles, habitualmente se requiere solubilización y posterior replegamiento de los cuerpos de inclusión.

Se conocen muchos vectores de expresión procariotas por parte de los especialistas en la técnica y están disponibles en el mercado, tales como pKK233-2 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pKK233-2 (Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.), y pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, EE.UU.). Los promotores habitualmente usados en sistemas de expresión microbianos recombinantes incluyen el sistema promotor de la beta-lactamasa (penicilinas) y de latosa (Chang, A. C. et al. 1978, Nature 275: 617-624). El sistema promotor del 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 pL del fago lambda y el represor termoinducible *clts857* (Bernard et al., 1979, Gene 5: 59-76).

En la actualidad se usó el siguiente protocolo: Se clonó el gen que codifica IFN α 2 en un vector de expresión bicistrónico basado en el plásmido pT7T3-18U, al cual se añadió un segundo cistron justo cadena arriba desde el codón de inicio. El segundo cistron es de los primeros 9 aminoácidos del gen *lpp* 5' que incluye su sitio SD flanqueado por sitios de restricción XbaI y NdeI. La razón de insertar un segundo cistron fue mejorar el rendimiento de la expresión de proteína heteróloga. Además, para mejorar el nivel de expresión, se cambiaron 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 GCT CAG ATG CGT CGT (SEC ID N° 14). Las proteínas se expresan en células BL21, durante una noche en medio rico. Se encuentra IFN α 2 en los cuerpos de inclusión, que se disuelven en urea 8 M que contiene DTT 5 mM. Se repliega IFN α 2 por una dilución de factor 20 durante una noche. Se realiza purificación de proteína usando metodologías convencionales. Los rendimientos típicos de proteína fueron de 10 mg/l de cultivo celular. IFN α 2 discurre como una única banda de 18 kDa en SDS-PAGE.

Análogos, fragmentos, derivados, y variantes de polipéptidos IFN α 2 mejorados

Un análogo, fragmento, derivado, o variante de los polipéptidos IFN α 2 mejorados puede ser: (i) uno en el que uno o más restos aminoácidos están sustituidos con un resto aminoácido conservado o no conservado; o (ii) uno en que uno o más de los restos aminoácidos incluye un grupo sustituto; o (iii) uno en que el polipéptido IFN α 2 mejorado está fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para la aumentar la semivida del polipéptido IFN α 2 mejorado (por ejemplo, polietilenglicol); o (iv) uno en que se fusionan aminoácidos adicionales al polipéptido IFN α 2 mejorado maduro, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido IFN α 2 mejorado maduro; o (v) uno en que la secuencia del polipéptido IFN α 2 mejorado está fusionada con un polipéptido más grande, es decir, albumina humana, un anticuerpo o Fc, para una duración aumentada del efecto. Dichos análogos, fragmentos, derivados, y variantes se consideran dentro del alcance de los especialistas en la técnica a partir de los contenidos de este documento. Una "sustitución conservativa de

aminoácido" es una en la que el resto aminoacídico se reemplaza con un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. Se han identificado en la técnica familias de restos aminoacídicos que tienen 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 con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina), y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Sustituciones no conservativas no serían para restos aminoacídicos conservados o para restos aminoacídicos que residen dentro de un dominio conservado de proteína. Fragmentos o partes biológicamente activas incluyen fragmentos polipeptídicos adecuados para su uso como medicamento, como reactivo de investigación, y similares. Los fragmentos incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente similares a u obtenidas de las secuencias de aminoácidos de un polipéptido IFN α 2 mejorado de esta invención y que muestra al menos una actividad de ese polipéptido, pero que incluye menos aminoácidos que los polipéptidos de longitud completa desvelados en este documento. Típicamente, las partes biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad del polipéptido. Dichas partes biológicamente activas pueden prepararse de forma sintética o por técnicas recombinantes y pueden evaluarse para una o más de las actividades funcionales de un polipéptido de esta invención por medios desvelados en este documento y/o bien conocidos en la técnica.

Los derivados preferidos incluyen polipéptidos IFN α 2 mejorados que se han fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido y/o para reducir la inmunogenicidad potencial del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol, "PEG"). El PEG puede usarse para conferir solubilidad en agua, tamaño, velocidad lenta de eliminación renal, e inmunogenicidad reducida a la proteína de fusión. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.214.966. En el caso de PEGilaciones, la fusión del polipéptido IFN α 2 mejorado a PEG puede conseguirse por cualquier medio conocido para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, la PEGilación puede conseguirse introduciendo primero una mutación de cisteína en el polipéptido IFN α 2 mejorado, seguido por derivatización específica de sitio con PEG-maleimida. El resto de cisteína puede añadirse al extremo C-terminal del polipéptido IFN α 2 mejorado. Véase, por ejemplo, Tsutsumi, Y. et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8548- 8553.

Las variantes de los polipéptidos IFN α 2 mejorados incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos suficientemente similar a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos IFN α 2 mejorados originales o combinaciones de los mismos. Las variantes incluyen polipéptidos IFN α 2 mejorados que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Las variantes con actividad mejorada pueden identificarse explorando bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes de truncamiento o puntuales, de polipéptidos IFN α 2 mejorados de esta invención.

En una realización, se genera una biblioteca variegada de variantes por mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico y se codifica por una biblioteca génica variegada. Una biblioteca variegada de variantes puede producirse por, por ejemplo, ligamiento enzimático de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de modo que sea expresable una serie degenerada de secuencias de aminoácidos variantes potenciales como polipéptidos individuales o, como alternativa, como una serie de polipéptidos IFN α 2 mejorados más grandes (por ejemplo, para presentación en fagos) que contienen la serie de secuencias en los mismos. Existe una diversidad de métodos que pueden usarse para producir bibliotecas de variantes potenciales a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. Puede realizarse síntesis química de una secuencia génica degenerada en un sintetizador automático de ADN, y el gen sintético después puede ligarse en un vector de expresión apropiado. El uso de una serie degenerada de genes permite proporcionar, en una mezcla, todas las secuencias que codifican la serie deseada de secuencias variantes potenciales. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Itakura, K. et al. 1984, Annu. Rev. Biochem. 53: 323-356).

Se conocen varias técnicas en la técnica para seleccionar productos génicos a partir de bibliotecas combinatorias hechas por mutaciones puntuales o truncamiento, y para explorar bibliotecas de ADNc para productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables para una exploración rápida de las bibliotecas génicas generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos IFN α 2 mejorados para actividad específica. Las técnicas más ampliamente usadas, que son susceptibles a análisis de alto rendimiento para explorar bibliotecas génicas grandes típicamente incluyen clonar la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, transformar las células apropiadas con la biblioteca resultante de vectores y expresar los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Puede usarse mutagénesis de conjunto recursivo (REM), una técnica que potencia la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, en combinación con ensayos de exploración para identificar las variantes deseadas.

Composiciones farmacéuticas de la invención

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que pueden administrarse a un paciente para

conseguir un efecto terapéutico. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden prepararse para su administración combinando un polipéptido IFN α 2 mejorado, que tiene el grado deseado de pureza en una cantidad farmacéutica eficaz, con vehículos farmacéuticamente aceptables.

5 Los polipéptidos IFN α 2 mejorados y composiciones farmacéuticas de la presente invención son útiles para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular y subcutánea), tópica, oral, inhalable, o local.

Los polipéptidos mejorados de la invención pueden usarse en composiciones farmacéuticas, para cualquier método de administración, incluyendo aunque sin limitación administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, o intratecal. Por tanto, los polipéptidos descritos anteriormente preferiblemente se combinarán con un vehículo farmacéutico estéril aceptable, tal como dextrosa al cinco por ciento, solución de Ringer lactada, solución salina normal, agua estéril, o cualquier otra solución de tampón fisiológico preparada comercialmente diseñada para infusión intravenosa. Se entenderá que la selección de la solución vehículo, y la dosificación y administración de la composición, variarán con el sujeto y el entorno clínico particular, y estarán regidas por procedimientos médicos convencionales.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse en cantidades eficaces para inhibir o mejorar las consecuencias patológicas o síntomas asociados con MS, cáncer, IDDM o SLE.

La administración de los polipéptidos IFN α 2 mejorados de la presente invención puede ser por inyección intravenosa en embolada, por infusión intravenosa constante, o por una combinación de ambas vías. Como alternativa, o adicionalmente, pueden aceptarse los polipéptidos IFN α 2 mejorados mezclados con excipientes apropiados en la circulación mediante un sitio intramuscular.

Claramente, los polipéptidos son menos adecuados para administración oral debido a la susceptibilidad a digestión por los ácidos gástricos o las enzimas intestinales, sin embargo, en ciertas realizaciones pueden usarse formulaciones específicas para administración oral.

En la preparación de las composiciones en formas líquidas orales de dosificación (por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones), pueden emplearse medios farmacéuticos típicos, tales como agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Asimismo, cuando se preparan formas sólidas orales de dosificación (por ejemplo, polvos, comprimidos y cápsulas), se emplearán vehículos tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y cápsulas representan una forma oral de dosificación deseable para las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Los polipéptidos son menos adecuados para administración tópica, sin embargo, para tratamiento local pueden usarse formulaciones específicas.

Para administración tópica, los polipéptidos IFN α 2 mejorados de la presente invención pueden formularse usando bases humectantes suaves, tales como pomadas o cremas. Ejemplos de bases de pomada adecuadas son vaselina, vaselina más siliconas volátiles, lanolina y emulsiones de agua en aceite.

Para administración por inhalación, los polipéptidos IFN α 2 para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionan una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del péptido y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los polipéptidos IFN α 2 mejorados y composiciones farmacéuticas de la presente invención son particularmente útiles para administración intravenosa. Las composiciones para administración comprenderán habitualmente una solución del polipéptido IFN α 2 mejorado disuelta en un vehículo farmacéutico aceptable, preferiblemente en un vehículo acuoso. Puede usarse una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de materia indeseable. Las composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convenciones bien conocidas. Una composición farmacéutica típica para administración intravenosa puede determinarla fácilmente un especialista en la técnica. Las cantidades administradas son claramente específicas de la proteína y dependen de su potencia y perfil farmacocinético. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los especialistas en la técnica y se describen en más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 18^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990.

Las composiciones que contienen los polipéptidos IFN α 2 mejorados de la invención o un cóctel de los mismos (es

decir, con otras proteínas) pueden administrarse en tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que padece MS, cáncer, y trastornos asociados con expresión aumentada de IFN α 2 en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente el trastorno. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y el estado general de la salud del paciente.

Puede administrarse una o múltiples administraciones de las composiciones dependiendo de la dosificación y frecuencia requeridas y toleradas por el paciente. En cualquier caso, la composición debe proporcionar una cantidad suficiente de los polipéptidos IFN α 2 mejorados de esta invención para tratar de forma eficaz al paciente. Generalmente, dependiendo del modo pretendido de administración, las composiciones farmacéuticas aceptables contendrán de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 99% en peso de un polipéptido IFN α 2 mejorado de la invención, y del 99% al 1% en peso de un excipiente o vehículo farmacéutico adecuado. Preferiblemente, la composición será de aproximadamente el 5% al 75% en peso de un polipéptido o polipéptidos IFN α 2 mejorados de la invención, siendo el resto excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados.

Los polipéptidos IFN α 2 mejorados de la presente invención, o sus composiciones farmacéuticas aceptables, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz, que variará dependiendo de una diversidad de factores incluyendo la actividad específica del polipéptido IFN α 2 mejorado particular empleado; la estabilidad metabólica y la duración de acción del polipéptido IFN α 2 mejorado; la edad, peso corporal, alud general, sexo, y dieta del paciente; el modo y tiempo de administración; la velocidad de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad de las patologías particulares; y la terapia que está experimentando el hospedador. Generalmente, una dosis diaria terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 1000 μ g/kg de peso corporal por administración de un polipéptido IFN α 2 mejorado de la invención, preferiblemente, de aproximadamente 0,5 μ g a aproximadamente 100 μ g/kg de peso corporal por administración. Por ejemplo, para la administración a una persona de 70 kg, el intervalo de dosificación será de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 100 μ g por administración de un polipéptido IFN α 2 mejorado de la invención dependiendo del régimen de tratamiento. Por ejemplo, si el polipéptido IFN α 2 mejorado de la invención o formulación que contiene el polipéptido se administra de una a varias veces al día, entonces se necesitaría una dosis inferior que si la formulación se administrara semanalmente, o mensualmente o menos frecuentemente.

Se prevé que los polipéptidos IFN α 2 de la presente invención se administrarán en dosis apropiadas. Las dosis generalmente se ajustan a o por debajo de la dosis tolerada máxima (MTD). Son signos indicativos de toxicidad por interferón observados en cuanto a toxicidad hematológica, anemia, trombocitopenia, leucopenia; en cuanto a toxicidad gastrointestinal, diarrea, dispepsia, disfagia, N/V, dolor abdominal; en cuanto a toxicidad hepática, aumentos en la bilirrubina, fosfatasa alcalina y LFT; en cuanto al riñón y la vejiga, hematuria microscópica, piuria, azotemia, proteinuria, fallo renal agudo, síndrome nefrótico, glucosuria, albuminuria; en cuanto a pulmonar, ortopnea, disnea, broncoespasmo, tos, edema pulmonar, ARDS; en cuanto a toxicidad cardíaca, síncope, MI, SVT, bradicardia, taquicardia, mareos, hipotensión, hipertensión. De toxicidad neuronal son confusión, temblores, entumecimiento, parestesia, incapacidad de concentrarse, somnolencia, alucinaciones, encefalopatía, ataque, coma, retardo psicomotor, disfunción de la memoria, boca seca, sudoración, trastorno de la personalidad, agitación, neuropatía, depresión, ansiedad, afasia, infarto retinal con pérdida de visión, dolor ocular, hemianopsia, cambio del sabor, cefalea, síncope, insomnio. Se observa en toxicidad dérmica erupción cutánea, urticaria, necrosis epidérmica, erupción maculopapular. La toxicidad metabólica se manifiesta como hiperglucemia. Además se controla la coagulación para aumentos en PT/PTT. También la presencia de faringitis, alopecia, fatiga, malestar, anorexia, pérdida de peso, fiebre, escalofríos, mialgia, artralgia, cianosis son respuestas tóxicas potenciales a interferón.

Indicaciones terapéuticas

Esclerosis múltiples (MS)

Las dos formas de IFN, IFN β 1a e IFN β 1b, están aprobadas para el tratamiento de MS recidivante remitente. IFN- β también se usa para tratar verrugas genitales. Los polipéptidos IFN α 2 mejorados de esta invención son útiles en las enfermedades, trastornos o afecciones anteriores, y son también útiles para el tratamiento de otras formas de MS, incluyendo MS progresiva secundaria, MS progresiva primaria, y MS recidivante progresiva. Por útil se entiende que los polipéptidos IFN α 2 mejorados son útiles para el tratamiento de la enfermedad, por ejemplo, para prevenir la enfermedad, o para prevenir la progresión de la enfermedad a un estado más grave, o para mejorar o reducir un síntoma o consecuencia de la enfermedad, tal como MS.

Cáncer

A pesar de los numerosos avances en el tratamiento del cáncer, los cambios en el estilo de vida bien conocidos que pueden reducir enormemente el riesgo de cáncer, y los signos de advertencia tempranos que algunos cánceres proporcionan, muchos pacientes aún desarrollan cánceres para los cuales no hay terapias convencionales disponibles que ofrezcan alguna esperanza razonable de cura o paliación significativa. Se sabe que IFN α 2 tiene efectos anti-neoplásicos.

Una persona que padece cáncer avanzado puede mostrar uno o más de los siguientes signos o síntomas: presencia de tumor canceroso, fatiga, dolor, estado funcional disminuido por la carga tumoral, y los síntomas bien conocidos asociados con cada cáncer específico.

5 Para poner en práctica la invención, se administran mutantes de IFN α 2 al paciente que muestra 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.

10 Infección por virus de la hepatitis (HCV)

Las terapias actuales que tratan una infección por HCV tienen ciertos inconvenientes. Los regímenes de dosificación que implican inyecciones diarias (QD), en días alternos (QOD), o tres veces a la semana (TIW) de IFN- α durante periodos de tiempo prolongados tienen uno o más de los siguientes inconvenientes: (1) los regímenes de dosificación son incómodos para el paciente y, en algunos casos, provocan un cumplimiento reducido por parte del paciente; (2) los regímenes de dosificación a menudo están asociados con efectos adversos, causando malestar adicional al paciente y, en algunos casos, provocando un cumplimiento reducido por parte del paciente; (3) los regímenes de dosificación provocan "picos" (C máx) y "depresiones" (C mín) en la concentración sérica de IFN- α y, durante los periodos de "depresión", el virus puede replicarse, y/o infectar células adicionales, y/o mutar; (4) en muchos casos, la reducción log en el título viral durante la respuesta viral temprana es insuficiente para lograr una respuesta viral sostenida que finalmente provoque la eliminación del virus. La presente invención podría tener impacto significativo en la mejora del potencial terapéutico para el tratamiento de una infección por virus de la hepatitis.

25 Diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM)

La etiología de IDDM es una materia de gran debate. Parece ser multifactorial, incluyendo predisposición genética e influencias ambientales. Se han identificado fuertes asociaciones entre IDDM y HLA específicos codificados por la región del complejo principal de histocompatibilidad localizada en el brazo corto del cromosoma 6. Los alelos de alto riesgo principales son DR3 y DR4. Las influencias ambientales que se cree que son importantes incluyen virus, y varias líneas de evidencia apoyan esta opinión. Ciertos virus diabetogénicos o asociados (paperas, sarampión, rubéola, encefalomiocarditis M, virus coxsackie B, y reovirus) se han asociado epidemiológicamente con el desarrollo de IDDM o pueden causar diabetes cuando se inoculan en roedores. Los virus diabetogénicos pueden infectar directamente células B en cultivo. Además, el virus coxsackie B4 se ha aislado del páncreas de un niño con IDDM de aparición reciente que murió de cetoacidosis severa, y este virus produjo diabetes en animales experimental junto con antígenos virales en las células B de los animales infectados. Las células B de pacientes con IDDM secretaban interferón alfa, por tanto los polipéptidos IFN α 2 antagonistas desvelados podrían tener impacto significativo en la mejora del potencial terapéutico de IDDM.

40 Lupus eritematoso (LE)

El LE es una enfermedad autoinmune que causa inflamación y daño en diversos tejidos y partes corporales, incluyendo las articulaciones, los riñones, el corazón, los pulmones, el cerebro, los vasos sanguíneos, y la piel. Los síntomas más habituales de LE incluyen articulaciones doloridas o hinchadas (artritis), fiebre, fatiga prolongada o extrema, erupciones cutáneas y problemas renales. Aunque la causa de LE aún es desconocida, se cree que el LE está causado por una combinación de factores genéticos, ambientales y posiblemente hormonales. El LE puede caracterizarse por periodos de enfermedad o brotes, y periodos de bienestar o remisión. Por consiguiente, los objetivos de un tratamiento eficaz de LE son evitar los brotes, minimizar el daño orgánico y las complicaciones, y mantener las funciones corporales normales. Las mediaciones habitualmente prescritas para LE incluyen fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID), acetaminofeno, corticosteroides, antipalúdicos y fármacos inmunomoduladores. A causa del éxito limitado de las mediaciones actualmente disponibles y sus efectos secundarios potencialmente graves, es importante proporcionar un tratamiento eficaz alternativo para LE.

55 La composición desvelada puede ser eficaz para minimizar y/o eliminar diversos síntomas en pacientes con LE.

Habiendo descrito ahora la invención en líneas generales, la misma se entenderá más fácilmente a través de la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes.

60 **Ejemplos**

Métodos:

65 **(i) Mutagénesis dirigida al sitio.** Se realizó mutagénesis dirigida al sitio por amplificación por PCR del plásmidos de expresión pT72Ca2 con cebadores de 18-21 nucleótidos que contenían el codón mutado usando las polimerasas de alta fidelidad *pwo* (Boehringer Mannheim) y *pfu* (Stratagene) como se ha descrito previamente (Piehler, J. y Schreiber, G. 1999, J. Mol. Biol 294, 223-237). Después de fosforilación y

ligamiento, los plásmidos mutados se introdujeron por transformación en células *E. coli* TG1. La secuencia del gen expresado completo que contenía la mutación se verificó por secuenciación de ADN.

(ii) Expresión y purificación de la proteína. Se expresaron IFN α 2 e IFNAR2-EC en *E. coli* y se purificaron por cromatografía de intercambio iónico y exclusión de tamaño como se ha descrito previamente (Piehler, J. y Schreiber, G. 1999, J. Mol. Biol. 289, 57-67).

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

La pureza de la proteína se analizó por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. La concentración de la proteína IFN α 2 activa se determinó para todos los mutantes por filtración analítica en gel con IFNAR2-EC como se ha descrito previamente (Piehler, J. y Schreiber, G. 1999, J. Mol. Biol. 289, 57-67). Para estudios de unión a ligando, IFN α 2 e IFN β se marcaron con especificidad de sitio usando química de maleimida. IFN β se marcó directamente en su resto de cisteína libre C17 mediante incubación de un exceso molar de 2 veces de maleimida Oregon Green 488 (OG488) (Molecular Probes) durante 2 h en HBS. IFN α 2 se marcó con OG488 tras la incorporación de un resto de cisteína adicional (mutación S136C), que se ha demostrado que no afecta a la interacción con IFNAR1-EC o IFNAR2-EC (Gavutis et al., 2005, Biophysical Journal 88(6): 4289-4302).

(iii) Crecimiento y replegamiento del mutante IFN α 2-YNS. Se cultivó *E. coli* en matriz de 750 ml. Las bacterias se centrifugaron, se resuspendieron en 30 ml de tampón de lisis y se sonicaron en bacteriología durante 30" cinco veces. Después de centrifugación a 16.000 rpm durante 30', se resuspendió el sedimento (cuerpos de inclusión) en ~30 ml de solución de lavado triton (triton al 0,5%, Tris 8 50 mM y NaCl 100 mM). Los cuerpos de inclusión se centrifugaron a 25.000 g (14.500 rpm en ss34 sorval) y se lavaron 4-5 veces. Se realizó un lavado final para deshacerse del triton, usando Tris 50 mM (8,4) con NaCl 100 mM. Los cuerpos de inclusión purificados se disolvieron en 5 ml de Guanidina 6 M durante aproximadamente 12 h a 4°C con agitación suave. Después de centrifugación a 25000 g durante 20', el sobrenadante se guardó y se desechó el sedimento.

Para el replegamiento, se diluyó el sobrenadante 1:20 en Arginina 0,8 M pH 9,3, se agitó lentamente suavemente en un vórtice, y se removió a 20°C durante 2 h. Después de centrifugación a 16.000 rpm durante 20' y diálisis frente a Tris 7,4, la proteína se purificó por cromatografía de intercambio iónico para producir: ~5 mg/l de proteína pura.

(iv) Mediciones de la afinidad de unión. La interacción entre IFNAR1-EC recombinante e IFN α 2 se controló por espectroscopía de interferencia reflectométrica (RIfS) en condiciones de flujo continuo (Schmitt, H. M., et al., 1997, Biosens. & Bioelectron. 12, 809-816). Este método detecta la interacción biomolecular en las superficies de contacto como un cambio en la densidad óptica aparente de una capa delgada de sílice. La unión a la superficie se controla como un desplazamiento en el espectro de interferencia. Un desplazamiento de 1 pm corresponde a aproximadamente 1 pg/mm² de proteína en la superficie. Un segundo método aplicado para las mediciones de unión a tiempo real fue por SPR (resonancia de plasmón superficial) usando el ProteON (Biorad). Todas las mediciones se realizaron usando HBS (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Triton X100 al 0,01%) como tampón de procesamiento. La unión de la subunidad del receptor IFNAR1 a la superficie del chip se hizo mediante dos métodos. En uno, se acopló el mAb DB2 no neutralizante anti-IFNAR1-EC a la superficie (dextrano amino-funcionalizado AMD 500) mediante sus grupos amino expuestos por química de acoplamiento amina. El IFNAR1-EC se capturó por afinidad en la superficie seguido de entrecruzamiento con un segundo mAb AA3. En un segundo método, la cola marcada con His de IFNAR1 se unió directamente a la superficie NTA del chip. Se da una descripción detallada del método usado para medir la interacción interferón-IFNAR2-EC en (Piehler, J. y Schreiber, G. 2001, Canal. Biochem. 289, 173- 186). Para uniones débiles, la determinación de la constante de disociación K_D se obtuvo a partir de la respuesta en equilibrio representada frente a la concentración de proteína y ajustada de acuerdo con la ley de acción de masas. Para interacciones de unión más fuertes, se determinaron las constantes de velocidad cinética y se calculó la afinidad a partir de la proporción $k_{off}/k_{on} = K_D$ así como directamente a partir de la respuesta en equilibrio.

(v) Ensayo de actividad de protección antiviral. La actividad antiviral de IFN α 2 de tipo silvestre y mutante se ensayó como la inhibición del efecto citopático del virus de la estomatitis vesicular (VSV) en células WISH humanas (Evinger, M. et al., 1981, Arch. Biochem. Biophys. 210, 319-329). La actividad relativa de los mutantes de IFN α 2 se determinó como la concentración necesaria para una protección del 50% de las células en relación a la concentración de IFN α 2 de tipo silvestre necesaria para una protección del 50%.

(vi) Ensayo antiproliferativo. La actividad antiproliferativa de IFN α 2 en células Daudi de linfoma de Burkitt se ensayó como se ha descrito (Piehler, J. et al., 2000, J. Biol. Chem. 275, 40425-40433). Las células se trataron durante 60 h con IFN. Después se determinó la cantidad de células vivas usando un kit de tinción celular (Biological Industries Co, Israel) basado en la detección colorimétrica de la escisión de la sal tetrazolio XTT en formazano. El ensayo antiproliferativo en células WISH se realizó añadiendo interferón a diferentes diluciones al medio de cultivo, y controlando la densidad celular después de 72 h por tinción con cristal violeta.

(vii) Errores. El error (σ) en K_D para la unión IFN α 2-IFNAR2 medida en RIfS es del 20%, y para la afinidad relativa (wt/mut) del 30%. Para IFN α 2-IFNAR1, el error (σ) en K_D es del 35% y para la afinidad relativa (wt/mut) del 50%. Usando 2σ (confianza del 95%) como nivel de confianza básico, esto sugeriría que pudiera observarse como significativo un mínimo de cambio de factor dos. La magnitud del error (σ) para mediciones

individuales de la actividad biológica (ya sea antiviral o antiproliferativa) es del 35%. Por lo tanto, un nivel de confianza 2σ entre dos mediciones sugeriría que diferencias más pequeñas que de factor dos están dentro del error experimental.

(viii) Experimentos de microserie de oligonucleótidos aplicados puntualmente. Se adquirieron microseries de vidrio recubiertas con poli-L-lisina que contenían casi 19.000 sondas diferentes (serie de oligonucleótidos humanos de Compugen) en CAG (Center for Applied Genomics, Nueva Jersey). Las microseries se sondeó con una mezcla que consistía en ADNc marcado con cianina (Cy) 3 o Cy5 que representaban tratamiento con IFN frente a sin tratamiento (control). Se trataron células WISH con diferentes IFN durante 16 horas y se extrajo su ARN (RNeasy Midi kit, Qiagen), 100 μg del cual se sometieron a transcripción inversa (enzima de RT de mutantes puntuales M- MLV H-, Promega) con nucleótido dUTP aminoalil-modificado (Ambion) mezclado en la mezcla de nucleótidos a una proporción 4:1 de aa-dUTP a dTTP. El ADNc producido se marcó con la sonda fluorescente Cy3 o Cy5 activada con NHS (Amersham), que se une a los aa-dUTP. Se evaluó la incorporación (espectrofotómetro NanoDrop) y los ADNc marcados se mezclaron (tratamiento con un color y control con el otro) a cantidades equivalentes de colorante fluorescente (100 pmol cada uno), en SSC 2X final, SDS al 0,08% y 6 μl de solución de bloqueo (Amersham), en 100 μl de volumen final, se desnaturalizaron a 95°C durante 3 minutos, se enfriaron y se aplicaron entre un cubreobjetos levantado (LifterSlip, Erie Scientific Company) y la serie. La hibridación se hizo a 55°C durante 12 horas en la oscuridad. Después de ello, el portaobjetos se lavó cinco minutos en SSC 2X, SDS al 0,5% a 55°C; cinco minutos en SSC 0,5X a temperatura ambiente y finalmente cinco minutos en SSC 0,05X a temperatura ambiente. Después se secó por centrifugación 3 minutos a 1000 rpm, y se almacenó en la oscuridad hasta su exploración.

Análisis de imágenes y datos de microserie. La exploración de las microseries hibridadas se realizó con un escáner de microserie de ADN (Agilent). La detección automática de manchas, la sustracción del fondo y la cuantificación de la intensidad se hicieron con el software SpotReader (Niles Scientific). La normalización de los datos, la filtración y el análisis de grupos se hizo con el software GeneSpring (SiliconGenetics). El análisis se basa en la proporción de tratamiento a control de cada mancha, e incluye manipulaciones tales como filtración de datos mediante indicadores de salida del SpotReader, una indicación de la calidad de la señal, relativamente al fondo (ruido). Cada tratamiento (condición) se presenta por dos réplicas de microserie de intercambio de colorante. Se integró una lista de inicio de genes modulados por interferón por genes más allá de 1,7 veces el umbral en al menos dos condiciones, tolerando solamente un indicador de 'ausente' ('A'), que es indicativo de una mancha 'de ruido', en todas las condiciones por gen. Este criterio se eligió después de comprender que la regulación positiva o negativa auténtica se observa en más de solamente un tratamiento con IFN, de modo que eligiendo dos condiciones como mínimo, es necesario un umbral de baja rigurosidad para incluir ISG modificados a niveles relativamente bajos.

La lista de estos genes se exportó a una hoja de cálculo de Excel, y contenía el valor de la proporción media de tratamiento a control, los valores replicados, los valores p del ensayo t, que son una estimación del error técnico de la microserie basado en la distancia entre réplicas, y los códigos de indicador. Los genes después se exploraron de forma ocular para la significancia, comparando la distancia entre cada par de réplicas y entre condiciones, mirando también los valores p y la aparición de un indicador 'A'. Este tedioso análisis fue necesario porque la selección estadística deja fuera a regulados positivamente/negativamente, a causa del ruido relativamente grande producido por la baja cantidad de réplicas por condición. Un valor medio más allá del 1,7 el umbral que tiene una de sus réplicas por debajo de este umbral, o con una gran distancia entre réplicas con relación a la media, y con ninguna otra condición con niveles similares y significativos, no se consideró una modulación auténtica, sino ruido técnico, y el gen se excluyó consecuentemente de la lista. La lista final consistía en 395 genes, regulados positivamente o regulados negativamente a las 16 horas de tratamiento. El análisis de grupo se hizo sobre la lista después de importarla de nuevo a GeneSpring.

Ejemplo 1. Caracterización de la interacción IFN α 2-IFNAR1-EC usando un sistema de biosensor óptico

Se investigó la interacción de IFNAR1-EC con IFN α 2 por detección en fase sólida sin marcador usando RlfS. Esta tecnología requiere la inmovilización en la superficie de un chip de uno de los compuestos de la interacción. Se usó el método satisfactoriamente empleado previamente para IFNAR2-EC, donde el receptor se inmoviliza usando mAb que por sí mismo se inmovilizan en la superficie mediante acoplamiento amino (Piehler, J. y Schreiber, G. 2001, Anal. Biochem. 289, 173-186). Se acopló el mAb DB2 no neutralizante anti-IFNAR1-EC a la superficie de dextrano amino-funcionalizado AMD 500 mediante sus grupos amino expuestos. El IFNAR1-EC se capturó por afinidad en la superficie con los mAb seguido de entrecruzamiento con un segundo mAb AA3. El proceso RlfS seguido en tiempo real se muestra en la Fig. 1A. La actividad de unión de IFNAR1-EC unido a la superficie de RlfS se determinó inyectando proteína IFN α 2 a concentraciones que variaban de 0,12 a 4 μM . Debido a la baja afinidad de unión de IFN α 2 a IFNAR1-EC no pudieron determinarse los datos cinéticos de asociación y disociación. Por lo tanto, la afinidad de unión se determinó a partir de la representación de la respuesta estacionaria frente a la concentración de proteína de acuerdo con la ley de acción de masas. Esto produce una constante de afinidad de 1,5 μM para IFN α 2 de tipo silvestre (Lamken, P. et al., 2004, J Mol Biol 341, 303-318).

Ejemplo 2. Mapeado del sitio de unión de IFN α 2 para IFNAR1

Para localizar el sitio de unión de IFNAR1 en IFN α 2, se realizó una exploración de Ala de la mayoría de los restos localizados en las hélices B y C (Fig. 2 y 3). En conjunto, se produjeron 21 mutaciones puntuales individuales, y su afinidad de unión hacia IFNAR2 e IFNAR1 se midió por RfS en ProteON. Como las mutaciones están localizadas en la superficie opuesta del sitio de unión a IFNAR2 en IFN α 2, las afinidades de unión de las diferentes proteínas mutantes hacia IFNAR2 fueron muy similares a las de IFN α 2 de tipo silvestre (Tabla 1). Esto es una garantía, ya que valida el plegamiento apropiado de todas las proteínas mutantes, y sus concentraciones activas. Aunque la unión de IFN α 2 con IFNAR2-EC proporciona una clara señal cinética, la unión hacia IFNAR1-EC es mucho más débil y tiene que analizarse de acuerdo con la señal de unidades de refracción (RU) de la afinidad estacionaria, variando la concentración del ligando. En este caso, el conocimiento de las concentraciones correctas y precisas de todas las proteínas IFN α 2 es esencial. Por lo tanto, se validaron las concentraciones de todas las proteínas mutantes en una columna analítica de filtración en gel mediante su capacidad de unirse a IFNAR2-EC. Los resultados de todas las mediciones de unión se resumen en la Tabla 1 y 3 y la Fig. 3A. Tres mutaciones individuales causan un aumento en la unión (H57A, E58A, Q61A) mientras que 6 mutaciones causan una disminución en la unión (F64A, N65A, T69A, L80A, Y85A, Y89A). Sin embargo, no se identificaron puntos calientes para la unión, por tanto, ninguna de las mutaciones condujo a un cambio de más de 5 veces en la afinidad. Para corroborar los efectos de las mutaciones individuales, se preparó un triple mutante que contenía las mutaciones individuales L80A, Y85A, Y89A (en este documento denominado como LYY) y un mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A (SEC ID N° 6) (en este documento denominado NLYY). La unión de estas dos proteínas mutantes estuvo por debajo del umbral de la medición.

Tabla 1: Constantes termodinámicas y cinéticas para las interacciones de IFN α 2 mutante (hélice B y C y el bucle C-D) con IFNAR2-EC e IFNAR1-EC

| Mutante de IFN | IFNAR2-EC | | | | | IFNAR1-EC | | | | |
|------------------|--------------------|------------|--------------|---------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|---------------------------|---------------------------------|--|
| | k_a [s $^{-1}$] | K_D [nM] | K_D wt/mut | $^a\Delta G^0$ (kcal/mol) | $^b\Delta\Delta G^0$ (kcal/mol) | cK_D [mM] | K_D wt/mut | $^b\Delta G^0$ (kcal/mol) | $^c\Delta\Delta G^0$ (kcal/mol) | |
| wt | 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 | | | | | | | | | | |
| α 8-tail | 0,002 | 0,15 | 18 | -13,3 | 1,8 | | | | | |
| d IFN β | 0,0012 | 0,1 | | -13,6 | | 0,066 | | -9,75 | 1,85 | |

$^a\Delta G^0$ calculado a partir de $\Delta G^0 = RT \ln K_D$; $^b\Delta\Delta G^0 = \Delta G^0_{mut} - \Delta G^0_{wt}$; cK_D se determina a partir de la unión en equilibrio en la superficie; d Los datos son de Lamken et al., 2004, J. Mol. Biol. 341, 303-318.

25 Ejemplo 3. Actividad antiproliferativa y antiviral de mutantes de IFN α 2

La actividad antiviral se ensayó como la inhibición del efecto citopático del virus de la estomatitis vesicular (VSV) en células WISH (línea celular de epitelio humano de origen amniótico). La actividad antiproliferativa se determinó tanto en células WISH como en células Daudi, como la inhibición al 50% del crecimiento celular (como se describe en Métodos). La Fig. 4A muestra el resultado de aplicar una dilución en serie de concentraciones de IFN α 2 e IFN β durante 72 h a la misma intensidad mostrada por células WISH después de tinción, a partir de lo cual puede deducirse la concentración de interferón que promueve un efecto antiproliferativo. Los pocillos se exploraron para análisis de densitometría, y los resultados se representaron frente a la concentración de proteína aplicada (Fig. 4B). Se hizo lo mismo para determinar la potencia antiviral de los interferones en células WISH (Fig. 4C). El punto de

actividad al 50% así como la tasa de cambio en la actividad (pendiente) se dedujeron a partir de una curva de respuesta a dosis de IFN, Ec. 1.

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

donde y es la transmitancia que se refiere a la cantidad de células, A_0 es la compensación, A es la amplitud, c es la concentración, c_{50} es la concentración que da una actividad del 50%, y s es la pendiente. Las concentraciones promedio de IFN α 2 e IFN β que promueve una protección antiviral del 50% son 0,85 y 0,43 pM respectivamente (promediadas sobre 6 experimentos). Las concentraciones promedio de IFN α 2 e IFN β que promueven una actividad antiproliferativa del 50% son 1360 y 29 pM (promediadas sobre 17 y 7 experimentos respectivamente). De forma interesante, la concentración de IFN α 2 que promueve una actividad antiproliferativa del 50% en células Daudi es solamente 0,5 pM (Tabla 2), que es más de 1000 veces inferior que la medida para células WISH poniendo de relieve la importancia de usar la misma línea celular para todos los experimentos.

La actividad antiviral y antiproliferativa de todas las proteínas mutantes de interferón se determinó con relación a la de IFN α 2 de tipo silvestre (wt/mut) resumiéndose los resultados en la Tabla 2 y 4. Como se descubrió con la afinidad de unión por IFNAR1-EC, las actividades antivirales y antiproliferativas no cambiaron drásticamente tras la mutación. El único mutante que causa un aumento significativo en la actividad antiviral (> 2 veces) es E58A. L80A, Y85A e Y89A causan una disminución significativa en la actividad antiviral (pero ninguna por encima de 6 veces). Sin embargo, los mutantes combinados LYY y NLYY redujeron la potencia antiviral en 30 y 100 veces, respectivamente. Esta reducción cumple aproximadamente 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 triple mutante). El efecto sobre la actividad antiproliferativa de la misma serie de mutantes es más significativo, causando tanto E58A como Q61A un aumento significativo en la actividad, mientras que N65A, T69A, L80A, Y85A e Y89A causan una disminución significativa en la actividad. Además, la magnitud de la disminución en la actividad medida en el ensayo antiproliferativo usando células WISH es significativamente mayor que la medida para la protección antiviral. Los mutantes múltiples LYY y NLYY reducen la actividad en 190 y 1100 veces, respectivamente. En este caso, las mutaciones individuales sobrestiman el efecto medido para los mutantes múltiples en aproximadamente 30 veces (para LYY, $0,14 \times 0,035 \times 0,044 = 0,00022$ frente al valor medido de forma experimental de 0,0057, y para NLYY $0,16 \times 0,14 \times 0,035 \times 0,044 = 0,00035$ frente al valor medido de forma experimental de 0,00092). Los resultados antivirales y antiproliferativos para todos los mutantes analizados se representan en la Fig. 5A. Por motivos de interés, también se añadió el valor medido para IFN β . A partir de este gráfico parece que la respuesta antiproliferativa es mucho más sensible al mutante IFN α 2 específico en comparación con la respuesta antiviral. Además, esta tendencia también se ajusta a los datos para IFN β , para el cual la actividad antiviral es aproximadamente 2 veces mayor que la de IFN α 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 aumentan con la afinidad de unión, pero no sobre la gama completa (Fig. 5B).

Tabla 2: Actividad biológica de mutantes de IFN α 2

| Mutante de IFN | Actividad antiviral (WISH) | | | Actividad antiproliferativa (WISH) | | | Antiproliferativa (DAUDI) | |
|----------------|----------------------------|--------|-------------------------------|------------------------------------|--------|-------------------------------|---------------------------|--------|
| | 50% (pM) | wt/mut | pendiente ^a wt/mut | 50% (nM) | wt/mut | pendiente ^a wt/mut | 50% (pM) | wt/mut |
| wt | 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 |

| Mutante de IFN | Actividad antiviral (WISH) | | | Actividad antiproliferativa (WISH) | | | Antiproliferativa (DAUDI) | |
|----------------|----------------------------|--------|-------------------------------|------------------------------------|---------|-------------------------------|---------------------------|--------|
| | 50% (pM) | wt/mut | pendiente ^a wt/mut | 50% (nM) | wt/mut | pendiente ^a wt/mut | 50% (pM) | wt/mut |
| V99A | 1,13 | 0,75 | | 1,84 | 0,74 | | 0,51 | 0,98 |
| LYY | 24,29 | 0,035 | 1,32 | 238 | 0,0057 | 4,1 | | |
| NLYY | 92,39 | 0,0092 | | 1478 | 0,00092 | 3,2 | | |
| HEQ | 0,41 | 2,07 | | 0,05 | 24,18 | | | |
| α8-tail | 0,3 | 3 | | 0,13 | 10 | | | |
| IFNβ | 0,43 | 2 | 0,72 | 0,03 | 42,86 | 0,63 | | |

LYY es el triple mutante L80A, Y85A, Y89A. NLYY (SEC ID N° 6) es el mutante cuádruple que incluye LYY y N65A. El punto de actividad del 50% se obtuvo ajustando los datos a la Ec. 1.

^a La pendiente es de la Ec. 1.

Ejemplo 4. La estabilidad del complejo ternario se potencia por HEQ en comparación con IFNα2

5 Como se hallaron tres mutaciones en Ala que aumentaban la unión en 2 a 4 veces, se combinaron estas tres mutaciones de IFNα2 (H57A, E58A, Q61A) en una única proteína mutante de IFNα2, como se usa en este documento, denominada HEQ (SEC ID N° 5). Se estudió la unión de los IFN al dominio extracelular del receptor de interferón de tipo I (IFNAR1-EC), y al complejo ternario incluyendo IFNAR1-EC e IFNAR2-EC por espectroscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRFS). Se fijaron IFNAR2-EC e IFNAR1-EC a través de sus marcas de histidina C- terminales en bicapas lipídicas con soporte sólido. Se comparan las cinéticas de disociación de IFNα2-wt, HEQ, e IFNβ desde IFNAR1-EC controladas por TIRFS en la Fig. 1C. Se observó un aumento de 20 veces en la vida del complejo para HEQ en comparación con IFNα2, y cinéticas de disociación similares como para IFNβ (Tabla 3). En contraste, se obtuvieron constantes de velocidad de asociación muy similares para las tres especies. A partir de estos datos, se determinó una constante de disociación en equilibrio $K_D = 83$ nM para el complejo HEQ/IFNAR1-EC, se determinó una $K_D = 33$ nM para el complejo YNS/IFNAR1-EC, $K_D = 1,6$ mM para el complejo IFNα2-wt/IFNAR1-EC y $K_D = 66$ nM para el complejo IFNβ/IFNAR1-EC. La afinidad de unión de HEQ a IFNAR2-EC es similar a la medida para IFNα2-wt (5 nM), que es aproximadamente 10 veces más débil que la de IFNβ (Tabla 3). Por tanto, solamente la afinidad de HEQ hacia IFNAR1 es similar a IFNβ, pero no hacia IFNAR1.

15 IFN induce actividad biológica mediante la formación del complejo ternario (IFNAR1-IFN-IFNAR2) en una estequiometría 1:1:1. A causa de la unión cooperativa de las dos subunidades de receptor unidas a superficie, la afinidad de unión aparente al ligando es mayor que la unión a IFNAR2 en solitario, y depende de las concentraciones relativas y absolutas del receptor en superficie (Lamken, P. et al., 2004, J Mol Biol 341, 303-318). La estabilidad aumentada del complejo ternario mediante afinidad aumentada hacia IFNAR1 puede examinar mediante la cinética de disociación del ligando. Por lo tanto, la disociación de IFNα2 (SEC ID N° 2), HEQ (SEC ID N° 5), YNS (SEC ID N° 11), α8-tail (SEC ID N° 7) e IFNβ (SEC ID N° 3) se compararon a diferentes concentraciones de IFNAR1-EC e IFNAR2-EC a proporción estequiométrica. Para IFNβ, las mediciones se hicieron usando el mutante I47A en IFNAR2, que se une a IFNβ a una afinidad de 5 nM, similar a la de IFNα2 hacia wt-IFNAR2 (Tabla 3). Esto se presenta para comparar solamente el efecto de la concentración superficial de IFNAR1 sobre la disociación del ligando. Aunque para IFNα2, la cinética de disociación depende en gran medida de la concentración superficial del receptor, se observaron curvas de disociación solapantes para IFNβ y HEQ. Esto demuestra claramente la mayor estabilidad del complejo ternario formado con IFNβ y HEQ. Incluso a la concentración más alta de receptor (que está muy por encima de la concentración celular del receptor a 1000 receptores por célula), se observó disociación más rápida de IFNα2-de tipo silvestre que para IFNβ y HEQ a las concentraciones más bajas de receptor. Sin embargo, si se aumentan adicionalmente las concentraciones superficiales de receptor, finalmente IFNα2-wt se disocia a velocidades comparables a IFNβ o HEQ. La estabilidad del complejo ternario es una función combinada de las concentraciones superficiales de receptor y de las afinidades de unión hacia los receptores individuales. Asumiendo que la estabilidad del complejo ternario está relacionada con la actividad biológica, no es sorprendente que la activación diferencial de los IFN de unión más fuerte pueda secuestrarse en células con elevadas cantidades de receptor, de forma natural (como en células Daudi) o debido a transfección. Esto también destaca el peligro de transfectar células con receptores de superficie celular a niveles no nativos, una cuestión habitualmente ignorada.

Tabla 3: Constantes de velocidad y afinidades de la interacción de IFNα2 tipo silvestre, IFNβ y mutantes de IFNα2 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] | K_d [s ⁻¹] | K_D [nM] ^c |
| IFNα2 ^a | ~2·10 ⁵ | | 1500 | 1·10 ⁷ | 0,006 | 0,6 |
| IFNβ ^b | 3·10 ⁵ | 0,020 | 66 | 5·10 ⁷ | 0,0012 | 0,024 |
| HEQ ^a | 3·10 ⁵ | 0,025 | 83 | 1·10 ⁷ | 0,006 | 0,6 |
| YNS | 3·10 ⁵ | 0,01 | 33 | 1·10 ⁷ | 0,006 | 0,6 |
| α8-tail | | | | 7·10 ⁷ | 0,002 | 0,024 |

| | IFNAR1-EC | | | IFNAR2-EC | | |
|---|---|--------------------------|------------|--|--------------------------|-------------------------|
| | k_a [M ⁻¹ s ⁻¹] ^a | k_d [s ⁻¹] | K_D [nM] | k_a [M ⁻¹ s ⁻¹] | k_d [s ⁻¹] | K_D [nM] ^c |
| ^a mutante S136C marcado específicamente en el sitio con maleimida Oregon Green 488 | | | | | | |
| ^b marcado específicamente en el sitio con maleimida Oregon Green 488 en el resto C17 libre | | | | | | |
| ^c interacción con IFNAR2-EC I47A | | | | | | |

Ejemplo 5. Actividad antiviral y antiproliferativa de mutantes de IFN α 2: HEQ, MDL, α 8-tail e YNS

Se ha observado que la potencia antiviral de IFN β en células WISH es solamente 2 veces mayor en comparación con IFN α 2, mientras que su actividad antiproliferativa es aproximadamente 50 veces mayor. Las Fig. 4B-4C muestran las actividades antivirales y antiproliferativas de IFN α 2-wt, HEQ (SEC ID N° 5) e IFN β , medidas en células WISH. En este ensayo, el perfil de actividad de HEQ es comparable con el de IFN β . A pesar del gran aumento en la afinidad de unión de HEQ hacia IFNAR1, su potencia antiviral es solamente 2 veces mayor que la de IFN α 2 de tipo silvestre. Su actividad antiproliferativa está aumentada en ~25 veces en comparación con un aumento de 42 veces en la actividad antiproliferativa de IFN β (Tabla 4). La misma tendencia es también cierta para MDL (SEC ID N° 10) e YNS (SEC ID N° 11). Aunque su actividad antiviral es casi la de IFN α 2, su actividad antiviral es mucho mayor. MDL presenta el mismo nivel de actividad que IFN β , mientras que YNS presenta un nivel incluso mayor de actividad antiproliferativa. Las actividades antiproliferativas aumentadas están en consonancia con las afinidades aumentadas de estos dos IFN hacia IFNAR1. Como se ha indicado anteriormente, IFN β parece detener el crecimiento de forma más rápida en comparación con IFN α 2. Como resultado, el recuento celular después de aplicar elevadas concentraciones de IFN es más pequeño para IFN β . Este fenómeno no puede compensarse usando una concentración mayor de IFN α 2, pero es una diferencia cualitativa (Fig. 4B). En este aspecto, HEQ e YNS se comportan como IFN α 2-wt, y no como IFN β . La pendiente de la curva de titulación de HEQ (que se refiere al inicio dependiente de la concentración) está entre la de wt-IFN α 2 e IFN β .

Tabla 4: Actividades biológicas relativas de IFN α 2 tipo silvestre, mutantes e IFN β

| | Actividad anti-proliferativa | | | | Actividad antiviral | |
|-----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|
| | WISH | | MDA231 | | WISH | |
| | CE50 (nM) | Prop. frente a IFN α | CE50 (nM) | Prop. frente a IFN α | CE50 (pM) | Prop. frente a IFN α |
| IFN α | 2,0 | 1 | 0,7 | 1 | 0,6 | 1 |
| IFN β | 0,03 | 71 | 0,07 | 10 | 0,3 | 2,0 |
| YNS | 0,013 | 164 | 0,01 | 70 | 0,12 | 5,0 |
| MDL | 0,085 | 24 | | | 0,6 | 1,0 |
| HEQ | 0,06 | 35 | | | 0,3 | 2,0 |
| α 8-tail | 0,2 | 10 | | | 0,2 | 3,0 |

Ejemplo 6. Control de la activación génica usando tecnología de chip génico

Los chips génicos se han convertido en tecnología convencional para obtener información completa acerca de activación génica diferencial. De hecho, se han realizado varios estudios para investigar el perfil de expresión génica tras inducción con IFN (de Veer, M. J. et al., 2001, J Leukoc Biol. 69, 912-920). El efecto de los IFN sobre la expresión génica se controló por experimentos de microserie de oligonucleótidos aplicados puntualmente. Se trataron células WISH durante 16 horas con IFN α 2 0,3 nM; IFN α 2 3 nM (10.000 unidades); HEQ 0,3 nM e IFN β 0,15 nM (1.000 unidades). Las concentraciones se eligieron para producir >90% de una respuesta antiproliferativa (IFN α 2-wt- 3 nM, HEQ e IFN β) o por debajo del 10% de la respuesta antiproliferativa (IFN α 2-wt- 0,3 nM) en Células WISH. En cada condición, se realizó el experimento de tratamiento con IFN frente a sin tratamiento en duplicados de microserie de intercambio de colorante. Además, se usaron cuatro réplicas de experimentos de microserie que consistían en sin tratamiento frente a sin tratamiento como control adicional. La proporción normalizada entre los dos colores se adopta como el nivel de inducción. Los criterios elegidos para definir la lista de genes regulados por IFN se describe en la sección de Métodos.

Los resultados del chip génico pueden analizarse en una base por gen, o mirando las tendencias generales de la inducción génica. La Fig. 6 se ofrece para dar una visión global de las tendencias registradas para el cambio en los niveles de expresión de 395 genes regulados por IFN, 16 h después del tratamiento con IFN β (0,15 nM), HEQ e IFN α 2-wt (0,3 nM y 3 nM, respectivamente). En la Fig. 6A se representaron los niveles de expresión relativa (para sin tratamiento) de los 395 genes en orden ascendente de acuerdo con el factor de cambio. Los puntos negros son del chip de control, que contenía una mezcla de solamente muestras no tratadas en ambos canales de color. Esto proporciona una estimación de la fluctuación aleatoria esperada. Los cambios mínimo y máximo en el nivel de expresión registrado para el chip de control fueron 0,65 y 1,6 veces, siendo la proporción entre los dos canales solamente de 0,75 y 1,4 veces para el máximo del 95% de los genes. El bajo nivel de fluctuación aleatoria en la expresión génica proporciona un elevado nivel de confianza en la calidad de los datos. En general, los niveles de expresión génica son similares para IFN β (0,15 nM) y HEQ (0,3 nM) (Fig. 6A), mientras que se registró un niveles

muy inferior de inducción para IFN α 2-wt (0,3 nM). La inducción génica tras la adición de IFN α 2-wt 3 nM está entre los niveles registrados para IFN α 2-wt (0,3 nM) e IFN β (0,15 nM) o HEQ (0,3 nM). Un modo alternativo para analizar los niveles de expresión diferencial es representar la proporción de cambio en la activación génica entre los diferentes tratamientos (Fig. 6B). Como IFN β inducía el mayor cambio, todos los demás valores se calcularon con relación a la inducción de IFN β . El control es el mismo que en la Fig. 6A. De nuevo, parece que IFN β y HEQ inducen el mismo nivel de cambio para todos los genes (la línea verde sigue a la línea negra que es el control). Esto significa que no un único gen se comporta de forma significativamente diferente tras la inducción con IFN β frente a HEQ. Este resultado remarcable muestra cómo de similares son estos IFN. La mayor expresión diferencial se halla entre IFN β e IFN α 2-wt (0,3 nM). De nuevo, los resultados para IFN α 2-wt (3 nM) están en entre los registrados para IFN α 2-wt (0,3 nM) y HEQ.

El análisis de grupo de los genes inducidos por IFN para los cuatro tratamientos se hizo para dar una verificación independiente de los resultados presentados de forma gráfica en las Fig. 6A y 6B. La Fig. 6C muestra que los perfiles de expresión génica de IFN β y HEQ se agrupan juntos, con una distancia muy corta entre ellos. El perfil de expresión de células tratadas con IFN α 2-wt 3 nM se agrupa cerca, mientras que el perfil de expresión génica de IFN α 2-wt 0,3 nM está muy lejos. El perfilado de expresión génica está en excelente concordancia con la actividad biológica diferencial observada entre IFN β e IFN α 2, y de nuevo demuestra que HEQ es un IFN α 2 con todas las características de IFN β .

Los chips génicos proporcionan conocimientos detallados de los niveles de expresión de los genes individuales que comprenden el genoma. Uno de los aspectos más interesantes de analizar el perfil de expresión génica de IFN β frente a IFN α 2-wt es investigar la activación diferencial, y la relación entre la activación diferencial y la concentración de IFN (Der, S. D., et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A 95, 15623- 15628). De los 395 genes inducidos, se seleccionaron 59 genes regulados positivamente y 9 regulados negativamente de acuerdo con su nivel diferencial de activación entre los diferentes tratamientos (Jaitin et al., 2006, Mol Cell Biol 26 (5): 1888-1897, Tabla 3).

El efecto sobre la expresión de IFN β y HEQ (SEC ID N° 5) sobre la mayoría de los genes fue mucho más fuerte que el efecto inducido por IFN α 2 a concentraciones equivalentes de actividad antiviral, es decir, 0,15 y 0,3 nM, respectivamente, incluyendo muchos genes no influidos por IFN α 2 a la concentración 0,3 nM.

Ejemplo 7. Modelo de prevención de tumor MDA231

Para establecer tumores subcutáneos (s.c.), se cultivaron células MDA231 *in vitro* hasta un 70% de confluencia, se trataron con tripsina y se suspendieron en PBS a una concentración de 10⁸ células/ml, y se inyectaron 10⁷ células s.c. en el costado de un ratón desnudo. Los ratones después se asignaron aleatoriamente y se separaron en 3 grupos de tratamiento de 6 animales por grupo. El régimen de tratamiento comenzó en el día 1 y continuó hasta el día 34. Se inyectó s.c. a los ratones PBS o un tratamiento específico dos veces a la semana durante 34 días. Después de 34 días de tratamientos, los animales se sacrificaron, se escindieron los tumores y se determinó el tamaño del tumor. Los resultados se resumen en la Tabla 5. Los resultados demuestran claramente que en concordancia con los experimentos de cultivo tisular, YNS es muy eficaz en suprimir el crecimiento de células cancerosas de mama MDA231 *in vivo*. Después de 34 días de tratamiento con YNS todos los ratones tratados con YNS estaban limpios de bultos, mientras que cinco de los seis ratones tratados con IFN α 2 y los seis ratones tratados con PBS tenían bultos de tamaño variable.

Tabla 5: Los resultados del modelo de prevención de tumor MDA231

| Tratamiento | PBS | | | | IFN α 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 |

Se inyectó a los ratones células MDA231 en el día cero, seguido de inyecciones de 20 mg/ratón de los diferentes tratamientos en los momentos indicados. Se trataron seis ratones para cada condición experimental. El crecimiento del tumor se estimó visualmente para todos salvo el día 34. En el último día (34) se sacrificaron los ratones, y se extrajo y midió el tumor. L, M, S y N representan el tamaño del tumor (en paréntesis está el diámetro medido en el día 34), L - grande (>5 mm), M - medio (2,5-5 mm), S - pequeño (<2,5 mm), N - ninguno.

Ejemplo 8. Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), también conocida como encefalomiелitis alérgica experimental, es un modelo animal de esclerosis múltiple (MS). Se conocen diversos modelos de EAE en la técnica, dependiendo del método de inducción, la cepa del animal y el antígeno empleado para inducir la enfermedad. EAE es una enfermedad autoinmune recidivante aguda o crónica, adquirida, inflamatoria y desmielinizante. Diferentes formas de EAE se parecen mucho a diversas formas y fases de MS.

En el presente estudio, EAE se induce por inyección de proteína básica de mielina (MBP), un método conocido para el modelo de la fase aguda de MS. En este modelo la aparición de la enfermedad se observa por la aparición de síntomas clínicos aproximadamente 10 días después de la inducción. La enfermedad progresa y aumenta el valor clínico y alcanza el máximo aproximadamente en el día 15 y se observa recuperación espontánea aproximadamente en el día 23 después de la inducción de la enfermedad.

Sin inyecta s.c. a ratas Lewis hembra (peso corporal promedio 130-180 g, Harlan, Israel) en las patas posteriores 25 µg de proteína básica de mielina de cobaya purificada (MBP, Sigma) emulsionada en 0,1 ml de adyuvante completo de Freund (Difco). Los animales se mantienen en un régimen de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, a una temperatura constante de 22°C, con alimento y agua *ad libitum*. Empezando desde el día 8 después de la inducción, se hace un seguimiento de los animales en una base diaria. Los resultados se registran como valor clínico; un valor de 0 indica un animal normal sin signos clínicos, 0,5 indica una pérdida de tonicidad en la parte distal de la cola, 1 indica parálisis completa de la cola, 1,5 indica debilidad en una pata posterior, 2 indica debilidad en ambas patas posteriores, 2,5 indica en una pata anterior, 3 indica parálisis en las cuatro patas, 4 indica parálisis completa del cuerpo y estado moribundo y 5 indica muerte. El valor clínico de los animales se registra durante ~15 días después de la aparición de la enfermedad hasta el final del estudio 25 días después de la inducción y se calcula el área bajo la curva (AUC) durante este periodo de tiempo.

Los animales que muestra síntomas de la enfermedad, que podrían valorarse clínicamente entre 0,5 y 1, se tratan con composiciones de HEQ (SEC ID N° 5), YNS (SEC ID N° 11) o control de vehículo durante tres días consecutivos partiendo desde la aparición de la enfermedad (~ en el día 9-11 después de la inducción de la enfermedad). Se evalúan varias vías de administración, por ejemplo, intravenosa (en vehículo) u oral por sonda (en vehículo) a una dosis volumétrica de 5 ml/kg. En el último día del estudio (aproximadamente el día 25) se sacrifica a los animales con pentobarbitona sódica 100 mg/kg i.p.

Los resultados se expresan como la media ± SEM y las diferencias entre los grupos de tratamiento se analizaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido de ensayo post hoc de Tukey. Un valor de p<0,05 se considera estadísticamente significativo y se indica en la figura por un asterisco sobre el grupo de tratamiento relevante.

La validez del modelo se establece usando metilprednisolona como control positivo. Cuando el esteroide se administra diariamente durante 5 días consecutivos i.v. a 30 mg/kg partiendo del día de inducción de la enfermedad por inyección de MBP, se presentaba una reducción del 34% en el AUC.

Ejemplo 9. Un modelo animal de lupus sistémico eritematoso (SLE)

Ratones híbridos hembra (NZB X NZW)_{F1} (mencionados a partir de ahora como "ratones NZB/W") desarrollan espontáneamente una enfermedad tipo lupus caracterizada por la presencia de autoanticuerpos séricos contra ADN bicatenario (ADNbc). Estos ratones, que finalmente experimentan fallo renal total, a menudo se usan como modelo para la experimentación dirigida a comprender mejor y tratar el lupus en seres humanos. Con el tiempo, esta afección en ratones NZB/W progresa hasta mala función renal manifestada por la aparición de proteinuria.

Se usan ratones NZB/W hembra de 32 semanas de edad en un experimento para determinar si NLYY (SEC ID N° 6) podría retardar el desarrollo de enfermedad tipo lupus. Los ratones se dividen en dos grupos, y cada grupo se trata en días alternos con NLYY (grupo de 10 ratones) o IgG de rata como control (grupo de 10 ratones), administrado por inyección intraperitoneal. Los tratamientos se continúan durante cinco semanas, y los ratones se evalúan semanalmente para la presencia de proteinuria.

Lista de secuencias

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd.

<120> MUTANTES DE INTERFERÓN ALFA 2 (IFN ALFA 2) RECOMBINANTE

<130> N3297 EP S3

<140> EP 06 75 6232.2

<141> 28-06-2006

ES 2 436 761 T3

<150> US 60/694.810
 <151> 29-06-2005

<160> 35

5

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 166

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 165

15

<210> 2

<211> 165

<212> PRT

ES 2 436 761 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

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 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

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

5

<210> 3

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 3

Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys

ES 2 436 761 T3

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
 20 25 30

Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
 35 40 45

Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Glu Glu Ser Asp Arg
 50 55 60

Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys
 65 70 75 80

Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys
 85 90 95

Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp
 100 105 110

Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln
 115 120 125

Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro
 130 135 140

Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly
 145 150 155 160

Arg Arg Ala Ser Gln
 165

- <210> 5
- <211> 165
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <221> Fuente
- 10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Triple mutante H57A, E58A, Q61A de IFNalfa2[~]
- <400> 5

ES 2 436 761 T3

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 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

<210> 6
 <211> 165
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente

10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A de IFNalfa2~

<400> 6

ES 2 436 761 T3

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 Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

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

Leu Asp Lys Phe Ala Thr Glu Leu Ala 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

<210> 7

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<221> Fuente

10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Mutante con sustitución del extremo C terminal ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalfa2~

<400> 7

ES 2 436 761 T3

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 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

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 Lys Arg

145 150 155 160

Leu Lys Ser Lys Glu
 165

- <210> 8
- <211> 165
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <221> Fuente
- 10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Triple mutante H57A, E58A, Q61A con sustitución del extremo C terminal ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalfa2~
- <400> 8

ES 2 436 761 T3

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 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 Lys Arg
 145 150 155 160

Leu Lys Ser Lys Glu
 165

<210> 9

<211> 165

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A con sustitución del extremo C terminal ESLRSKE a KRLKSKE de IFN α 2 \bar{c}

<400> 9

ES 2 436 761 T3

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 Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

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

Leu Asp Lys Phe Ala Thr Glu Leu Ala 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 Lys Arg
 145 150 155 160

Leu Lys Ser Lys Glu
 165

<210> 10
 <211> 165
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente

10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Triple mutante H57M, E58D, Q61L de IFNalfa2~

<400> 10

ES 2 436 761 T3

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 Met Asp Met Ile Leu 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

<210> 11

<211> 165

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Triple mutante H57Y, E58N, Q61S de IFNalfa2~

<400> 11

ES 2 436 761 T3

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

<210> 12
 <211> 165
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente

10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Triple mutante H57M, E58D, Q61I con sustitución del extremo C terminal ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalfa2~

<400> 12

ES 2 436 761 T3

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 Met Asp Met Ile Leu 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 Lys Arg
 145 150 155 160

Leu Lys Ser Lys Glu
 165

<210> 13
 <211> 165
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente

10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Triple mutante H57Y, E58N, Q61S con sustitución del extremo C terminal ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalfa2~

<400> 13

ES 2 436 761 T3

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 Lys Arg
 145 150 155 160

Leu Lys Ser Lys Glu
 165

<210> 14
 <211> 69
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente

10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN mutada del triple mutante H57A, E58A, Q61A de IFNalfa2~

<400> 14

ES 2 436 761 T3

tgtgatctgc ogcagaactca ctctctgggt tctcgtcgtta ctctgatgcl gctggetcag 60

atgcgctcgt 69

5 <210> 15
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del triple mutante H57A, E58A, Q61A de IFNalfa2~

<400> 15
 atgtgtgac tgccgcagac tcaactctctg ggtctctcgtc gtactctgat gctgctgget 60

cagatgcgtc gtatctctct tttctcctgc tgaaggaca gacatgactt tggatttccc 120

caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct cgtcgcgatg 180

atcgcgcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240

ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg 300

atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggaactccat tctggctgtg 360

aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag ccttgtgccc 420

tgggaggttg tcagagcaga aatcatalgaga tcttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa 480

agtttaagaa gtaaggaalg a 501

15 <210> 16
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A de IFNalfa2~

25 <400> 16

ES 2 436 761 T3

```

atgtgtgata tgccgcagac tcactctctg ggttctctgc gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgtc gtatctctct tttctctctg ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ccatgagatg      180
atccagcaga tcttctctct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
gccttagaca aattcgccac tgaactcggc cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc      420
tgggagggtg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa      480
agtttaagaa gtaaggaatg a                                             501

```

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

5

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del mutante con sustitución del extremo C terminal ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalfa2~

10

<400> 17

```

atgtgtgata tgccgcagac tcactctctg ggttctctgc gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgtc gtatctctct tttctctctg ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ccatgagatg      180
atccagcaga tcttcaatct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
ctcttagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc      420
tgggagggtg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaaaaa      480
aggttaaaaa glaaggaatg a                                             501

```

15

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

20

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del triple mutante H57A, E58A, Q61A con sustitución del extremo C terminal ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalfa2~

25

ES 2 436 761 T3

<400> 18

```

atgtgtgata tgccgcagac tcactctctg ggttctctgc gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgtc gtatctctct tttctctctg ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tcctgtcct cgetgcgatg      180
atcgcgcaga tcttcaatct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
ctcctagaca aaltctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc      420
tgggagggtg tcagagcaga aatcatgaga tcttttctt tgtcaacaaa cttgcaaaaa      480
aggttaaaaa gtaaggaatg a                                             501

```

<210> 19

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

<220>

10 <221> Fuente
<223> /nota=Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A con sustitución del extremo C terminal ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalfa2~

<400> 19

```

atgtgtgata tgccgcagac tcactctctg ggttctctgc gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgtc gtatctctct tttctctctg ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tcctgtcct ccatgagatg      180
atccagcaga tcttctctct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
gccctagaca aattctccac tgaactctgc cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc      420
tgggagggtg tcagagcaga aatcatgaga tcttttctt tgtcaacaaa cttgcaaaaa      480
aggttaaaaa gtaaggaatg a                                             501

```

<210> 20

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

<220>

25 <221> Fuente
<223> /nota=Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del triple mutante H57M, E58D, Q61I de IFNalfa2~

ES 2 436 761 T3

<400> 20

```

atgtgtgata tgcgcagac tcactctctg ggttctctgc gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgtc glatctctct tttctctctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
caggaggagt tlggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tcctgtcct catggatatg      180
atcctacaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
aggaataact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccllgtgcc      420
tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctlllctct tgtcaacaaa cttgcaagaa      480
agtttaagaa gtaaggaatg a                                             501

```

5 <210> 21
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del triple mutante H57Y, E58N, Q61S de IFNalfa2~

15 <400> 21

```

atgtgtgata tgcgcagac tcactctctg ggttctctgc gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgtc gtatctctct tttctctctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
caggaggagt tlggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tcctgtcct ctataacatg      180
atctctcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
aggaataact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccctgtgcc      420
tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctlllctct tgtcaacaaa cttgcaagaa      480
agtttaagaa gtaaggaatg a                                             501

```

20 <210> 22
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del triple mutante H57M, E58D, Q61I con sustitución del extremo C terminal ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalfa2~

ES 2 436 761 T3

<400> 22

```

atgtgtgalc tgcgcagac tcaactctctg ggttctctgctc gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgctc gtatctctct tttctctctgc ttgaaggaca gacatgaactt tggatttccc      120
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct catggatatg      180
atcctacaga 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 ccttltgtgcc      420
tgggagggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaaaaa      480
aggtlaaaaa gtaaggaatg a                                                    501

```

5

<210> 23
<211> 501
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<221> Fuente
<223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del triple mutante H57Y, E58N, Q61S con sustitución del extremo C terminal ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalfa2~

15

<400> 23

```

atglgtgato tgcgcagac tcaactctctg ggttctctgctc gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgctc gtatectctct tttctctctgc ttgaaggaca gacatgaactt tggatttccc      120
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ctataacatg      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 ccttltgtgcc      420
tgggagggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaaaaa      480
aggttaaaaa gtaaggaatg a                                                    501

```

20

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

25

<220>
<221> Fuente
<223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Mutante H57A de IFNalfa2~

ES 2 436 761 T3

<400> 24

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 Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

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

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

- 5 <210> 25
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <221> Fuente
- <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Mutante E58A de IFNalfa2~

<400> 25

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

15

ES 2 436 761 T3

```

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 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

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

```

```

5 <210> 26
   <211> 165
   <212> PRT
   <213> Artificial

```

```

10 <220>
    <221> Fuente
    <223> /nota==Descripción de secuencia artificial: Mutante Q61A de IFNalfa2~

```

```

<400> 26

```

ES 2 436 761 T3

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

- <210> 27
- <211> 165
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <221> Fuente
- 10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Mutante H57Y de IFNalfa2~
- <400> 27

ES 2 436 761 T3

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 Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

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

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

<210> 28
 <211> 165
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente
 10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Mutante E58N de IFNalfa2~

<400> 28

ES 2 436 761 T3

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 Asn 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

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

<210> 29
 <211> 165
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente

10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: Mutante Q61S de IFNalfa2~

<400> 29

ES 2 436 761 T3

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 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

- <210> 30
- <211> 501
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- <221> Fuente
- 10 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del mutante H57A de IFNalfa2~
- <400> 30

ES 2 436 761 T3

alghtgtgale tgecgcagac teactctctg ggttctctgto gtactctgat gctgctggct 60
 cagatgcgto gtatctctct tttctctctg ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc 120
 caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct cgtgagatg 180
 atccagcaga tcttcaatct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
 ctctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg 300
 atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg 360
 aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc 420
 tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tcttttctt tgtcaacaaa ctgcaagaa 480
 agtttaagaa gtaaggaatg a 501

5 <210> 31
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del mutante E58A de IFNalfa2~

<400> 31
 atgtgtgate tgecgcagac teactctctg ggttctctgto gtactctgat gctgctggct 60
 cagatgcgto gtatctctct tttctctctg ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc 120
 caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ccatgagatg 180
 atccagcaga tcttcaatct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
 ctctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg 300
 atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg 360
 aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc 420
 tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tcttttctt tgtcaacaaa ctgcaagaa 480
 agtttaagaa gtaaggaatg a 501

15 <210> 32
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del mutante Q61A de IFNalfa2~

25 <400> 32

ES 2 436 761 T3

```

atgtgtgata tgccgcagac tcaactctctg ggttctctgct gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgctc gtatctctct tttctctctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tcctgtctct ccatgagatg      180
atcgcgcaga tcttcaatct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccctgtgcc      420
tgggagggtg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa      480
agtttaagaa gtaaggaatg a                                                    501

```

5 <210> 33
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del mutante H57Y de IFNalfa2~

```

<400> 33
atgtgtgata tgccgcagac tcaactctctg ggttctctgct gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgctc gtatctctct tttctctctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tcctgtctct ccatgagatg      180
atccagcaga tcttcaatct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccctgtgcc      420
tgggagggtg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa      480
agtttaagaa gtaaggaatg a                                                    501

```

15 <210> 34
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del mutante E58N de IFNalfa2~

<400> 34

ES 2 436 761 T3

```

atgtgtgata tgccgcagac tcaactctctg ggttctctgtc gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgctc gtatctctctt tttctctctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ccaaacatg      180
atccagcaga tcttcaatct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
atcacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag ccttgtgccc      420
tgggagggttg tcagagcaga aatcatgaga tcttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa      480
agtttaagaa gtaaggaatg a                                          501

```

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

5

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=~Descripción de secuencia artificial: secuencia de ADN del mutante Q61S de IFNalfa2~

10

```

<400> 35
atgtgtgata tgccgcagac tcaactctctg ggttctctgtc gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgctc gtatctctctt tttctctctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ccatgagatg      180
atctctcaga tcttcaatct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
atacagggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag ccttgtgccc      420
tgggagggttg tcagagcaga aatcatgaga tcttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa      480
agtttaagaa gtaaggaatg a                                          501

```

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN seleccionada entre el grupo que consiste en la SEC ID N° 15 y la SEC ID N° 18.
- 5 2. El polipéptido mutante de interferón $\alpha 2$ (IFN $\alpha 2$) codificado por una molécula de ADN de la reivindicación 1.
3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho polipéptido está adicionalmente conjugado con PEG.
- 10 4. Un vector que comprende la molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, unida de forma funcional a uno o más elementos de control de la transcripción.
5. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 4.
- 15 6. Una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, que opcionalmente comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3 para su uso como agente terapéutico.
- 20 8. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer, donde dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en leucemia de células capilares, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, leucemia mielogénica crónica, linfoma no Hodgkin y melanoma.
- 25 9. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer, donde dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en leucemia de células capilares, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, leucemia mielogénica crónica, linfoma no Hodgkin y melanoma.
- 30 10. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de esclerosis múltiple (MS).
11. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3 para su uso en el tratamiento o prevención de esclerosis múltiple (MS).
- 35 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 o el polipéptido para su uso en el tratamiento o prevención de esclerosis múltiple (MS) de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicha MS se selecciona entre el grupo que consiste en MS recidivante remitente, MS progresiva secundaria, MS progresiva primaria, y MS recidivante progresiva.
- 40 13. Uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de infección por virus de la hepatitis.
- 45 14. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3 para su uso en el tratamiento o prevención de infección por virus de la hepatitis.
- 50 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 13 o el polipéptido para su uso en el tratamiento o prevención de infección por virus de la hepatitis de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho virus de la hepatitis se selecciona entre el grupo que consiste en hepatitis A, hepatitis B y hepatitis C.

50

55

60

65

Figura 1

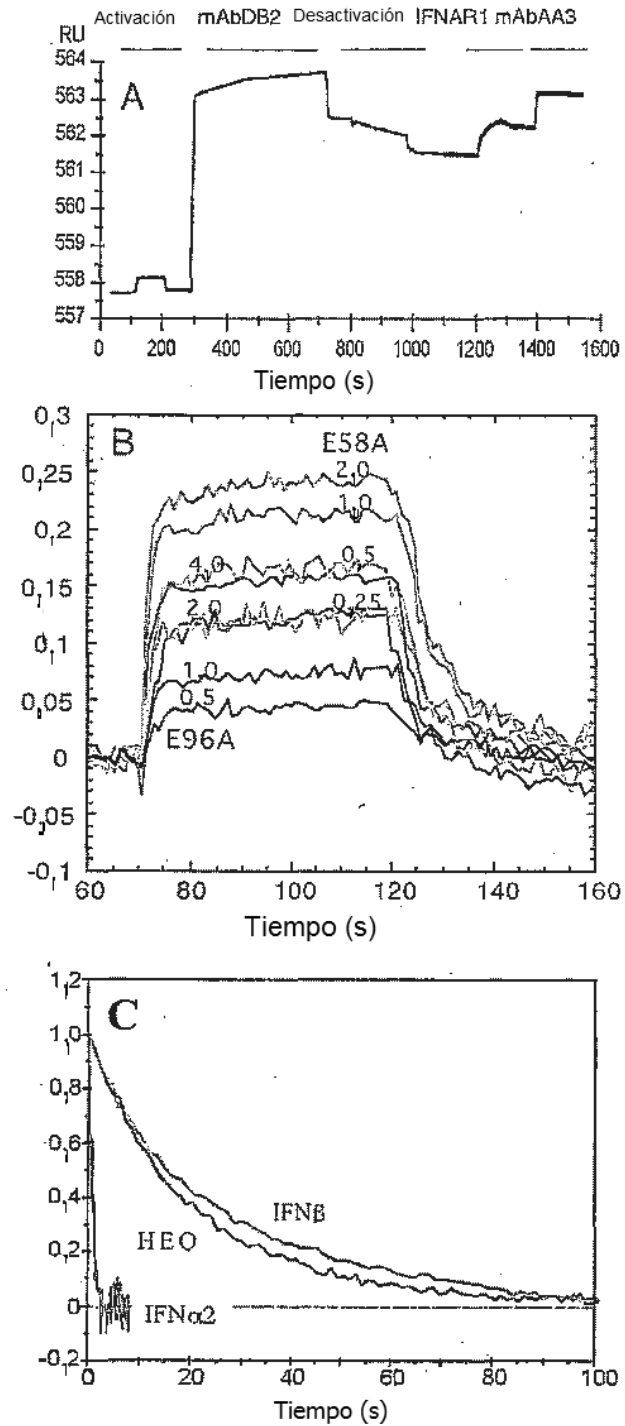


Figura 2

```

Receptor          2          22  22222
IFNa2  1  --CDLPQTHSLGSRRTLMMLLAQMR-KISLFSCLKDRHDFGFPOEEF-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.....QA.SAF
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  HEMIQIIFNLFSTKDSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIOGVGVTTETPLMKEDSI
IFNa5  58  .V..T.....V...R...L.....M.E.W.GG...N...
IFNa13 58  .L...T...T.....D.....C.....M.EER.G...NA...
IFNa1   58  .T...T.....T.EQS..E..S..N.....E..E...NV...
IFNa21 58  .T...T.....T.EQS..E..S..N.....M...E..E...NV...
IFNa4   58  .T...T.....E...EQS..E..S.....E..E...NV...
IFNa7   58  .T...T.....E...EQS..E..S.....E..E...N..F..
IFNa10 58  .T...T.....E...EQS..E..S.....E..E...N...
IFNa14 58  .M..T.....N.....E..I.F.M.....E..E...N...
IFNa16 58  .T...T.....I..F.....T.E..E.IA..N...
IFNa8   58  .T...T.....L...E..I..D.....S.M.E..I.S..Y...
IFNo    58  .I...S..H.ER...NM...QIH.G.H...QH..T.LL.V..EG.SAGAISSPA
IFNβ    59  Y..I..N..AI.RODS..TG.N..IVENLLANV.H.I.H.KTVLEEKLEKEDPTRG.LM.S
    
```

```

Receptor          -  -  -  -  -  -  -  ++  +
          2          2  222  22  22222
IFNa2  117  LAVRKYFORITLTLKKEKYSKAWVEVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE-----
IFNa5   118  .....T.....S.R...R..R..-----
IFNa13  118  ...K..R.....T.....L.....R..R..-----
IFNa1   118  ...K.....T.....KIF..R..R..-----
IFNa21  118  ...K.....T.....KIF..R..R..Z-----
IFNa4   118  .....T.....L.F....KR..R..D-----
IFNa7   118  .....M.....F.....-----
IFNa10  118  .....I.R.....L.F....KR..R..-----
IFNa14  118  ...K.....M.....F....KR..R..-----
IFNa16  118  .....MG.....F....KG..R..-----
IFNa8   118  .....T.....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.YFINR.TGY..N-----
    
```

Figura 3A

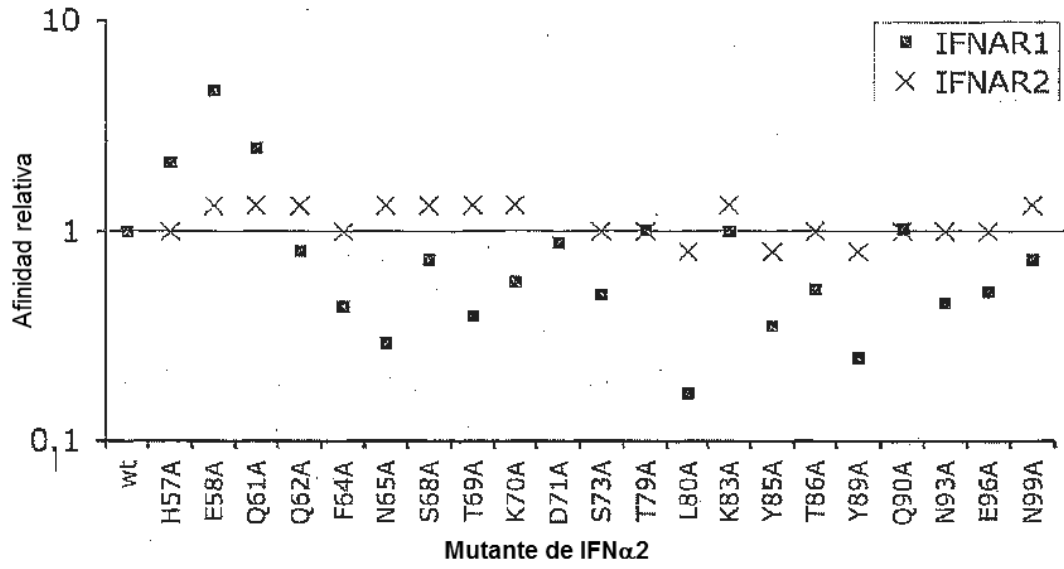


Figura 3B

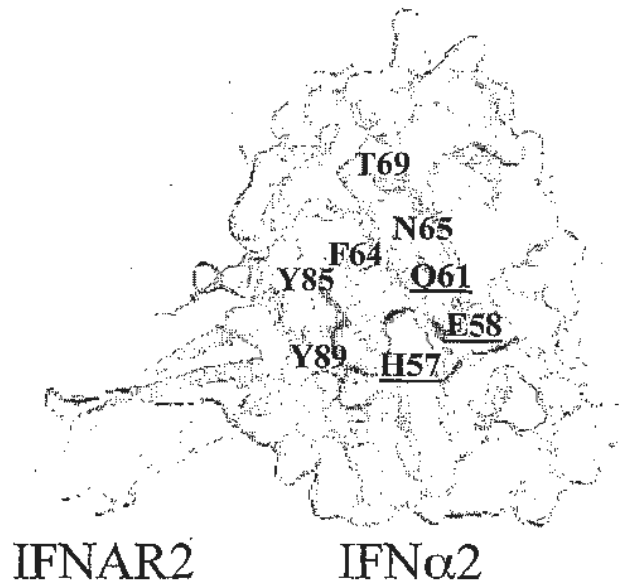


Figura 4

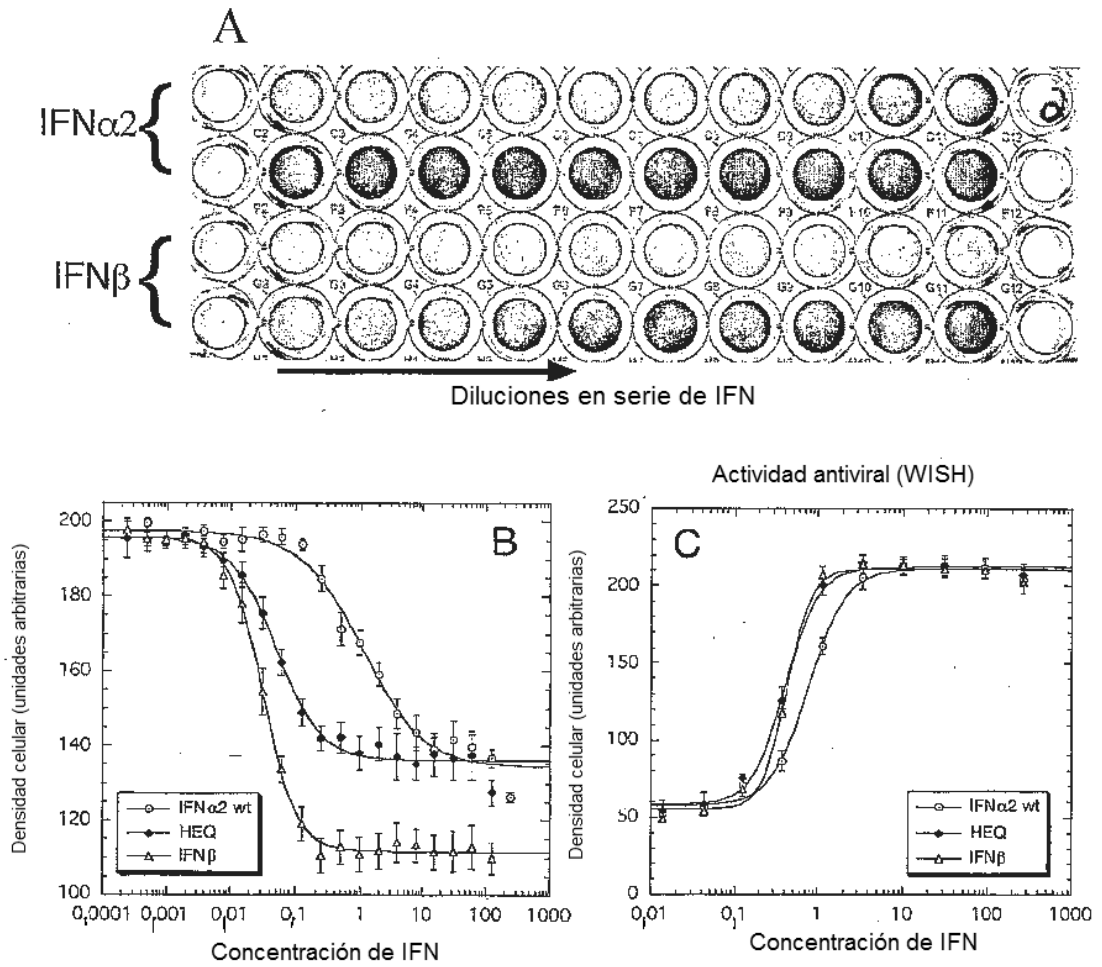


Figura 5

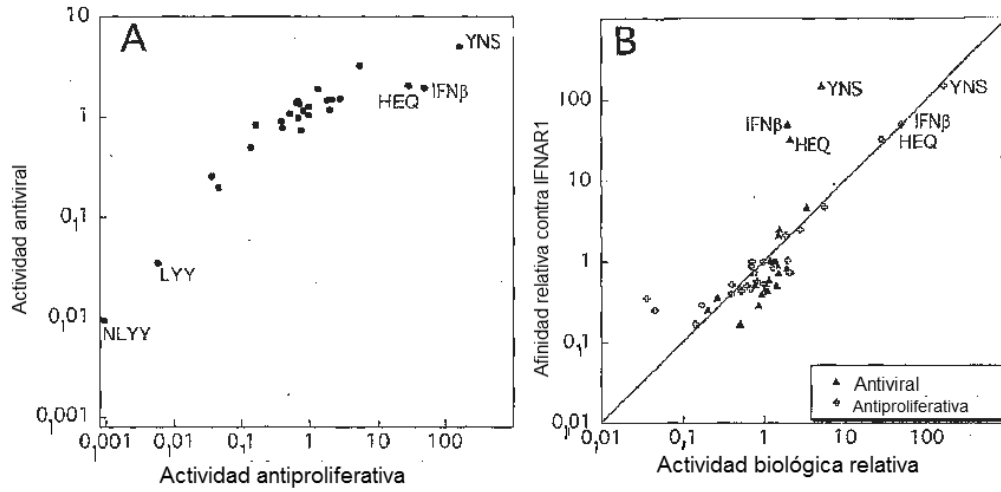


Figura 6

