

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 772**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.1999 E 06003415 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 1656952**

54 Título: **Conjugados de polialquilenglicol de interferón beta-1a y sus usos**

30 Prioridad:

16.10.1998 US 104572 P

16.02.1999 US 120161 P

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

12.03.2014

73 Titular/es:

**BIOGEN IDEC MA INC. (100.0%)
14 CAMBRIDGE CENTER
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142, US**

72 Inventor/es:

**PEPINSKY, BLAKE;
RUNKEL, LAURA;
BRICKELMAIER, MARGOT;
WHITTY, ADRIAN y
HOCHMAN, PAULA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 447 772 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de polialquilenglicol de interferón beta-1a y sus usos

Antecedentes de la invención

5 El uso de polipéptidos y proteínas para el tratamiento sistémico de enfermedades específicas está bien aceptado actualmente en la práctica médica. El papel que juegan estas sustancias en la terapia es tan importante que muchas actividades investigadoras se están dirigiendo hacia la síntesis de grandes cantidades mediante técnicas de ADN recombinante. Muchos de estos polipéptidos son moléculas endógenas que son muy potentes y específicas al desencadenar sus acciones biológicas.

10 Un factor importante que limita la utilidad de estas sustancias proteicas para su aplicación deseada es que, cuando se administran de forma parenteral, se eliminan del cuerpo en un corto periodo de tiempo. Esto puede ocurrir como resultado del metabolismo de proteasas o por el aclaramiento, que usa rutas normales para la eliminación de proteínas tales como la filtración en los riñones. La vía de administración oral de estas sustancias es incluso más problemática, porque, además de la proteólisis en el estómago, la elevada acidez del estómago las destruye antes de que alcancen su tejido de destino. Los problemas asociados con estas vías de administración de proteínas se conocen bien en la industria farmacéutica, y se están usando diversas estrategias en intentos para resolverlas.

15 Se han publicado muchos trabajos que se ocupan de la estabilización de proteínas. Se conocen diversas formas de conjugar proteínas con materiales poliméricos, que incluyen el uso de dextranos, polivinilpirrolidonas, glucopéptidos, polietilenglicol y poliaminoácidos. Se ha informado que los polipéptidos conjugados resultantes mantienen sus actividades biológicas y la solubilidad en agua para aplicaciones parenterales.

20 Una familia de péptidos que ha sido el centro de mucho trabajo clínico y esfuerzos para mejorar su administración y bioasimilación son los interferones. Los interferones se han ensayado en una diversidad de enfermedades clínicas. El uso de interferón beta humano, un miembro de esa familia, es el mejor establecido en el tratamiento de esclerosis múltiple. Recientemente se ha autorizado la comercialización de dos formas de interferón beta recombinante en Europa y EE.UU. para el tratamiento de esta enfermedad. Una forma es interferón-beta-1a (denominado comercialmente y vendido como AVONEX[®], fabric. Biogen, Inc., Cambridge, MA) y en lo sucesivo "interferón-beta-1a" o "IFN-beta-1a" o "IFN-β-1a" o "interferón-β-1a", usados de forma intercambiable. La otra forma es interferón-beta-1b (denominado comercialmente y vendido como BETASERON[®], Berlex, Richmond, CA), en lo sucesivo, "interferón-beta-1b". Interferón-beta-1a se produce en las células mamíferas usando la secuencia del gen humano natural y está glicosilado, mientras interferón-beta-1b se produce en bacterias *E. coli* usando una secuencia modificada del gen humano que contiene una sustitución de cisteína a serina introducida mediante ingeniería genética en la posición del aminoácido 17 y no está glicosilado.

35 Previamente, se han comparado directamente las potencias *in vitro* relativas de interferón-beta-1a e interferón beta 1b en análisis funcionales y se ha demostrado que la actividad específica de interferón-beta-1a es aproximadamente 10 veces mayor que la actividad específica de interferón-beta-1b (Runkel et al., 1998, Pharm. Res. 15: 641-649). A partir de estudios diseñados para identificar la base estructural de estas diferencias de actividad, se ha identificado la glicosilación como la única de las diferencias estructurales conocidas entre los productos que afecta a la actividad específica. El efecto del hidrato de carbono se manifiesta en gran medida por medio de su papel estabilizante de la estructura. El efecto estabilizante del hidrato de carbono fue evidente en experimentos de desnaturalización térmica y análisis SEC. La falta de glicosilación también se correlacionó con un incremento en la agregación y una sensibilidad incrementada a la desnaturalización térmica. La eliminación enzimática del hidrato de carbono de interferón-beta-1a con PNGasa F provocó la precipitación considerable del producto desglucosilado.

40 Estos estudios indican que, a pesar de la conservación de secuencias entre interferón-beta-1a e interferón-beta-1b, son entidades bioquímicas distintas, y por lo tanto gran parte de lo que se sabe sobre interferón-beta-1b no se puede aplicar a interferón-beta-1a, y viceversa.

45 El documento WO 87/00056 describe conjugados entre un homopolímero de polietilenglicol o un polioli polioxielido, y un interferón-beta (véase el resumen, página 13, líneas 15-35). En este documento no se prevé la combinación específica de un interferón-beta 1a, su acoplamiento con el polímero anteriormente mencionado en el extremo N-terminal y por medio de una unión obtenible mediante una alquilación reductora.

50 Katre N. V. (Advanced Drug Delivery Reviews, 10 (1993), 91-114) describe el acoplamiento selectivo de restos de polialquilenglicol en el extremo N-terminal de proteínas diferentes de los interferones.

Sumario de la invención

55 Se han aprovechado las ventajas del interferón-beta glicosilado respecto de las formas sin glicosilar. En particular, se ha desarrollado una composición de interferón-beta-1a con actividad incrementada respecto de interferón-beta-1b, y que también tiene las propiedades convenientes de las proteínas pegiladas en general sin pérdida efectiva de actividad comparado con las formas de interferón-beta-1a que no están conjugadas. Así, si se hacen modificaciones de tal forma que los productos (conjugados de polímero-interferón-beta 1a) mantienen todas o casi todas sus

actividades biológicas, pueden darse como resultado las siguientes propiedades: farmacocinética y farmacodinámica alteradas que llevan a una semivida incrementada y a alteraciones en la distribución tisular (p.ej., capacidad para permanecer en la vasculatura durante períodos de tiempo más largos), estabilidad incrementada en disolución, inmunogenicidad reducida, protección de la digestión proteolítica y de la supresión posterior de la actividad. Tal formulación es un avance sustancial en las técnicas farmacéutica y médica, y haría una contribución significativa al tratamiento de diversas enfermedades en las que el interferón tiene cierta utilidad, tales como esclerosis múltiple, fibrosis, y otras enfermedades inflamatorias o autoinmunes, cánceres, hepatitis y otras enfermedades víricas. En particular, la capacidad para permanecer durante períodos de tiempo más largos en la vasculatura permite que se use interferón-beta-1a para inhibir la angiogénesis y potencialmente atravesar la barrera hematoencefálica. Además, la estabilidad térmica adquirida creando conjugados de polímero-interferón-beta-1a es una ventaja cuando se formula interferón-beta-1a en forma de polvo para uso en la administración posterior por medio de inhalación.

Se usó el conocimiento de la estructura cristalográfica de interferón-beta-1a y se desarrolló un conjugado de interferón-beta-1a-polímero en el que el polímero está unido a el/los sitio(s) de interferón-beta-1a que permitirá(n) que el conjugado mantenga la actividad completa del interferón-beta-1a comparado con el interferón-beta-1a que no está conjugado.

Un caso de la descripción es un complejo de interferón-beta-1a conjugado, en el que el interferón-beta-1a está unido de forma covalente a un polímero que incorpora como parte integral suya un polialquilenglicol.

En un caso particular, la presente descripción se refiere a una composición de interferón-beta-1a fisiológicamente activo que comprende interferón-beta-1a fisiológicamente activo acoplado a un polímero que comprende un resto de polialquilenglicol, en el que el interferón-beta-1a y el resto de polialquilenglicol están dispuestos de forma que el interferón-beta-1a fisiológicamente activo de la composición tiene una semivida aumentada respecto del interferón-beta-1a solo (es decir, en una forma sin conjugar desprovista del polímero acoplado a él).

Otro caso de la descripción es una composición de interferón-beta-1a que comprende interferón-beta-1a fisiológicamente activo acoplado a un polímero que comprende un resto de polialquilenglicol en el que el interferón-beta-1a es una proteína de fusión, preferiblemente una fusión con inmunoglobulina. En tal complejo, la estrecha proximidad del extremo N-terminal (sitio de conjugación con el polímero) y el extremo C-terminal (sitio de fusión con el resto Ig) sugiere que la conjugación del polímero puede reducir la inmunogenicidad de la proteína de fusión.

En otro caso, la presente descripción se refiere a una composición de interferón-beta-1a fisiológicamente activo que comprende interferón-beta-1a fisiológicamente activo acoplado a un polímero, que comprende un resto de polialquilenglicol, en el que el interferón-beta-1a y el resto de polialquilenglicol están dispuestos de forma que el interferón-beta-1a fisiológicamente activo de la composición tiene una actividad aumentada respecto del interferón-beta-1a solo (es decir, en una forma sin conjugar desprovista del polímero acoplado a él).

Otro caso es una proteína conjugada de interferón-beta-1a cuyo resto de interferón-beta-1a se ha mutado para proporcionar muteínas con actividad antiviral y/o antiproliferativa aumentada selectivamente respecto de las formas sin mutar de interferón-beta-1a.

La descripción se refiere en un aspecto adicional a un complejo conjugado de interferón-beta-1a estable e hidrosoluble que comprende un interferón-beta-1a fisiológicamente activo acoplado de forma covalente a un resto de polietilenglicol fisiológicamente compatible. En tal complejo, el interferón-beta-1a puede estar acoplado de forma covalente al resto de polietilenglicol fisiológicamente compatible mediante un enlace covalente lábil en un grupo aminoácido libre del interferón-beta-1a, en el que el enlace covalente lábil se rompe in vivo mediante hidrólisis bioquímica y/o proteólisis.

En otro caso, la presente descripción se refiere a una forma farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un complejo de interferón-beta-1a estable e hidrosoluble que comprende interferón-beta acoplado a un polietilenglicol fisiológicamente compatible.

En otro caso, las composiciones de interferón-beta-1a acoplado de forma covalente, tales como las descritas anteriormente, pueden utilizar interferón-beta-1a destinado a aplicaciones diagnósticas o in vitro, en las que el interferón-beta-1a es, por ejemplo, un reactivo de diagnóstico para un inmunoanálisis u otras aplicaciones diagnósticas o in vitro. En tales aplicaciones no terapéuticas, los complejos de la descripción se emplean de forma muy útil como composiciones estabilizadas que se pueden formular, por ejemplo, en disolventes compatibles u otras formulaciones basadas en disoluciones para proporcionar formas compuestas estables que tienen resistencia aumentada a la degradación.

La modificación de interferón-beta 1a con un polímero atóxico puede ofrecer ciertas ventajas. Si se hacen modificaciones de forma que los productos (conjugados de polímero-interferón-beta-1a) mantienen todas o casi todas sus actividades biológicas, se puede dar como resultado las siguientes propiedades: farmacocinética y farmacodinámica alteradas, que conducen a una semivida incrementada y a alteraciones en la distribución tisular (p.ej., capacidad para permanecer en la vasculatura durante períodos de tiempo más largos), estabilidad incrementada en disolución, inmunogenicidad reducida, protección de la forma modificada de interferón-beta 1a de la

digestión proteolítica y de la eliminación posterior de la actividad; estabilidad térmica incrementada que conduce a una formulación más eficaz de interferón-beta-1a en polvo para uso oral o inhalado.

5 El interferón-beta-1a dotado de las propiedades mejoradas descritas anteriormente puede ser eficaz como terapia después de la administración oral, en aerosol o parenteral. Otras vías de administración, tales como nasal y transdérmica, pueden ser posibles también usando el interferón-beta-1a modificado.

Otro aspecto de la descripción es un medicamento que comprende los conjugados reivindicados para el uso en un método para inhibir la angiogénesis y la neovascularización. Como resultado de incrementar el nivel y la duración del interferón en la vasculatura, el producto pegilado de la descripción debería ser especialmente eficaz como inhibidor de la angiogénesis.

10 En aplicaciones no terapéuticas (p.ej., diagnósticas), también se contempla la conjugación de especies diagnósticas y/o reactivas de interferón-beta. El agente conjugado resultante es resistente a factores degradativos ambientales, que incluyen procesos de degradación mediados por disolvente o por disolución. Como resultado de tal resistencia aumentada y estabilidad incrementada del interferón-beta-1a, la estabilidad del ingrediente activo es capaz de incrementarse significativamente, con fiabilidad concomitante de la composición que contiene interferón-beta-1a en el uso final específico para el que se emplea la misma.

Basándose en la descripción contenida en el presente documento, la presente invención proporciona una composición que comprende un interferón-beta-1a o una proteína de fusión que comprende el interferón-beta-1a, en el que el interferón-beta-1a consiste en la secuencia de aminoácidos:

**MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN, y**

20 en el que el interferón-beta-1a está acoplado a un único polímero que no se da de forma natural en el extremo N-terminal de dicho interferón-beta-1a, en el que dicho acoplamiento entre el interferón-beta-1a y dicho polímero es obtenible mediante el uso de un método de alquilación reductora, y en el que dicho polímero comprende un resto de polialquilenglicol.

25 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una composición que comprende un mutante de interferón-beta-1a o una proteína de fusión que comprende el mutante de interferón-beta-1a, en el que el mutante de interferón-beta-1a consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

**MAYAALGALQASSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,**

**MSYNLLGFLQRSSNAACAALLAALNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,**

**MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRAACAADRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,**

**MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRAAFAPAEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,**

**MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIAAAAAFAAADAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,**

**MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLANIA
SIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,**

**MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFAAASSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,**

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNASIVAALLSNVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN,

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVAHQIAHLAAVLEEKLEKEDFTRGKLMSSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN,

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYHQINHLKTVLAAKLAADFTRGKLMSSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN,

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEAATAGKAMSALHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN,

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSSLHLKRYYGAI AAYLA
AKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN,

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSSLHLKRYYGRI LHYLK
AAAYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN,

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYAACAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYL RN,

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNI F
AIFRQDSSSTGWNENETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSSLHLKRYYGRI LHYLK
AKEYSHCAWTIVRAEILANFAFIARLTGYL RN, y

5 en el que el mutante de interferón-beta-1a está acoplado a un único polímero que no se da de forma natural en el extremo N-terminal de dicho mutante de interferón-beta-1a, en el que dicho acoplamiento entre el mutante de interferón-beta-1a y dicho polímero es obtenible mediante el uso de un método de alquilación reductora, y en el que dicho polímero comprende un resto de polialquilenglicol.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método *in vitro* para prolongar la actividad del interferón-beta-1a en un sistema *in vitro*, que comprende acoplar dicho interferón-beta-1a en el extremo N-terminal a un único resto de polímero que no se da de forma natural mediante el uso de un método de alquilación reductora para proporcionar una composición de polímero-interferón-beta-1a acoplado, e introducir la composición de polímero-interferón-beta-1a acoplado en el sistema *in vitro*, y dicho resto de polímero que no se da de forma natural comprende un resto de polialquilenglicol.

La presente invención y las realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

15 Otros aspectos, características y modificaciones de la invención serán aparentes de forma más completa a partir de la descripción posterior y de las reivindicaciones adjuntas.

Descripción breve de los dibujos

Figura 1. Unión de mutantes de interferón-beta-1a sustituidos con alanina a una proteína de fusión dimérica que comprende el dominio extracelular de la cadena del receptor de interferón de tipo I, IFNAR2/Ig (ectodominio de IFNAR2 fusionado con el dominio constante de IgG1 humana).

20 Las afinidades de unión de los mutantes de IFN (A1 - E) sustituidos con alanina por la cadena del receptor IFNAR2 se determinaron como se describe en el Ejemplo 1 (subsección D). El histograma presenta sus afinidades de unión en este análisis respecto de his-IFN-beta de tipo natural (% de t. n.). Los valores de % de t. n. se calcularon como (afinidad de his-IFN-beta de tipo natural)/afinidad de IFN-beta mutante x 100. Se muestran el % de t. n. (O) para experimentos individuales (n = 3) y un % de t. n. medio (x) para el grupo experimental. Los mutantes A2, AB1, AB2 y E no se unieron a IFNAR2/Fc a concentraciones 500 veces superiores que CE 50 de his-IFN-beta de t. n. (*).

25 Figura 2. Unión de mutantes de interferón-beta-1a sustituidos con alanina a los complejos del receptor de superficie celular de interferón de tipo I ("complejo IFNAR1/2") expresados en células de linfoma de Daudi Burkitt.

Las propiedades de unión a receptor de los mutantes de sustitución con alanina (A1 - E) se determinaron usando un ensayo de unión a receptor de superficie celular basado en FACS como se describe en el Ejemplo 1 (subsección D). El histograma presenta sus afinidades de unión a receptor en este análisis respecto de his-IFN-beta de tipo natural (% de t. n.). El % de t. n. para cada mutante se calculó como (afinidad de his-IFN-beta de tipo natural)/afinidad de IFN-beta mutante x 100. Se muestran los valores de % de t. n. (O) para experimentos individuales y una media de los valores de % de t. n. para el grupo experimental (x).

Figura 3. Actividades antivirales de mutantes de interferón-beta-1a sustituidos con alanina.

Las actividades antivirales de los mutantes por sustitución con alanina (A1 - E) se determinaron en células A549 humanas expuestas a virus de EMC como se describe en el Ejemplo 1 (subsección E). El histograma presenta sus actividades en este análisis respecto de his-IFN-beta de tipo natural (% de t. n.). El % de t. n. se calculó como (concentración de his-IFN-beta de t. n. [ECP del 50%]/concentración de IFN-beta mutante [ECP del 50%] x 100. Se muestra el % de t. n. (O) para múltiples análisis y la media del grupo de datos experimentales (x).

Figura 4. Actividades antiproliferativas de mutantes de interferón-beta-1a sustituidos con alanina.

La actividad antiproliferativa de los mutantes por sustitución con alanina (A1 - E) se determinó en células de linfoma de Daudi Burkitt como se describe en el Ejemplo 1 (subsección E). El histograma presenta sus actividades en este análisis respecto de his-IFN-beta de tipo natural (% de t. n.). El % de t. n. se calculó como (concentración de his-IFN-beta de t. n. [50% de inhibición del crecimiento]/concentración de IFN-beta mutante [50% de inhibición del crecimiento] x 100. Se muestra el % de t. n. (O) para múltiples análisis y la media del grupo de datos experimentales (x).

Figura 5. Actividades antiviral y antiproliferativa relativas de los mutantes de interferón-beta-1a sustituidos con alanina.

Se compararon las actividades relativas de los mutantes de sustitución con alanina (A1 - E) en los análisis de actividad antiviral (eje x) y de actividad antiproliferativa (eje y). Se usó el porcentaje medio de his-IFN-beta de tipo natural (% de t. n., x) presentado en las Figuras 3 y 4 para esta comparación. Los mutantes que muestran un cambio coordinado en ambas actividades estarían en la línea diagonal. Los mutantes que muestran un cambio en la actividad antiviral que es desproporcionado respecto del cambio en la actividad antiproliferativa se alejan significativamente de la línea diagonal (DE1, D, C1). Se determinó la significación estadística a partir de la consideración de las desviaciones estándar inherentes en los valores medios de % de t. n. usados.

Figura 6. Localización del sitio de pegilación mediante cartografía de péptidos.

Se sometió a interferón-β-1a pegilado y sin modificar a análisis de cartografía de péptidos. Las muestras se digirieron con lisil-endopeptidasa y se sometieron a HPLC de fase inversa en una columna C₄. La columna se desarrolló con un gradiente 0-70% de acetonitrilo en ácido trifluoroacético del 0,1%. El eluido de la columna se monitorizó a 214 nm. Panel a, interferón-β-1a sin modificar. Panel b, interferón-β-1a pegilado. Las flechas marcan la posición de elución del péptido de lisil-endopeptidasa N-terminal de interferón-β-1a que contiene los residuos de aminoácido 1-19.

Figura 7. Actividad antiviral de interferón-beta-1a conjugado y sin conjugar.

Se analizó la actividad de interferón-beta-1a o interferón-beta-1a PEGilado a las concentraciones indicadas en el eje X en ensayos antivirales usando células de carcinoma de pulmón (A549) humanas expuestas a virus de encefalomiocarditis. Después de una incubación de dos días con virus, las células viables se tiñeron con MTT, las placas se leyeron a 450 nm y la absorbancia, que refleja la viabilidad celular, se muestra en el eje Y. Las desviaciones estándar se muestran como barras de error. La concentración de interferón-beta-1a o interferón-beta-1a PEGilado que ofrecieron un 50% de destrucción viral (el "efecto citopático del 50%") (50% de DO₄₅₀ máxima) fue de alrededor de 11 pg/ml, y el efecto citopático del 50% para interferón-beta-1a PEGilado fue de alrededor de 11 pg/ml.

Figura 8. Valoración de la estabilización de los conjugados usando desnaturalización térmica.

Se calentó interferón-beta-1a PEGilado y control de interferón-beta-1a sin tratar en HEPES 20 mM de pH 7,5, NaCl 20 mM a una velocidad fija de 1 grado/minuto. Se siguió la desnaturalización monitorizando los cambios en la absorbancia a 280 nm. (a) interferón-beta-1a sin modificar (b) interferón-beta-1a PEGilado.

Figura 9. Medidas de la actividad antiviral de interferón-beta en el plasma de ratones tratados con interferón-beta-1a o interferón-beta-1a PEGilado.

Se inyectó de forma iv a los ratones 50.000 unidades de interferón-beta-1a o 50.000 unidades de interferón-beta-1a pegilado (que contenía PEG 20K). La sangre de estos ratones se obtiene por medio de extracciones retroorbitales en diversos momentos después de la inyección de interferón, como se indica en el eje X. Hay al menos 3 ratones a los que se les extrajo sangre en cada punto de tiempo, y se prepara el plasma y se congela hasta que se analiza la

actividad de interferón-beta de ese momento en análisis antivirales usando células de carcinoma de pulmón (A549) humanas expuestas a virus de encefalomiocarditis. Las células viables se tiñeron con una disolución de MTT, las placas se leyeron a 450 nm para determinar la absorbancia que refleja la viabilidad celular y la actividad de interferón-beta. Se generaron curvas estándar para cada placa usando interferón-beta-1a y se usaron para determinar la cantidad de actividad de interferón-beta en cada muestra. Se muestran los datos de los animales individuales.

Figura 10. Secuencia de ADN completa del gen de interferón beta marcado con histidina y su producto proteico.

Se muestran las secuencias completas de ADN (SEQ ID N°: 1) y de la proteína (SEQ ID N°: 2) de interferón-beta-1a marcado con histidina. La secuencia señal VCAM-1 escindida deja 3 residuos amino-terminales (SerGlyGly) en dirección del extremo N-terminal de la señal de histidina (His₆, posiciones 4-9). La secuencia ligadora de enterocinasa (AspAspAspAspLys) está separada de la señal de histidina por un espaciador (posiciones 10-12, SerSerGly). La secuencia proteica de IFN-beta-1a natural abarca las posiciones (Met18-Asn183).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Como se usa aquí, la expresión "acoplado de forma covalente" significa que los restos especificados están unidos de forma covalente directamente entre sí, o si no, están unidos de forma covalente indirectamente entre sí por medio de un resto o restos intermedios, tales como un resto o restos que actúan de puente, espaciador o unión.

Interferón: Un "interferón" (también denominado "IFN") es un polipéptido de cadena única pequeño y específico de especie, producido por células mamíferas en respuesta a la exposición a una diversidad de inductores, tales como virus, polipéptidos, mitógenos. El interferón usado en la invención es un interferón-beta humano glicosilado que está glicosilado en el residuo 80 (Asn 80) y que se obtiene preferiblemente por medio de técnicas de ADN recombinante. Este interferón-beta glicosilado preferido se llama "interferón-beta-1a" o "IFN-beta-1a" o "IFN-β-1a" o "interferón beta 1a" o "interferón-β-1a", todos usados de forma intercambiable. La expresión "interferón-beta-1a" también pretende abarcar sus mutantes (p.ej., Ejemplo 1), con tal que tales mutantes también estén glicosilados en el residuo 80 (Asn 80). Se conocen métodos de ADN recombinante para producir proteínas, que incluyen interferones. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.399.216, 5.149.636, 5.179.017 (Axel et al) y 4.470.461 (Kaufman).

Los polinucleótidos de interferón-beta-1a preferidos que se pueden usar en los presentes métodos de la invención se derivan de las secuencias génicas de interferón beta de tipo natural de diversos vertebrados, preferiblemente mamíferos, y se obtienen usando métodos que son bien conocidos para aquellos que tienen una experiencia habitual en la técnica, tales como los métodos descritos en las siguientes patentes de EE.UU.: patente de EE.UU. 5.641.656 (expedida el 24 de jun. de 1997: ADN que codifica proproteína de interferón de tipo I aviar e interferón de tipo I aviar maduro), patente de EE.UU. 5.605.688 (25 de feb. de 1997: interferones de tipo I recombinantes de perro y caballo); patente de EE.UU. 5.231.176 (27 de jul. de 1993, molécula de ADN que codifica un interferón de leucocitos humanos); patente de EE.UU. 5.071.761 (10 de dic. de 1991, secuencia de ADN que codifica sub-secuencias de interferones linfoblastoides humanos LyIFN-alfa-2 y LyIFN-alfa-3); patente de EE.UU. 4.970.161 (13 de nov. de 1990, secuencia de ADN que codifica interferón-gamma humano); patente de EE.UU. 4.738.931 (19 de abr. de 1988, ADN que contiene un gen de interferón beta humano); patente de EE.UU. 4.695.543 (22 de sep. de 1987, gen de alfa-interferón Gx-1 humano) y patente de EE.UU. 4.456.748 (26 de jun. de 1984, ADN que codifica sub-secuencias de interferones diferentes y naturales de leucocitos).

Los mutantes de interferón-beta-1a se pueden usar de acuerdo con esta invención. Las mutaciones se desarrollan usando métodos convencionales de mutagénesis dirigida, conocidos para aquellos de experiencia habitual en la técnica. Además, la descripción proporciona polinucleótidos de interferón-beta-1a funcionalmente equivalentes que codifican polipéptidos de interferón-beta-1a funcionalmente equivalentes.

Un primer polinucleótido que codifica interferón-beta-1a es "funcionalmente equivalente" comparado con un segundo polinucleótido que codifica interferón-beta-1a si satisface al menos una de las siguientes condiciones:

(a) el "equivalente funcional" es un primer polinucleótido que hibrida con el segundo polinucleótido en condiciones de hibridación estándar y/o es degenerado para la primera secuencia polinucleotídica. Lo más preferiblemente, codifica un interferón mutante que tiene la actividad de un interferón-beta-1a;

(b) el "equivalente funcional" es un primer polinucleótido que codifica la expresión de una secuencia de aminoácidos codificada por el segundo polinucleótido.

En resumen, el término "interferón" incluye los agentes enumerados anteriormente, así como sus equivalentes funcionales. Como se usa aquí, la expresión "equivalente funcional", por lo tanto, se refiere a una proteína de interferón-beta-1a o a un polinucleótido que codifica la proteína de interferón-beta-1a que tiene el mismo efecto beneficioso o un efecto beneficioso mejorado sobre el receptor mamífero respecto del interferón del que se juzga que es un equivalente funcional. Como apreciará alguien de experiencia habitual en la técnica, una proteína funcionalmente equivalente se puede producir mediante técnicas recombinantes, p.ej., expresando un "ADN

funcionalmente equivalente". Por lo tanto, la presente invención abarca proteínas de interferón-beta-1a codificadas por ADN naturales, así como por ADN que no se dan de forma natural, que codifican la misma proteína codificada por el ADN natural. Debido a la degeneración de las secuencias nucleotídicas codificantes, se pueden usar otros polinucleótidos para codificar interferón-beta-1a. Estos incluyen todas las secuencias anteriores o partes de éstas, que se alteran por la sustitución de diferentes códones que codifican el mismo residuo de aminoácido dentro de la secuencia, lo que produce un cambio sinónimo. Tales secuencias alteradas se consideran como equivalentes de estas secuencias. Por ejemplo, Phe (F) se codifica mediante dos códones, TTC o TTT, Tyr (Y) se codifica mediante TAC o TAT e His (H) se codifica mediante CAC o CAT. Por otra parte, Trp (W) se codifica mediante un único codón, TGG. Por lo tanto, se apreciará que para una secuencia de ADN dada que codifica un interferón particular existirán muchas secuencias degeneradas de ADN que lo codificarán. Estas secuencias de ADN degeneradas se consideran dentro del alcance de esta descripción.

"Fusión": Se refiere a una unión colineal de dos o más proteínas o sus fragmentos por medio de sus esqueletos peptídicos individuales a través de la expresión genética de una molécula polinucleotídica que codifica esas proteínas. Se prefiere que las proteínas o sus fragmentos sean de diferentes fuentes. Así, las proteínas de fusión preferidas incluyen una proteína de interferón-beta-1a o un fragmento conectado de forma covalente a un segundo resto que no es un interferón. Específicamente, una "fusión interferón-beta-1a/Ig" es una proteína que comprende una molécula de interferón-beta-1a de la invención, o un fragmento suyo, conectado a un extremo N-terminal de una cadena de inmunoglobulina, en la que una parte del extremo N-terminal de la inmunoglobulina está sustituida con el interferón-beta-1a.

"Recombinante", como se usa aquí, significa que una proteína se obtiene de sistemas de expresión recombinantes mamíferos. La proteína expresada de la mayoría de los cultivos bacterianos, p.ej. E. coli, carecerá de glicano, por lo tanto no se prefieren estos sistemas la expresión. La proteína expresada en levadura puede tener estructuras oligosacáridas que son diferentes de las que se expresan en células mamíferas.

"Biológicamente activo", como se usa a lo largo de la memoria descriptiva como una característica de interferón-beta 1a, significa que una molécula particular comparte una homología de secuencia de aminoácidos suficiente con las realizaciones de la presente invención descritas aquí para ser capaz de mostrar actividad antiviral como se mide en un análisis antiviral in vitro del tipo mostrado en el Ejemplo 1 (véase más adelante).

Una "composición terapéutica", como se usa aquí, se define por comprender las proteínas de la invención y otros ingredientes fisiológicamente compatibles. La composición terapéutica puede contener excipientes tales como agua, minerales y vehículos tales como proteína.

Una "cantidad eficaz" de un agente de la invención es la cantidad que produce un resultado o ejerce una influencia en el trastorno particular que se está tratando.

"Aminoácido": Una unidad monomérica de un péptido, polipéptido o proteína. Hay veinte aminoácidos que se encuentran en péptidos, polipéptidos y proteínas naturales, todos los cuales son isómeros L. El término también incluye los análogos de los aminoácidos y los isómeros D de los aminoácidos proteicos y sus análogos.

Un aminoácido "derivado" es un aminoácido natural o no natural en el que la cadena lateral o grupo terminal normal está modificado mediante reacción química. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, gamma-carboxilación, beta-carboxilación, sulfatación, sulfonación, fosforilación, amidación, esterificación, N-acetilación, carbobencilación, tosilación y otras modificaciones conocidas en la técnica. Un "polipéptido derivado" es un polipéptido que contiene uno o más aminoácidos derivados.

"Proteína": Cualquier polímero que consiste esencialmente en cualquiera de los 20 aminoácidos. Aunque "polipéptido" se usa a menudo refiriéndose a polipéptidos relativamente grandes, y "péptido" se usa a menudo refiriéndose a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la técnica se solapa y es variado. El término "proteína", como se usa aquí, se refiere a péptidos, proteínas y polipéptidos, a menos que se indique de otra forma.

"Mutante": Cualquier cambio en el material genético de un organismo, en particular cualquier cambio (es decir, delección, sustitución, adición o alteración) en una secuencia polinucleotídica de tipo natural o cualquier cambio en una proteína de tipo natural. El término "muteína" se usa de forma intercambiable con "mutante".

"Tipo natural": La secuencia polinucleotídica natural de un exón de una proteína, o de una porción suya, o una secuencia proteica, o una porción suya, respectivamente, como existe normalmente *in vivo*.

"Condiciones de hibridación estándar": Las condiciones iónicas y de temperatura sustancialmente equivalentes a 0,5 x SCC a alrededor de 5 x SSC y 65°C para hibridación y lavado. La expresión "condiciones de hibridación estándar", como se usa aquí, por tanto, es una definición operacional y abarca un intervalo de condiciones de hibridación. Las condiciones de rigurosidad superiores pueden incluir, por ejemplo, hibridar con tampón de cribado en placa (0,2% de polivinilpirrolidona, 0,2% de Ficoll 400; 0,2% de albúmina de suero bovino, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); NaCl 1 mM; 0,1% de pirofosfato sódico; 1% de SDS); 10% de sulfato de dextrano, y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y sonicado a 65°C durante 12-20 horas, y lavar con NaCl 75 mM/citrato sódico 7,5 mM (0,5 x SCC)/1% de SDS a 65°C. Las condiciones de rigurosidad inferiores pueden incluir, por ejemplo, hibridar con tampón

de cribado en placa, 10% de sulfato de dextrano y 110 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y sonificado a 55°C durante 12-20 horas, y lavar con NaCl 300 mM/citrato sódico 30 mM (2,0 x SCC)/1% de SDS a 55°C. Véase también Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, secciones 6.3.1-6.3.6, (1989).

- 5 "Secuencia de control de expresión": Una secuencia de polinucleótidos que controla y regula la expresión de genes cuando se une de forma operable a esos genes.

10 "Unido de forma operable": Una secuencia polinucleotídica (ADN, ARN) está unida de forma operable a una secuencia de control de expresión cuando la secuencia de control de expresión controla y regula la transcripción y traducción de esa secuencia polinucleotídica. La expresión "unido de forma operable" incluye tener una señal de inicio apropiada (p.ej., ATG) delante de la secuencia polinucleotídica a expresar, y mantener el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia polinucleotídica bajo el control de la secuencia de control de expresión y la producción del polipéptido deseado codificado por la secuencia polinucleotídica.

15 "Vector de expresión": Un polinucleótido, tal como un plásmido de ADN o un fago (entre otros ejemplos comunes) que permite la expresión de al menos un gen cuando el vector de expresión se introduce en una célula hospedadora. El vector puede o no ser capaz de replicarse en una célula.

20 "Aislado" (usado de forma intercambiable con "sustancialmente puro"): Cuando se aplica a ácidos nucleicos, es decir, secuencias polinucleotídicas, que codifican polipéptidos, significa un polinucleótido de ARN o ADN, porción de polinucleótidos genómicos, cADN o polinucleótido sintético que, debido a su origen o manipulación: (i) no está asociado con la totalidad de un polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza (p.ej., está presente en una célula hospedadora como un vector de expresión, o una porción suya); o (ii) está unido a un ácido nucleico u otro resto químico distinto de al que está unido en la naturaleza; o (iii) no se da en la naturaleza. Por "aislado" se quiere decir además una secuencia polinucleotídica que: (i) se amplifica *in vitro* mediante, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) se sintetiza químicamente; (iii) se produce de forma recombinante mediante clonado; o (iv) se purifica, mediante escisión y separación en gel.

25 Así, "ácido nucleico sustancialmente puro" es un ácido nucleico que no está inmediatamente contiguo con una o ambas secuencias codificantes con las que está normalmente contiguo en el genoma natural del organismo del que procede el ácido nucleico. El ADN sustancialmente puro también incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica secuencias adicionales.

30 "Aislado" (usado de forma intercambiable con "sustancialmente puro"): Cuando se aplica a polipéptidos significa un polipéptido o una porción suya que, debido a su origen o manipulación: (i) está presente en una célula hospedadora como el producto de expresión de una porción de un vector de expresión; o (ii) está unido a una proteína u otro resto químico distinto de al que está unido en la naturaleza; o (iii) no se da en la naturaleza. Por "aislado" se quiere decir además una proteína que: (i) se sintetiza químicamente; o (ii) se expresa en una célula hospedadora y se purifica de las proteínas asociadas. El término significa generalmente un polipéptido que se ha separado de otras proteínas y ácidos nucleicos con los que se da de forma natural. Preferiblemente, el polipéptido también se separa de sustancias tales como anticuerpos o matrices de gel (poliacrilamida) que se usan para purificarlo.

35 "Promotor heterólogo": Como se usa aquí, es un promotor que no está asociado de forma natural con un gen o con un ácido nucleico purificado.

40 "Homólogo": Como se usa aquí, es sinónimo del término "identidad", y se refiere a la similitud de secuencia entre dos polipéptidos, moléculas o entre dos ácidos nucleicos. Cuando una posición en las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad monómera de aminoácido (por ejemplo, si una posición en las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, o una posición en los dos polipéptidos está ocupada por una lisina), entonces las moléculas respectivas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre las dos secuencias es una función del número de coincidencias o posiciones homólogas compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes o son homólogas, entonces las dos secuencias son homólogas en un 60%. Como ejemplo, las secuencias de ADN CTGACT y CAGGTT comparten un 50% de homología (3 de las 6 posiciones totales son coincidentes). En general, se hace una comparación cuando dos secuencias están alineadas para dar una homología máxima. Tal alineación se puede proporcionar usando, por ejemplo, el método de Needleman et al., *J. Mol. Biol.* 48: 443-453 (1970), implementado convenientemente mediante programas informáticos tales como el programa Align (DNASTar, Inc.). Las secuencias homólogas comparten residuos de aminoácidos idénticos o similares, en las que los residuos similares son sustituciones conservativas, o "mutaciones puntuales permitidas", de los residuos de aminoácidos correspondientes en una secuencia de referencia alineada. A este respecto, una "sustitución conservativa" de un residuo en una secuencia de referencia son aquellas sustituciones que son físicamente o funcionalmente similares a los residuos de referencia correspondientes, p.ej., que tienen similar tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas, que incluyen la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservativas particularmente preferidas son las que cumplen los criterios definidos para una "mutación puntual aceptada" en Dayhoff et al., 5: Atlas of Protein Sequence and Structure, 5: supl. 3, capítulo 22: 354-352, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, D.C. (1978).

Las expresiones "secuencia polinucleotídica" y "secuencia nucleotídica" se usan también de forma intercambiable aquí.

"Angiogénesis" y "neovascularización" significan, en su sentido más amplio, la formación de vasos sanguíneos nuevos. En particular, la angiogénesis también se refiere a la formación de vasos sanguíneos nuevos en la localización de un tumor.

"IFNAR2", "IFNAR1", "IFNAR1/2" se refieren a las proteínas que se sabe que componen el receptor de interferón de tipo I de superficie celular. La parte extracelular (ectodominio) de la cadena IFNAR2 sola puede unir interferón alfa o beta.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra forma, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, química de proteínas e inmunología, las cuales están dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se describen en la bibliografía. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición. (Sambrook, Fritsch y Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; *DNA Cloning*, volúmenes I y II (D.N. Glover, ed.), 1985; *Oligonucleotide Synthesis*, (M.J. Gait, ed.), 1984; patente de EE.UU. nº 4.683.195 (Mullis et al.); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames y S.J. Higgins, eds.), 1984; *Transcription and Translation* (B.D. Hames y S.J. Higgins, eds.), 1984; *Culture of Animal Cells* (R.I. Freshney, ed). Alan R. Liss, Inc., 1987; *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, 1986; *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal), 1984; *Methods in Enzymology*, volúmenes 154 y 155 (Wu et al., eds), Academic Press, Nueva York; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.H. Miller y M.P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds.), Academic Press, Londres, 1987; *Handbook of Experiment Immunology*, volúmenes I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.), 1986; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

El interferón-beta

El interferón-beta-1a es útil como agente para el tratamiento, remisión o atenuación de una enfermedad, trastorno fisiológico, síntomas o factores etiológicos, o para su evaluación o diagnóstico. La expresión también se refiere a interferón-beta-1a que es parte de una proteína de fusión, tal como una proteína de fusión inmunoglobulina-interferón-beta-1a. La preparación de proteínas de fusión en general está dentro del conocimiento de las personas que tienen una experiencia habitual en la técnica.

Se ha(n) descubierto sitio(s) único(s) para la unión de polímero que no destruiría(n) la función de interferón-beta-1a. Además, se han usado métodos de mutagénesis dirigida para investigar de forma independiente sitio(s) para la unión de polímero (véase el Ejemplo 1). Brevemente, se ha emprendido un análisis mutacional de interferón-beta-1a humano con el propósito de cartografiar los residuos necesarios para la actividad y la unión a receptor. La disponibilidad de la estructura cristalina en 3D del interferón-beta-1a humano (véase anteriormente y el Ejemplo 1) permite identificar, para sustituciones con alanina (o serina), los residuos expuestos al disolvente disponibles para las interacciones con el receptor de interferón beta, y mantener los aminoácidos implicados en los enlaces intramoleculares. Se diseñó un panel de quince mutaciones de barrido de alaninas que sustituyeron entre dos y ocho residuos a lo largo de distintas regiones de cada una de las hélices (A, B, C, D, E) y giros (AB1, AB2, AB3, CD1, CD2, DE1, DE2) de interferón-beta-1a. Véase el Ejemplo 1.

Se incluyó una señal de histidina amino-terminal (señal "his") para la purificación por afinidad de los mutantes expresados en células mamíferas (Figura 10 y SEQ ID N°s: 1 y 2 para el cADN y las secuencias de aminoácidos deducidas, respectivamente). Las consecuencias funcionales de estas mutaciones se analizan en ensayos antivirales y de antiproliferación. Se desarrolló un ensayo de unión sin radiactividad para analizar la unión de estos mutantes al receptor de superficie celular de interferón beta (receptor de superficie celular IFNAR1/2). Además, se usó un análisis basado en ELISA que emplea una proteína de fusión de ectodominio de IFNAR2/Ig para unir interferón para cartografiar las interacciones de las superficies entre interferón-beta-1a e IFNAR2 (véase el Ejemplo 1). Estos análisis mutacionales demostraron que los extremos N- y C-terminales se encuentran en una porción de la molécula de interferón-beta que no es importante para la unión a receptor o la función biológica.

Los mutantes son variantes adicionales del resto de interferón beta 1a de la invención que pueden ser particularmente útiles, ya que exhiben propiedades nuevas que no se hallan en el interferón-beta-1a de tipo natural (véase el Ejemplo 1). Se han identificado tres tipos de efectos que se causaron mediante mutagénesis dirigida. Estos efectos pueden ser ventajosos para el desarrollo de fármacos de interferón en ciertas circunstancias. Los tres tipos de efectos son los siguientes: (a) mutantes con actividad antiviral superior que la del interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his (p.ej., mutante C1); (b) mutantes que exhiben actividad tanto en ensayos antivirales como de antiproliferación, pero para los que la actividad de antiproliferación es desproporcionadamente baja con respecto a la actividad antiviral, comparado con el interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his (p.ej., mutantes C1, D y DE1); y (c) antagonistas funcionales (p.ej., A1, B2, CD2 y DE1), que muestran actividades antivirales y antiproliferativas que son desproporcionadamente bajas con respecto a la unión a receptor, comparadas con interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his.

El resto de polímero

En la presente invención, se emplea una única molécula de polímero que comprende un resto de polialquilenglicol para la conjugación con el extremo N-terminal de un interferón-beta 1a. Las composiciones de interferón-beta 1a conjugado de la invención pueden tener utilidad tanto en aplicaciones *in vivo* como *in vitro*. Además, se reconocerá que el polímero de conjugación puede utilizar otros grupos, restos u otras especies conjugadas, según sea apropiado para la aplicación final. A modo de ejemplo, puede ser útil en algunas aplicaciones unir de forma covalente al polímero un resto funcional que confiera resistencia a la degradación UV, o antioxidación, u otras propiedades o características al polímero. Como ejemplo adicional, puede ser ventajoso en algunas aplicaciones modificar el polímero para hacerlo de carácter reactivo o entrecruzable, para potenciar diversas propiedades o características del material conjugado en su conjunto. Por lo tanto, el polímero puede contener cualquier función, grupos repetitivos, uniones u otras estructuras constituyentes que no impiden la eficacia de la composición de interferón-beta 1a conjugado para su propósito deseado. Otros objetivos y ventajas de la presente invención serán aparentes de forma más completa a partir de la subsiguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Los polímeros ilustrativos que se pueden emplear de forma útil para alcanzar estas características deseables se describen aquí más adelante en los esquemas de reacción ejemplares. En las aplicaciones de péptidos unidos de forma covalente, el polímero se puede modificar y después se puede acoplar a aminoácido(s) de el/los péptido(s) para formar enlaces lábiles.

El interferón-beta-1a se conjuga de forma más preferible por medio de un grupo reactivo terminal del polímero, aunque las conjugaciones también se pueden ramificar desde los grupos reactivos que no son terminales. El polímero con el/los grupo(s) reactivo(s) se designa aquí como "polímero activado". El grupo reactivo reacciona de forma selectiva con los grupos amino libres del extremo N-terminal de la proteína. El polímero activado se hace reaccionar de forma que la unión se da en el grupo amino N-terminal de interferón-beta-1a.

En general, se emplean de alrededor de 1,0 a alrededor de 10 moles de polímero activado por mol de proteína, dependiendo de la concentración de proteína. La cantidad final es un equilibrio entre maximizar el alcance de la reacción a la vez que se minimizan las modificaciones inespecíficas del producto y, al mismo tiempo, definir las propiedades químicas que mantendrán una actividad óptima, mientras al mismo tiempo se optimiza, si es posible, la semivida de la proteína. Preferiblemente, al menos se conserva alrededor del 50% de la actividad biológica de la proteína, y lo más preferiblemente se conserva el 100%.

Las reacciones pueden tener lugar mediante cualquier método adecuado usado para hacer reaccionar materiales biológicamente activos con polímeros inertes, preferiblemente a alrededor de pH 5-7 porque los grupos reactivos están en el grupo alfa amino en el extremo N-terminal. En general, el proceso implica preparar un polímero activado (que puede tener al menos un grupo hidroxilo terminal) y posteriormente hacer reaccionar la proteína con el polímero activado para producir la proteína soluble adecuada para la formulación. La reacción de modificación anterior se puede realizar mediante varios métodos, que pueden implicar una o más etapas.

Como se mencionó anteriormente, las realizaciones de la invención utilizan el extremo N-terminal de interferón-beta-1a como unión al polímero. Hay disponibles métodos adecuados para obtener de forma selectiva un interferón-beta-1a modificado de forma N-terminal como se menciona en las reivindicaciones, en donde el polímero se acopla al interferón-beta-1a por medio de una unión obtenible mediante alquilación reductora. Un método se ejemplifica mediante un método de alquilación reductora que explota la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (los grupos épsilon amino de la lisina respecto de los grupos amino de la metionina N-terminal) disponibles para la modificación de interferón-beta-1a. En las condiciones de selección apropiadas, se puede conseguir la modificación sustancialmente selectiva de interferón-beta-1a en su extremo N-terminal con un polímero que contiene un grupo carbonilo. La reacción se realiza a un pH que permite aprovechar la ventaja de las diferencias de pKa entre los grupos épsilon-amino de los residuos de lisina y la del grupo alfa-amino del residuo del extremo N-terminal de interferón-beta-1a. Este tipo de procedimiento químico es bien conocido para las personas de experiencia habitual en la técnica.

Se usó un esquema la reacción en el que esta selectividad se mantiene llevando a cabo las reacciones a pH bajo (en general 5-6) en condiciones en las que un polímero PEG-aldehído se hace reaccionar con interferón-beta-1a en presencia de cianoborohidruro sódico. Esto da como resultado, después de la purificación del PEG-interferón-beta-1a y análisis con SDS-PAGE, espectrometría de masas MALDI y secuenciación/cartografía de péptidos, un interferón-beta-1a cuyo extremo N-terminal está marcado específicamente por el resto PEG.

La estructura cristalina de interferón-beta-1a es tal que los extremos N- y C-terminales están localizados cerca el uno del otro (véase Karpusas et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 11813-11818). Así, las modificaciones del extremo C-terminal del interferón-beta-1a también deberían tener un efecto mínimo sobre la actividad. Aunque no hay una estrategia química simple para dirigir un polímero de polialquilenglicol tal como PEG hacia el extremo C-terminal, sería sencillo modificar mediante ingeniería genética un sitio que se pudiese usar para dirigir el resto de polímero. Por ejemplo, la incorporación de una Cys en un sitio que está en el extremo C-terminal o cerca de él permitiría la modificación específica usando un polialquilenglicol (p.ej., PEG) activado con maleimida, vinilsulfona o haloacetato. Estos derivados se pueden usar específicamente para la modificación de las cisteínas alteradas mediante ingeniería genética debido a la elevada selectividad de estos reactivos por Cys. Otras estrategias, tales como la incorporación

de una señal de histidina que puede ser reconocida (Fancy et al., (1996) Chem. & Biol. 3: 551) o un sitio de glicosilación adicional, representan otras alternativas para modificar el extremo C-terminal de interferón-beta-1a.

El glicano del interferón-beta-1a está también en una posición que permitiría la modificación adicional sin alterar la actividad. Los métodos para marcar hidratos de carbono como sitios para la modificación química también se conocen bien, y por lo tanto es probable que se pueda añadir un polímero de polialquilenglicol directamente y específicamente a hidratos de carbono del interferón-beta-1a que se han activado por medio de oxidación. Por ejemplo, se puede generar un polietilenglicol-hidrazida, que forma uniones hidrazona relativamente estables mediante condensación con aldehídos y cetonas. Esta propiedad se ha usado para la modificación de proteínas por medio de uniones de oligosacáridos oxidados. Véase Andresz, H. et al., (1978), Makromol. Chem. 179: 301. En particular, el tratamiento con PEG-hidrazida de carboximetilo con nitrito produce PEG-azida de carboximetilo, que es un grupo electrófilo reactivo hacia grupos amino. Esta reacción se puede usar para preparar también proteínas modificadas con polialquilenglicol. Véanse las patentes de EE.UU. 4.101.380 y 4.179.337.

Se ha descubierto previamente que el procedimiento químico con ligador de tiol podría facilitar adicionalmente la reticulación de proteínas. En particular, se generaron multímeros homotípicos de LFA-3 y CD4 usando un procedimiento tal como generar aldehídos reactivos en restos de hidratos de carbono con peryodato sódico, formar conjugados de cistamina por medio de los aldehídos e introducir reticulación por medio de los grupos tiol de las cistaminas. Véase Pepinsky, B. et al., (1991), J. Biol. Chem., 266: 18244-18249 y Chen, L.L. et al., (1991) J. Biol. Chem., 266: 18237-18243. Por lo tanto, se prevé que este tipo de procedimiento químico también sería apropiado para la modificación con polímeros de polialquilenglicol en los que se incorpora un ligador en el hidrato de carbono y el polímero de polialquilenglicol se une al ligador. Aunque los ligadores de aminotiol o que contienen hidrazina permitirán la adición de un único grupo polimérico, la estructura del ligador se puede variar de forma que se pueden añadir múltiples polímeros y/o de forma que se cambia la orientación espacial del polímero con respecto al interferón-beta-1a. Como se expone en las reivindicaciones adjuntas, no obstante, el acoplamiento entre el interferón-beta-1a y el polímero es obtenible mediante el uso de un método de alquilación reductora.

En la práctica de la presente invención, se incorporan ventajosamente residuos de polialquilenglicol de alquil C1-C4 polialquilenglicoles, preferiblemente polietilenglicol (PEG), o residuos de poli(oxi)alquilenglicol de tales glicoles en los sistemas poliméricos de interés. Así, el polímero al que se une la proteína puede ser un homopolímero de polietilenglicol (PEG) o es un poliol polioxietilado, con tal que en todos los casos el polímero sea hidrosoluble a temperatura ambiente. Los polímeros usados en la presente invención incluyen homopolímeros de poli(óxido de alquileo), tales como PEG o polipropilenglicoles, glicoles polioxietilenados, sus copolímeros y sus copolímeros en bloque, con tal que se mantenga la solubilidad en agua del copolímero en bloque. Los ejemplos de polioles polioxietilados incluyen, por ejemplo, glicerol polioxietilado, sorbitol polioxietilado y glucosa polioxietilada. El esqueleto de glicerol del glicerol polioxietilado es el mismo esqueleto que se da de forma natural en, por ejemplo, animales y humanos en los mono-, di-, y triglicéridos. Por lo tanto, esta ramificación no se vería necesariamente como un agente extraño en el cuerpo.

El polímero no necesita tener un peso molecular particular, pero se prefiere que el peso molecular esté entre alrededor de 300 y alrededor de 100.000, más preferiblemente entre 10.000 y 40.000. En particular, los tamaños de 20.000 o más son los mejores para prevenir la pérdida de proteína debida a la filtración en los riñones.

La formación de derivados de polialquilenglicol tiene varias propiedades ventajosas en la formulación de conjugados de polímero-interferón-beta 1a en la práctica de la presente invención, asociadas con las siguientes propiedades de los derivados de polialquilenglicol: mejora de la solubilidad en agua, mientras al mismo tiempo no se provoca respuesta antigénica o inmunógena; grado elevado de biocompatibilidad; ausencia de biodegradación in vivo de los derivados de polialquilenglicol; y facilidad de excreción por organismos vivos.

Además, en otro aspecto de la invención, se puede utilizar interferón-beta 1a unido de forma covalente al componente polimérico en el que la naturaleza de la conjugación implica enlaces químicos covalentes escindibles. Esto permite el control desde el punto de vista del transcurso del tiempo a lo largo del cual el polímero se puede escindir del interferón-beta 1a. Este enlace covalente entre el fármaco de interferón-beta-1a y el polímero se puede escindir mediante reacción química o enzimática. El producto de polímero-interferón-beta-1a mantiene una cantidad aceptable de actividad. Al mismo tiempo, hay presentes partes de polietilenglicol en el polímero de conjugación para dotar al conjugado de polímero-interferón-beta-1a de solubilidad en agua elevada y capacidad de circulación sanguínea prolongada. Como resultado de estas características mejoradas, la invención contempla la administración parenteral, nasal, y oral de tanto la especie de polímero-interferón-beta-1a activo como, después de la escisión hidrolítica, la biodisponibilidad del interferón-beta-1a per se, en aplicaciones in vivo.

La reacción del polímero con el interferón-beta 1a para obtener los productos conjugados N-terminales se lleva a cabo fácilmente usando una amplia diversidad de esquemas de reacción. La actividad y estabilidad de los conjugados de interferón-beta-1a se puede variar de diversas formas, usando un polímero de tamaño molecular diferente. Las solubilidades de los conjugados se pueden variar cambiando la proporción y tamaño del fragmento de polietilenglicol incorporado en la composición de polímero.

Utilidades

La propiedad única de los polímeros derivados de polialquilenglicol de valor para las aplicaciones terapéuticas de la presente invención es su biocompatibilidad general. Los polímeros tienen diversas propiedades de solubilidad en agua y son atóxicos. Se cree que no son inmunógenos ni antigénicos, y que no interfieren con las actividades biológicas del resto de interferón-beta-1a cuando se conjugan en las condiciones descritas aquí. Poseen una circulación prolongada en la sangre y se excretan fácilmente de los organismos vivos.

Se ha descubierto que los productos de la presente invención son útiles para mantener la semivida del interferón-beta 1a terapéutico, y se pueden preparar, por ejemplo, para la administración terapéutica disolviéndolos en agua o en un medio líquido aceptable. La administración es por vía parenteral, en aerosol u oral. Se pueden preparar suspensiones coloidales finas para administración parenteral para producir un efecto prolongado, o por la vía oral, mientras la formulación en aerosol puede ser de naturaleza líquida o en polvo seco. En estado seco y liofilizado o en formulaciones en solución, los conjugados de interferón-beta-1a-polímero de la presente invención deberían tener buena estabilidad de almacenamiento. La estabilidad térmica del interferón-beta-1a conjugado (Ejemplo 3) es ventajosa en los procesos de formulación en polvo que tienen una etapa de deshidratación. Véase, p.ej., el documento WO 95/31479 ("Métodos y composiciones para polvo seco de interferones").

Los conjugados terapéuticos de polímero de la presente invención se pueden utilizar para la profilaxis o tratamiento de cualquier trastorno o enfermedad para la que el constituyente de interferón-beta-1a es eficaz. Además, los conjugados basados en polímero de la presente invención se pueden utilizar en el diagnóstico de constituyentes, trastornos o enfermedades en sistemas o especímenes biológicos, así como para diagnóstico en sistemas no fisiológicos.

En el uso terapéutico, se trata a un sujeto animal que tiene o es susceptible de forma latente a tal(es) trastorno(s) o enfermedad(es) y que necesita tal tratamiento, siguiendo un método que comprende administrar a tal animal una cantidad eficaz de un conjugado de polímero de la presente invención que es terapéuticamente eficaz para dicho trastorno o enfermedad. Los sujetos a tratar mediante los conjugados de polímero de la presente invención incluyen sujetos mamíferos, y, lo más preferiblemente, sujetos humanos. Dependiendo del trastorno o enfermedad específica a combatir, se puede administrar a los sujetos animales conjugados de polímero de la invención a cualquier dosis adecuada terapéuticamente eficaz y segura, como se puede determinar fácilmente dentro de la experiencia en la técnica, y sin experimentación excesiva. Debido a las barreras entre especies de los interferones de tipo I, puede ser necesario generar conjugados de interferón-polímero como se describe aquí con los interferones de las especies apropiadas.

La actividad antiproliferativa celular de interferón-beta-1a se conoce bien. En particular, ciertos conjugados de polímero con interferón-beta-1a descritos aquí son útiles para tratar tumores y cánceres, tales como sarcoma osteogénico, linfoma, leucemia linfocítica aguda, carcinoma de mama, melanoma y carcinoma nasofaríngeo, así como trastornos autoinmunes, tales como fibrosis, lupus y esclerosis múltiple. Se espera además que la actividad antiviral exhibida por las proteínas conjugadas, en particular ciertos conjugados de las mteínas de interferón-beta-1a descritos aquí, se puedan usar en el tratamiento de enfermedades virales, tales como infección por ECM, gripe y otras infecciones del tracto respiratorio, rabia, y hepatitis. También se espera que las actividades inmunomoduladoras de interferón-beta-1a exhibidas por las proteínas conjugadas descritas aquí se puedan usar en el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, tales como fibrosis, esclerosis múltiple. La capacidad de los interferones para inhibir la formación de vasos sanguíneos nuevos (es decir, inhibir la angiogénesis y la neovascularización) posibilita que los conjugados de la invención se usen para tratar enfermedades angiogénicas, tales como retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, degeneración macular, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolenticular, rubeosis y síndrome de Osler-Webber.

Además, la actividad antiendotelial de interferón se conoce desde hace tiempo, y un mecanismo potencial de la acción del interferón puede ser interferir con la actividad de las células endoteliales inhibiendo la producción o la eficacia de los factores angiogénicos producidos por las células tumorales. Algunos tumores vasculares, tales como hemangiomas, son particularmente sensibles al tratamiento con interferón. El tratamiento con interferón-alfa es el único tratamiento documentado para esta enfermedad. Se espera que el tratamiento con los conjugados de interferón-beta-1a de la invención ofrecerá beneficios farmacéuticos sustanciales en cuanto a farmacocinética y farmacodinámica, ya que se espera que el conjugado permanezca en la vasculatura durante un período de tiempo más largo que los interferones sin conjugar, lo que lleva a una terapia más eficaz y efectiva para uso como agente anti-angiogénico. Véase el Ejemplo 8.

Los conjugados de polímero-interferón-beta-1a de la invención se pueden administrar per se también en forma de sales farmacéuticamente aceptables. En tales formulaciones farmacéuticas y de medicamentos, el interferón-beta-1a se utiliza preferiblemente junto con uno o más vehículo(s) farmacéuticamente aceptable(s) y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico. El/los vehículo(s) debe(n) ser farmacéuticamente aceptable(s) en el sentido de ser compatible(s) con los otros ingredientes de la formulación, y no excesivamente perjudicial(es) para su receptor. El interferón-beta-1a se proporciona en una cantidad eficaz para conseguir el efecto farmacológico deseado, como se describió anteriormente, en una cantidad apropiada para conseguir la dosis diaria deseada.

Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración parenteral así como no parenteral, y las modalidades de administración específicas incluyen la administración oral, rectal, bucal, tópica, nasal, oftálmica,

subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, intratecal, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, bronquial, linfática, vaginal e intrauterina. Se prefieren las formulaciones adecuadas para administración oral, nasal y parenteral.

5 Cuando se utiliza el interferón-beta-1a en una formulación que comprende una disolución líquida, la formulación se puede administrar ventajosamente de forma oral o parenteral. Cuando se emplea el interferón-beta-1a en una formulación en suspensión líquida o como un polvo en una formulación con un vehículo biocompatible, la formulación se puede administrar ventajosamente de forma oral, rectal o bronquial.

10 Cuando se utiliza el interferón-beta-1a directamente en forma de un sólido pulverizado, el interferón-beta-1a se puede administrar ventajosamente de forma oral. Alternativamente, se puede administrar de forma nasal o bronquial, por medio de la nebulización del polvo en un gas portador, para formar una suspensión gaseosa del polvo que es inspirada por el paciente desde un circuito de respiración que comprende un dispositivo nebulizador adecuado.

15 Las formulaciones que comprenden los conjugados de polímero de la presente invención se pueden presentar de forma conveniente en formas farmacéuticas unitarias, y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Tales métodos incluyen, en general, la etapa de asociar el/los ingrediente(s) activo(s) con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. Típicamente, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme e íntima el/los ingrediente(s) activo(s) con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto en formas farmacéuticas de la formulación deseada.

20 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, sellos, comprimidos o pastillas, que contienen cada una la cantidad predeterminada del ingrediente activo como polvo o gránulos; o una suspensión en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso, tal como un jarabe, un elixir, una emulsión, o una poción.

25 Se puede hacer un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos mediante compresión se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada, con el compuesto activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, que opcionalmente se mezcla con un aglutinante, desintegrante, lubricante, diluyente inerte, agente tensoactivo o agente de descarga. Los comprimidos moldeados que constan de una mezcla de los conjugados de polímero en polvo con un vehículo adecuado se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada.

30 Se puede hacer un jarabe añadiendo el compuesto activo a una disolución acuosa concentrada de un hidrato de carbono, por ejemplo sacarosa, a la que también se le puede añadir cualquier ingrediente(s) accesorio(s). Tal(es) ingrediente(s) accesorio(s) puede(n) incluir aromatizantes, conservante adecuado, agentes para retrasar la cristalización del hidrato de carbono, y agentes para incrementar la solubilidad de cualquier otro ingrediente, tal como un alcohol polihidroxílico, por ejemplo glicerol o sorbitol.

35 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del conjugado activo, que preferiblemente es isotónica con la sangre del receptor (p.ej., solución salina fisiológica). Tales formulaciones pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes u otros sistemas microparticulados que se diseñan para dirigir al compuesto a componentes sanguíneos o a uno o más órganos. Las formulaciones se pueden presentar en forma de dosis unitaria o de dosis múltiple.

40 Las formulaciones de pulverizador nasal comprenden disoluciones acuosas purificadas del conjugado activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Tales formulaciones se ajustan preferiblemente a un pH y a un estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales.

Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con un vehículo adecuado, tal como manteca de cacao, grasas hidrogenadas o ácido graso carboxílico hidrogenado.

45 Las formulaciones oftálmicas, tales como gotas oculares, se preparan mediante un método similar al pulverizador nasal, excepto que el pH y los factores isotónicos se ajustan preferiblemente para coincidir con los del ojo.

Las formulaciones tópicas comprenden los conjugados de la invención disueltos o suspendidos en uno o más medios, tales como aceite mineral, petróleo, alcoholes polihidroxílicos, u otras bases usadas para formulaciones farmacéuticas tópicas.

50 Además de los ingredientes anteriormente mencionados, las formulaciones de esta invención pueden incluir además uno o más ingrediente(s) accesorio(s) seleccionados de disolventes, tampones, agentes aromatizantes, desintegrantes, agentes tensoactivos, espesantes, lubricantes, conservantes (que incluyen antioxidantes).

55 Por lo tanto, la presente invención contempla la provisión de polímeros adecuados para la estabilización in vitro de interferón-beta 1a en disolución, como una aplicación ilustrativa preferida de aplicación no terapéutica. Los polímeros se pueden emplear, por ejemplo, para incrementar la estabilidad térmica y la resistencia a la degradación enzimática del interferón-beta 1a. El aumento de la estabilidad térmica característica del interferón-beta-1a por medio de la

conjugación en la manera de la presente invención proporciona un medio para mejorar la duración de almacenamiento, la estabilidad a temperatura ambiente y la solidez de los reactivos y equipos de investigación.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención. En particular, se entenderá que los experimentos *in vivo* con animales descritos en la presente memoria se pueden variar de forma que sean posibles otras modificaciones y variaciones de la metodología básica. Por ejemplo, en el Ejemplo 5, un experto en la técnica podría usar otros ensayos de neopterinina o podría alterar el número y el tipo de primates usados. Se debe considerar que estas modificaciones y variaciones de los Ejemplos se hallan dentro del espíritu y del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Estudios de estructura/actividad de interferón-beta-1a humano usando mutaciones por sustitución con alanina/serina: Análisis de los sitios de unión a receptor y de los dominios funcionales

A. Visión de conjunto

Se emprendió un análisis mutacional extensivo de interferón-beta-1a (IFN-beta-1a) humano con objeto de cartografiar los residuos necesarios para la actividad y la unión a receptor. La disponibilidad de la estructura cristalina en 3D de IFN-beta humano (Karpusas, M. et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 11813-11818) permitió identificar para las sustituciones con alanina (o serina) los residuos expuestos al disolvente disponibles para las interacciones con el receptor, y mantener los aminoácidos implicados en los enlaces intramoleculares. Se diseñó un panel de 15 mutaciones por sustitución con alanina que sustituirían entre 2 y 8 residuos a lo largo de distintas regiones de cada una de las hélices (A, B, C, D, E) y giros (AB, CD, DE). Se incluyó una señal de histidina amino-terminal que comprendía seis residuos de histidina para la purificación por afinidad, así como un sitio de escisión de enteroquinasa para la eliminación de la extensión amino-terminal. Los interferones resultantes se denominan "interferón(IFN)-beta marcado con his" o "His-interferón-beta" o "His₆-interferón-beta" y similares.

Se construyeron diversos plásmidos mutantes de expresión de IFN-beta marcado con his usando una construcción del gen de IFN-beta de tipo natural como molde para la mutagénesis. La estrategia de mutagénesis implicó introducir primero sitios de escisión de enzimas de restricción únicos por todo el gen de IFN beta marcado con his de tipo natural, después sustituir las distintas secuencias de ADN entre los sitios de restricción con moléculas bicatenarias de oligonucleótidos sintéticos, que codificaban las mutaciones de sustitución para alanina (o serina). Finalmente, los genes de IFN mutantes se subclonaron en un plásmido que dirigió la expresión en células mamíferas en una línea celular de riñón 293 humana.

Las consecuencias funcionales de estas mutaciones se analizaron en ensayos antivirales y de antiproliferación. Se desarrolló un ensayo de unión de IFN no radiactivo para analizar estos mutantes en su unión al receptor de superficie ("complejo IFNAR1/2") de células de linfoma de Daudi Burkitt humanas. Además, se desarrolló un ensayo para cartografiar las superficies de interacción entre los mutantes de his-IFN-beta e IFNAR2 que empleó una proteína de fusión IFNAR2/Ig, que constaba del dominio extracelular de la proteína receptora de IFN IFNAR2 fusionado con los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana.

1. Creación de un gen de interferón beta como molde para la mutagénesis

La estrategia para generar mutantes sustituidos con alanina (o serina) de IFN-beta fue crear primero un gen de IFN-beta modificado, que codificaba la proteína de tipo natural, pero que portaba sitios de escisión únicos para enzimas de restricción distribuidos a lo largo del gen. Los sitios únicos se usaron para intercambiar las secuencias de tipo natural por moléculas bicatenarias de oligonucleótidos sintéticos, que codificaban los códones mutados. Para obtener un casete de expresión de IFN-beta-1a humano adecuado para la creación de genes mutantes, se amplificó el cADN de IFN-beta (número de acceso de GenBank E00029) mediante PCR. Fue necesario un clonado inicial del gen de IFN-beta en el plásmido pMJB107, un derivado de pACYC184 (véase Rose, et. al., 1988, Nucleic Acids Res. 16 (1) 355) para realizar la mutagénesis dirigida del gen en un plásmido que carecía de los sitios de restricción específicos que se generarían por medio de la mutagénesis.

Los cebadores de PCR usados para subclonar las secuencias codificantes del gen de IFN-beta humano permitieron introducir también un sitio de escisión de enteroquinasa en dirección 5' y en el marco de lectura del gen de IFN-beta (cebador de PCR de 5' 5'-TTCTCCGGAGACGATGATGACAAGATGAGCTACAACCTTGCTTGATTCTACAAA GAAGC-3' (SEQ ID N°: 3: "BET-021"), y cebador de PCR de 3' 5'-GCCGCTCGAGTTATCAGTTTCGGAGGTAACC TGTAAGTC-3' (SEQ ID N°: 4: "BET-022")) y sitios flanqueantes para enzimas de restricción (BspEI y XhoI) útiles para clonar en los sitios del plásmido pMJB107. El ADN resultante se denomina fragmento A de la PCR.

Se introdujo una secuencia señal eficaz de la molécula de adhesión de células vasculares humanas 1 (VCAM-1) y una señal de seis histidinas en la construcción final a partir de un segundo fragmento de ADN creado a partir de pDSW247 (fragmento B). El plásmido pDSW247 es un derivado de pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) del que se ha delecionado el gen EBNA-1, y que porta la secuencia señal VCAM-1 (VCAMss) fusionada en 5' y en el marco de lectura con una señal de seis histidinas. Los cebadores de PCR que se usaron para generar el resto de casete VCAMss-1/señal de histidina fueron KID-369 (cebador de PCR de 5' 5'- AGCTTCCGGGGGCCATCATCATCA TCATAGCT-3': SEQ ID N°: 5) y KID-421 (cebador de PCR de 3' 5'-CCGGAGCTATGATGATGATGATGATGGC CCCC GA-3': SEQ ID N°: 6), que incorporaban sitios de escisión flanqueantes para enzimas de restricción (NotI y BspEI) que permitieron la escisión del fragmento B de ADN.

Para crear un vector plasmídico que llevase la secuencia señal VCAM-1, la señal de his y el gen de interferón-beta se realizó una ligadura triple usando los fragmentos de ADN purificados de un gel a partir del vector plasmídico pMJB107 (escindido con NotI y XhoI), fragmento A de PCR (escindido con BspEI y XhoI) y fragmento B (escindido con NotI y BspEI). El plásmido ligado se usó para transformar células de *E. coli* JA221 o XL1-Blue, y las colonias resistentes a ampicilina se escogieron y se analizó la presencia de insertos mediante análisis de cartografía de restricción. Se hizo ADN Maxiprep y se verificó la secuencia del inserto mediante secuenciación de ADN. La construcción resultante se llamó pCMG260.

2. Creación de mutantes de sustitución con alanina de interferón-beta humano en pCMG260

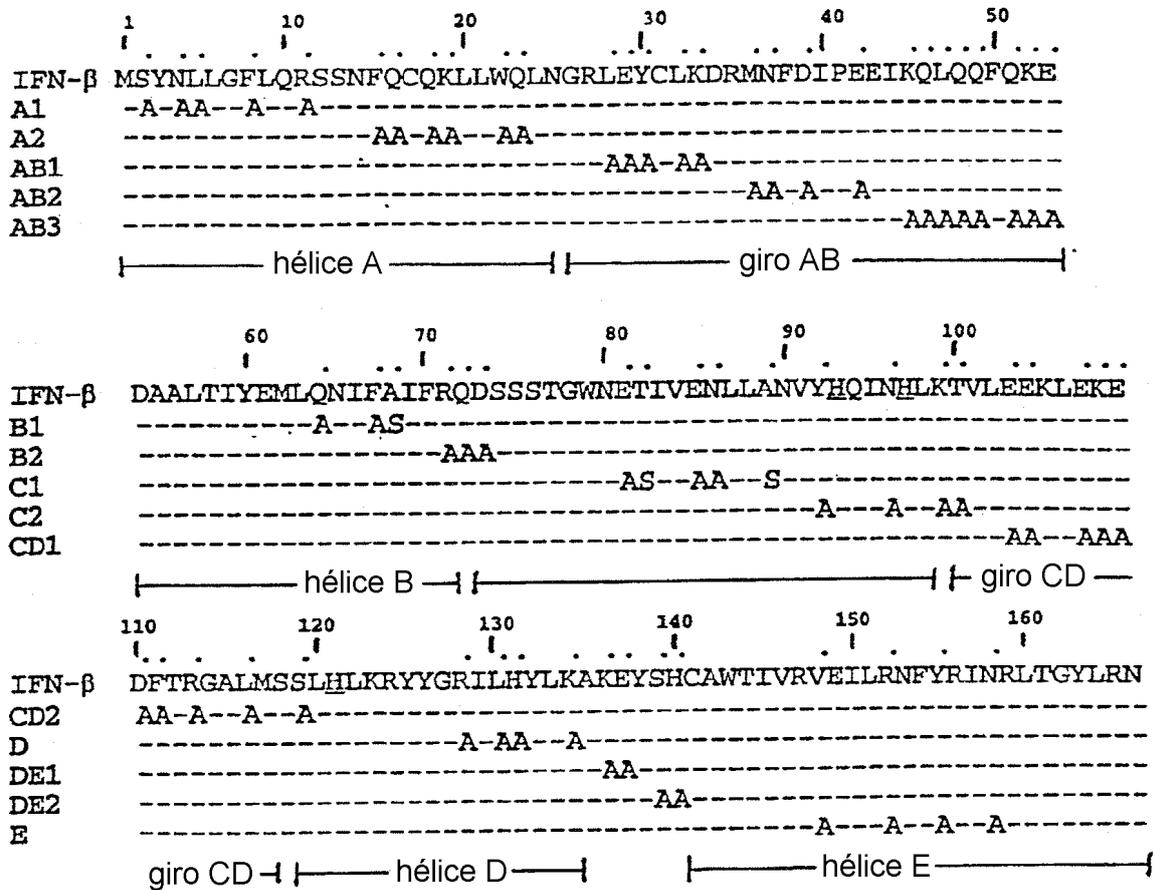
Se usó el plásmido pCMG260 como molde para múltiples rondas de mutagénesis (U.S.E. Site Directed Mutagenesis Kit (Boehringer-Mannheim)), que introdujeron sitios de escisión de restricción únicos en posiciones a lo largo de la secuencia codificante de la proteína de IFN-beta, pero no cambiaron la secuencia resultante de la proteína. Los plásmidos mutados se usaron para transformar las cepas de *E. coli* JA221 o XL1-Blue, y las colonias recombinantes se seleccionaron por su resistencia a cloranfenicol. Se analizó adicionalmente en las colonias resistentes a cloranfenicol la presencia del sitio único deseado para enzima de restricción mediante análisis de cartografía de restricción de ADN. El plásmido de IFN-beta resultante, pCMG275.8, contenía el grupo completo de sitios de escisión únicos para enzima de restricción y se verificó la secuencia de ADN del gen. La secuencia de ADN completa (SEQ ID N°: 1) del gen de interferón beta modificado y marcado con his, junto con la secuencia codificante de la proteína (SEQ ID N°: 2), se dan en la Figura 10.

El grupo completo de las mutaciones por sustitución con alanina se describe en la Tabla 1 (más adelante). Los nombres de los mutantes especifican las regiones estructurales (hélices y giros) en los que se introdujeron las mutaciones. El panel entero de sustituciones con alanina (serina) da como resultado la mutación de 65 de los 165 aminoácidos de IFN-beta humano.

El panel de mutantes se creó a partir de pCMG275.8 sustituyendo segmentos de ADN entre los sitios de restricción únicos con moléculas bicatenarias de oligonucleótidos sintéticos, que portaban la información codificante genética descrita en la Tabla 2 (véase más adelante). Para crear los diversos plásmidos mutantes de sustitución con alanina se ligó vector pCMG275.8 purificado en gel (escindido con la enzima de restricción apropiada, como se indica en la lista más adelante para cada región estructural de IFN-beta) y moléculas bicatenarias de oligonucleótidos (las secuencias de las cadenas codificantes se muestran en la Tabla 2). Las mezclas de ligadura se usaron para transformar la cepa JA221 de *E. coli* y las colonias recombinantes se seleccionaron por su resistencia a ampicilina. Se analizó en las colonias resistentes a ampicilina la presencia de la inserción de las mutaciones cribando los sitios apropiados de las enzimas de restricción. Para dos mutantes (A2 y CD2), la estrategia de clonado supuso usar dos moléculas bicatenarias de oligonucleótidos sintéticos (mostradas en la Tabla 2), que portaban extremos salientes complementarios para permitir que ligasen entre sí y con el esqueleto del vector-IFN-beta en una ligadura triple. La siguiente lista ilustra los sitios que se usaron para clonar los oligonucleótidos mutados de la Tabla 2. El esquema de clonado (subsección B) muestra las posiciones de estos sitios únicos en el gen de interferón beta.

Tabla 1

Posiciones de las mutaciones por sustitución con alanina de ^{HU}IFN-β



5 La línea designada IFN-β muestra la secuencia de IFN-β humano de tipo natural. Las sustituciones con alanina o serina de los residuos de IFN-β se muestran para cada uno de los mutantes y los puntos, debajo de las regiones relevantes, indican las secuencias de tipo natural. Las hélices y estructuras en giro se indican como líneas continuas debajo de los mutantes. El giro DE se extiende en el hueco entre las hélices D y E. Se generaron dos mutantes por sustitución con alanina adicionales (H93A, H97A y H121A) y se analizaron en ensayos antivirales para analizar los efectos de mutar estas histidinas, que quelan cinc en el dímero de la estructura cristalina. Ambos mutantes mantuvieron la actividad de tipo natural completa en los ensayos antivirales, lo que sugiere que la formación del dímero mediada por cinc no es importante para la actividad de IFN-β.

10

Tabla 2

A1	SEQ ID	CCGGAGACGATGATGACAAGATGGCTTACGCCGCTCTTGGAGC
	Nº: 7	CCTACAAGCTTCTAGCAATTTTCAGTGTCAGAAGCTCCTGTGGC
	BET-053	
A2	SEQ ID	GATCTAGCAATGCTGCCTGTGCTGCCCTCCTGGCTGCCTTGAATGGGAGGCTT
	Nº: 8	GAATACT
	BET-039	
	SEQ ID	GCCTCAAGGACAGGATGAACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCA
	Nº: 9	
	BET-041	

ES 2 447 772 T3

AB1 SEQ ID AATTGAATGGGAGGGCTGCAGCTTGCCTGCAGACAGGATGAACTTTGACATC
 N°: 10
 BET-080

AB2 SEQ ID AATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGGCTGCATTTGCTATC
 N°: 11
 BET-082

AB3 SEQ ID AATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATGAACTTTGACA
 N°: 12
 BET-084

SEQ ID TCCCTGAGGAGATTGCTGCAGCTGCAGCTTTTCGCTGCAGCTGA
 N°: 13
 BET-086

B1 SEQ ID CGCCGCGTTGACCATCTATGAGATGCTCGCTAACATCGCTAGCATTTTCAGACA
 N°: 14
 BET-110

B2 SEQ ID CGCCGCATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCGCTGC
 N°: 15
 BET-112

C1 SEQ ID GGAATGCTTCAATTGTTGCTGCACTCCTGAGCAATGTCTATCATCAGATAAACC
 N°: 16
 BET-114

C2 SEQ ID GGAATGAGACCATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCGCTCATCAGATAGCA
 N°: 17
 BET-092

CD1 SEQ ID CTAGCTGCAAAACTGGCTGCAGCTGATTTACCAGGGGAAAAC
 N°: 18
 BET-094

CD2 SEQ ID CTAGAAGAAAACTGGAGAAAAGAAGCAGCTACCGCTGGAAAAGCAATGAGCGC
 N°: 19
 BET-096

SEQ ID TATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGAGTACTCACACTGT
 N°: 20
 BET-106

D1 SEQ ID CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGGCAATTGCTGCATACCTGG
 N°: 21
 BET-108

DE1 SEQ ID CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAA
 N°: 22
 BET-116

GGCCGCTGCATACTCACACTGTGCCTGGACGAT

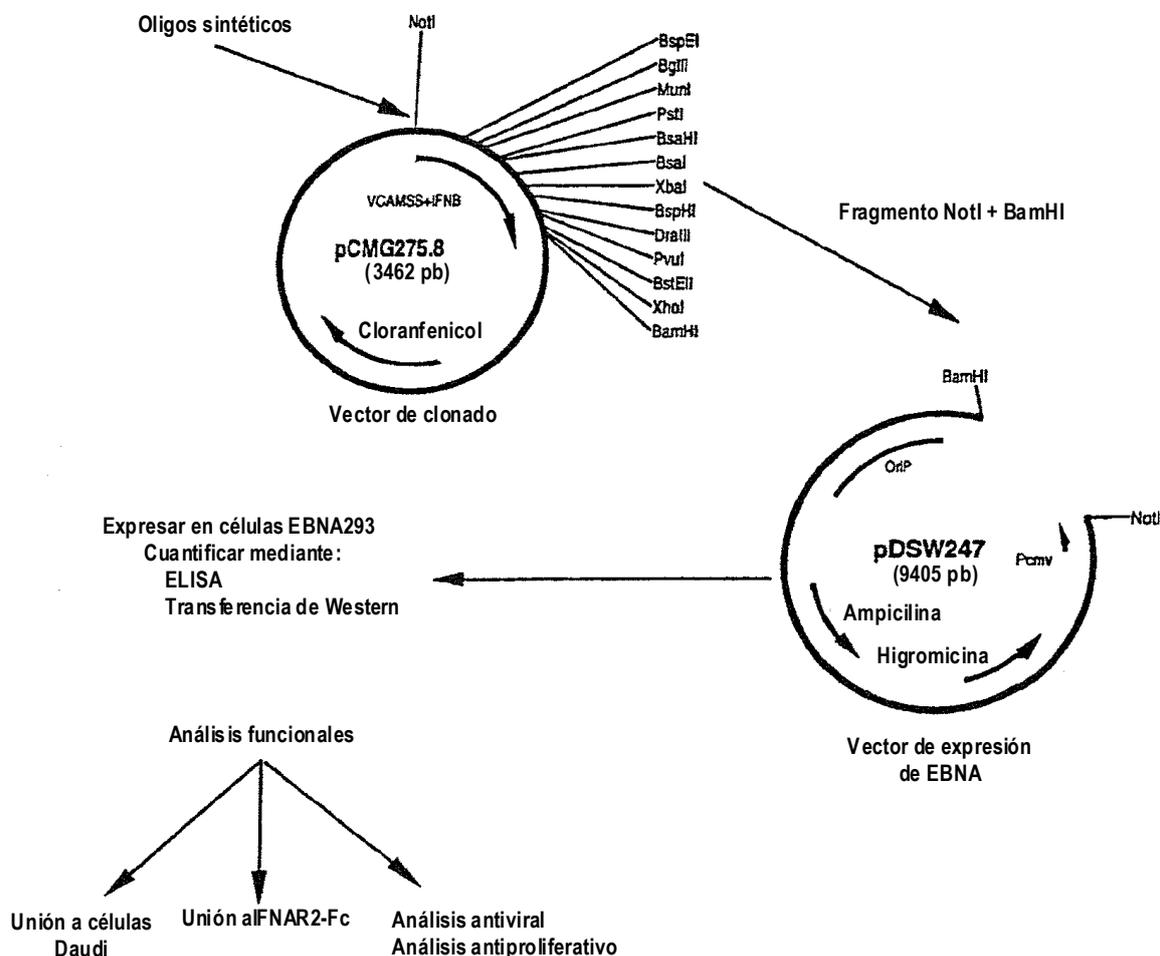
DE2	SEQ ID	CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAA
	Nº: 23	GGCAAAGGAGTACGCTGCATGTGCCTGGACGAT
	BET-118	
E1	SEQ ID	CGTCAGAGCTGAAATCCTAGCAAACCTTTGCATTCATTGCAAGACTTACAG
	Nº: 24	
	BET-104	

B. Construcción de plásmidos de expresión de EBNA 293

Los genes de IFN-beta de tipo natural y mutante, fusionados con la secuencia señal VCAM-1, señal de his y sitio de escisión de enteroquinasa, se purificaron en gel como fragmentos de restricción de NotI y BamHI de 761 pares de bases. Los genes purificados se subclonaron en el vector plasmídico pDSW247 escindido con NotI y BamHI, como se describe en el esquema. El plásmido pDSW247 es un vector de expresión para la expresión transitoria de proteína en células renales EBNA 293 humanas (Invitrogen, Carlsbad, CA). Contiene el promotor de genes tempranos de citomegalovirus y elementos reguladores de VEB que son necesarios para la expresión génica de nivel elevado en ese sistema, así como marcadores seleccionables para E. coli (resistencia a ampicilina) y células EBNA 293 (resistencia a higromicina) como se observa en el esquema de la estrategia de clonado (más adelante). Los plásmidos ligados se usaron para transformar células de E. coli JA221 o XL1-Blue, y las colonias resistentes a ampicilina se recogieron y se analizó la presencia de insertos mediante análisis de cartografía de restricción. Se hizo ADN Maxiprep y se verificó la secuencia de los insertos mediante secuenciación de ADN. Los clones positivos que mostraban las secuencias mutadas deseadas se usaron para transfectar células renales EBNA 293 humanas como se describe más adelante.

15 La estrategia de clonado global se presenta a continuación:

Representación esquemática de la estrategia de clonado y plásmidos de expresión de IFN-β



C. Expresión y cuantificación de mutantes por sustitución con alanina de IFN-beta-1a

Las células EBNA 293 humanas (Invitrogen, Carlsbad, CA, Chittenden, T. (1989) J. Virol. 63: 3016-3025) se mantuvieron como cultivos subconfluentes en medios de Eagle modificados por Dulbecco complementados con un 10% de suero bovino fetal, glutamina 2 mM y 250 µg/ml de geneticina (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Los plásmidos de expresión pDSW247 se transfirieron transitoriamente en células EBNA 293 usando el protocolo de lipofectamina (Gibco/BRL, Life Technologies). Se recolectaron los medios condicionados 3-4 días después de la transfección, los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación, y se cuantificó la concentración de his-IFN-beta mediante ELISA.

El análisis ELISA se realizó usando anticuerpos policlonales de conejo (IgG purificada con proteína A, los anticuerpos se habían obtenido para IFN-beta-1a humano purificado) para revestir placas de ELISA de 96 pocillos y se usó una forma biotinilada de la misma IgG policlonal de conejo como reactivo secundario para permitir la detección de interferón usando peroxidasa de rábano unida a estreptavidina (HRP: Jackson ImmunoResearch, W. Grove, PA). Se usó una serie de diluciones de interferón-beta-1a para generar curvas de concentración estándar. Este medio condicionado que contenía his-IFN-beta de transfectantes de EBNA se diluyó para obtener muestras con concentraciones que oscilaban entre 10 ng/ml y 0,3 ng/ml en el análisis ELISA. Para confirmar las concentraciones de IFN-beta de los medios determinadas mediante ELISA, se realizó análisis de transferencia de Western. Los sobrenadantes del cultivo reducidos y los patrones de IFN-beta-1a se sometieron a SDS-PAGE en geles en gradiente del 10-20% (Novex, San Diego, CA) y se transfirieron a membranas PDVF. Las bandas inmunorreactivas se detectaron con antisuero anti-IFN-beta-1a policlonal de conejo (nº 447, Biogen, Inc., un segundo antisuero que se había obtenido para IFN-beta-1a), seguido de tratamiento con IgG anti-conejo de burro unida a HRP (Jackson ImmunoResearch).

D. Análisis de la unión a receptor de los mutantes de interferón-beta

Las propiedades de unión a receptor de los mutantes de interferón-beta descritos en C se analizaron usando dos análisis de unión diferentes. Un análisis midió la unión de los mutantes de interferón-beta a una proteína de fusión, IFNAR2/Ig, que comprendía el dominio extracelular de la cadena del receptor IFNAR2 humano fusionado con parte de la región constante de una IgG humana. IFNAR2-Fc se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO) y se purificó mediante cromatografía de afinidad en Sepharose con proteína A según las instrucciones del fabricante (Pierce Chem. Co., Rockford, IL, nº de catálogo 20334). La unión de mutantes de interferón-beta a IFNAR2-Fc se midió en un análisis con formato ELISA. Las placas de ELISA se prepararon revistiendo placas de 96 pocillos de fondo plano durante la noche a 4°C con 50 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal IgG anti-humano de ratón (CDG5-AA9, Biogen, Inc.) de 10 µg/ml en tampón de revestimiento (NaHCO₃ 50 mM, MgCl₂ 0,2 mM, CaCl₂ 0,2 mM, pH 9,6). Las placas se lavaron dos veces con PBS que contenía 0,05% de Tween-20, y se bloquearon con 0,5% de leche en polvo desnatada en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de dos lavados más, se añadieron 50 µl de 1 µg/ml de IFNAR2-Fc en 0,5% de leche en PBS que contenía 0,05% de Tween-20 a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, y las placas se lavaron después dos veces más. La unión de los mutantes de interferón-beta a IFNAR2-Fc se midió añadiendo 50 µl/pocillo de interferón-beta mutante en medio condicionado, diluido en serie en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con un 10% de suero bovino fetal, e incubando durante 2 horas a 4°C. Las diluciones de mutante de interferón-beta oscilaron típicamente de aproximadamente 1 µM hasta 10 pM. Después de lavar, el interferón-beta unido a las placas se detectó añadiendo 50 µl/pocillo de una mezcla que consistía en una dilución 1:1000 de un anticuerpo anti-interferón policlonal de conejo (nº 447) más IgG anti-conejo de burro marcada con peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch), e incubando durante 15 minutos a 4°C. Después de dos lavados, se añadió sustrato de HRP, y la placa se incubó a 4°C antes de leerse en un lector de placas de ELISA a una absorbancia de 450 nm. Los datos se trazaron como absorbancia respecto de la concentración de interferón-beta mutante, y se determinó la afinidad para la unión del interferón-beta mutante a IFNAR2-Fc ajustando los datos a una ecuación de unión hiperbólica simple. Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 1, en la que la afinidad de unión para cada mutante, determinada al menos en tres experimentos independientes, se expresa como un porcentaje de la medida para interferón-beta-1a de tipo natural con His₆.

Se usó un segundo análisis de unión a receptor para medir la afinidad con la que los mutantes de interferón-beta se unieron a células Daudi que expresaban ambas cadenas del receptor, IFNAR1 y IFNAR2, que juntas comprenden el receptor para interferón-beta. Este análisis basado en FACS usó un anticuerpo monoclonal bloqueante dirigido contra el dominio extracelular de IFNAR1, EA12 (Biogen, Inc.), para distinguir el receptor sin ocupar (libre) del receptor al que se ha unido interferón-beta. Las células Daudi (20 µl a 2,5 x 10⁷ células/ml) se colocaron en placas de ELISA de fondo en V de 96 pocillos, y se incubaron durante 1 hora a 4°C con diversas concentraciones de mutante de interferón-beta (20 µl en tampón de FACS; 5% de FBS, 0,1% de NaN₃ en PBS). Las diluciones en serie deseadas de mutantes de interferón-beta oscilaron desde 0,5 µM hasta 0,5 pM. Se añadió a cada pocillo 100 ng de anticuerpo EA12 monoclonal anti-IFNAR1 murino biotinilado (10 µl), y las placas se incubaron durante 2 minutos adicionales a temperatura ambiente antes de lavarse dos veces con tampón de FACS (4°C). Las células se incubaron después durante 30 minutos a 4°C con 50 µl/pocillo de una dilución 1:200 de estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch), se lavaron dos veces con tampón de FACS, se resuspendieron en 300 µl de tampón de FACS que contenía 0,5% de paraformaldehído, y se transfirieron a tubos de poliestireno de 12x75 mm (Falcon 2052). Las muestras se analizaron después mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton

Dickinson). Los datos se dibujaron como intensidad de fluorescencia media por canal (IFMC) respecto de la concentración de mutante de interferón-beta; las afinidades de unión se definieron como la concentración de mutante de interferón-beta que daba un 50% de inhibición de tinción con anticuerpo. Cada mutante se ensayó múltiples veces. La Figura 2 muestra las afinidades de unión a receptor para cada mutante de interferón-beta, determinadas mediante este método, expresadas como un porcentaje de la afinidad medida para interferón-beta-1a de tipo natural con His₆ en cada experimento.

E. Análisis de los mutantes de interferón-beta por función

Se analizó también la actividad funcional de los mutantes de interferón-beta usando ensayos *in vitro* de actividad antiviral y la capacidad del interferón-beta para inhibir la proliferación celular. Se realizó con cada mutante un mínimo de tres ensayos antivirales, cada uno con puntos por triplicado. Se incluyó interferón-beta-1a de tipo natural con His₆ como referencia en cada experimento. Los ensayos antivirales se realizaron tratando células de carcinoma de pulmón humanas A549 (ATCC CCL 185) durante la noche con diluciones en serie a un medio de interferón-beta mutante a concentraciones que abarcaban el intervalo entre la protección antiviral completa y un estado sin protección de muerte celular viral. El siguiente día, las células se expusieron durante dos días a virus de encefalomiocarditis (ECMV) a una dilución que dio como resultado la muerte celular completa en ausencia de interferón. Las placas se revelaron después con la tinción metabólica MTT (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil]-2H-tetrazolio-5-carboxianilida) (M5655, Sigma, St. Louis, MO). Se preparó una disolución madre de MTT de 5 mg/ml en PBS y se filtró de forma estéril, y se diluyeron 50 µl de esta disolución en cultivos celulares (100 µl por pocillo). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 - 60 minutos, la disolución MTT/medios se desechó, las células se lavaron con 100 µl de PBS, y finalmente la tinción metabolizada se solubilizó en 100 µl de ácido clorhídrico 1,2 N en un 90% de isopropanol. Se cuantificaron las células viables (como evidenció la presencia de la tinción) mediante absorbancia a 450 nm. Los datos se analizaron trazando la absorbancia respecto de la concentración de mutante de interferón-beta, y la actividad de cada mutante se definió como la concentración a la que el 50% de las células murieron. La Figura 3 muestra la actividad de cada mutante expresada como porcentaje de la actividad medida para el interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his en cada experimento.

Los mutantes de interferón-beta también se analizaron en cuanto a su función en un ensayo de antiproliferación. Se cultivaron células de linfoma de Daudi Burkitt humanas (ATCC n° CCL 213) a 2×10^5 células/ml en RPMI 1620 complementado con un 10% de suero bovino fetal definido (Hyclone, Logan Utah), y L-glutamina 2 mM. Cada pocillo también contenía una concentración dada de mutante de interferón-beta en un volumen final total de 100 µl de medio por pocillo; las concentraciones de interferón-beta usadas se eligieron para abarcar el intervalo desde la inhibición máxima de proliferación de células de Daudi hasta la ausencia de inhibición (es decir, proliferación completa). Se usaron puntos experimentales duplicados para cada concentración de mutante de interferón-beta probada, y se incluyó un grupo duplicado de células sin tratar en todos los experimentos. Las células se incubaron durante dos días a 37°C en incubadores con un 5% de CO₂, después de lo cual se añadió a cada pocillo 1 µCi de timidina tritiada ((metil-³H) timidina, Amersham TRK758) en 50 µl de medio, y se incubó durante otras 4 h. Las células se recogieron usando un recolector de placas LKB, y se midió la incorporación de timidina tritiada usando un lector de placas beta LKB. Se hallaron las medias de los valores experimentales duplicados y se determinaron las desviaciones estándar. Los datos se dibujaron como cuentas medias por minuto respecto de la concentración de mutante de interferón-beta, y la actividad de cada mutante se definió como la concentración necesaria para dar un 50% de la inhibición máxima observada del crecimiento. Se realizaron múltiples ensayos para cada mutante. La Figura 4 muestra los resultados expresados como porcentaje de la actividad hallada para interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his en cada experimento.

F. Propiedades de los mutantes de interferón-beta

Se descubrió que el interferón-beta-1a de tipo natural marcado con histidina tenía actividades en los ensayos antivirales y de antiproliferación que eran alrededor de tres veces menores que las actividades correspondientes halladas para interferón-beta-1a de tipo natural sin marcar. Debido a que todos los mutantes de interferón-beta A1-E contienen la secuencia señal de his en sus extremos N-terminales, los efectos de las mutaciones sobre las propiedades de la molécula se determinaron comparando las actividades de estos mutantes en ensayos antivirales, de antiproliferación y de unión para la actividad observada para el interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his. Al hacerlo, se asume que las variaciones en las actividades de los mutantes A1-E, comparadas con el interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his, son cualitativamente y cuantitativamente más o menos las mismas que los efectos que estas mismas mutaciones tendrían en ausencia de la señal de his N-terminal. La suposición equivalente para construcciones marcadas o fusionadas de otras citocinas solubles es considerada como verdadera por los practicantes de la técnica de mutagénesis de barrido de alaninas, especialmente cuando la actividad funcional *in vitro* de la construcción marcada o fusionada es cercana a la de la citocina de tipo natural, como es el caso aquí. Véase, por ejemplo, Pearce K.H. Jr, et al., *J. Biol. Chem.* 272: 20595-20602 (1997) y Jones J.T., et al., *J. Biol. Chem.* 273: 11667-11674 (1998).

Los datos mostrados en las Figuras 1-4 sugieren tres tipos de efectos que estuvieron causados por la mutagénesis dirigida. Estos efectos pueden ser ventajosos para el desarrollo de fármacos de interferón en ciertas circunstancias. Los tres tipos de efectos son los siguientes: (a) mutantes con actividad antiviral superior a la del interferón-beta-1a de tipo natural (p.ej., mutante C1); (b) mutantes que exhiben actividad tanto en ensayos antivirales como en ensayos

de antiproliferación, pero para los cuales la actividad de antiproliferación es desproporcionadamente baja con respecto a la actividad antiviral, comparado con el interferón-beta-1a de tipo natural (p.ej., mutantes C1, D y DE1); y (c) antagonistas funcionales (p.ej., A1, B2, CD2 y DE1), que muestran actividades antiviral y antiproliferativa que son desproporcionadamente bajas con respecto a la unión a receptor, comparado con el interferón-beta-1a de tipo natural. Se puede observar que algunos mutantes están incluidos en más de una clase. Estas clases se analizan más adelante. Aunque se han caracterizado estas clases de mutantes con respecto a los ejemplos enumerados, se debería apreciar que otras mutaciones en estas regiones pueden dar como resultado efectos similares, o incluso aumentados sobre la actividad:

(a) El mutante C1 posee una actividad antiviral que es aproximadamente seis veces mayor que la del interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his. Se predice que este mutante y otros de este tipo son útiles para reducir la cantidad de interferón-beta que se debe administrar para alcanzar un nivel dado de efecto antiviral. Se espera que reducir la cantidad de proteína administrada reduzca la inmunogenicidad de la proteína, y también puede reducir los efectos secundarios de toxicidades que no se basan en el mecanismo. Se predice que las mutaciones en esta clase son ventajosas en situaciones en las que el beneficio terapéutico de la administración de interferón-beta resulta de sus efectos antivirales, y en las que los efectos antiproliferativos contribuyen a la toxicidad o a efectos secundarios indeseados.

(b) Las actividades relativas (% de tipo natural) de los mutantes sustituidos con alanina en el ensayo antiviral y de antiproliferación se comparan en la Figura 5. Se observan actividades modificadas de forma coordinada (es decir, actividades antivirales y de antiproliferación que difieren por el mismo factor de las actividades del interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his) en la mayoría de los mutantes (los que se encuentran en la línea diagonal). Sin embargo, varios mutantes muestran alteraciones mayores de actividad en un ensayo respecto del otro, comparado con interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his, como evidencia el desplazamiento de la diagonal. Se muestran tres mutantes tales en la Tabla 3 más adelante. El mutante C1 muestra una actividad antiviral que es seis veces superior que la de interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his, pero su actividad en el ensayo de antiproliferación es similar a la del de tipo natural. El mutante C1 tiene actividad antiviral que está aumentada en un factor de 5,2 sobre su actividad de antiproliferación respecto del interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his. De forma similar, el mutante D exhibe un 65% de actividad de tipo natural en el ensayo antiviral, pero solamente un 20% de actividad de tipo natural en el ensayo de antiproliferación, y así tiene actividad antiviral que está aumentada 3,4 veces sobre su actividad de antiproliferación comparado con el tipo natural. El mutante DE1 exhibe un 26% de la actividad de tipo natural en el ensayo antiviral, pero solamente un 8,5% en el ensayo de antiproliferación, y así tiene actividad antiviral que está aumentada 3,0 veces sobre su actividad de antiproliferación comparado con el interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his. Cuando se administren a una concentración suficiente para alcanzar un nivel deseado de actividad antiviral, estas proteínas mutantes mostrarán niveles sustancialmente inferiores de actividad antiproliferativa que la proteína de tipo natural. Se predice que las mutaciones de esta clase, como las de la clase (a), son ventajosas en situaciones en las que el beneficio terapéutico de la administración de interferón-beta resulta de sus efectos antivirales, y en las que los efectos antiproliferativos contribuyen a la toxicidad o a efectos secundarios indeseados.

Tabla 3

Mutante	Actividad antiviral (AV) (% de tipo natural)	Actividad antiproliferativa (AP) (% de tipo natural)	AV/AP
C1	571	109	5,2
D	65	19	3,4
DE1	26	8,5	3,0

(c) Mutantes con actividades antiviral y antiproliferativa que son bajas con respecto a la unión a receptor, comparado con el interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his (véase la Tabla 4 más adelante). El mutante A1 exhibe actividades antiviral y antiproliferativa que son 2,0 veces y 1,8 veces mayores que la observada para interferón-beta-1a de tipo natural marcado con his, pero se une al receptor afín de las células Daudi con una afinidad que es 29 veces mayor que la del de tipo natural. La unión de este mutante al receptor de IFN-beta se aumenta así aproximadamente 15 veces comparado con las actividades antiviral y de antiproliferación de la proteína. De forma similar, los mutantes B2, CD2 y DE1 muestran aumentos de la unión sobre la actividad antiviral de 4,6, 4,6 y 18 veces, respectivamente, y sobre la actividad de antiproliferación de 3,5, 15 y 54 veces. Se predice que estas proteínas son útiles como antagonistas funcionales de la actividad de IFN-beta endógeno, y posiblemente de otros interferones de tipo I endógenos, debido a que tienen la capacidad de unirse y ocupar el receptor, y sin embargo generan solamente una pequeña fracción de la respuesta funcional en las células de interés que se observaría con IFN-beta de tipo natural.

Tabla 4

Mutante	Actividad antiviral (AV) (% t. n.)	Actividad antiproliferativa (AP) (% t. n.)	Actividad de unión a células (% t. n.)	Unión/AV	Unión/AP
A1	200	180	2900	15	16
B2	7,1	9,2	33	4,6	3,5
CD2	150	46	690	4,6	15
DE1	26	8,5	460	18	54

G. Relación de las muteínas con la estructura tridimensional de interferón

5 Aunque las estructuras cristalinas publicadas para una forma sin glicosilar de interferón beta murino (T. Senda, S. Saitoh y Y. Mitsui. Refined Crystal Structure of Recombinant Murine Interferon- β at 2.15 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 253: 187-207 (1995)) y para interferón alfa-2b humano (R. Radhakrishnan, L.J. Walter, A. Hruza, P. Reichert, P.P. Trotta, T.L. Nagabhushan y M.R. Walter. Zinc Mediated Dimer of Human Interferon- α 2b Revealed by X-ray Crystallography. *Structure*. 4: 1453-1463 (1996)) han proporcionado modelos para el esqueleto polipeptídico del interferón beta humano, se ha resuelto recientemente la estructura para el interferón-beta-1a en su estado glicosilado (M. Karpusas, M. Nolte, C.B. Benton, W. Meier, W.N. Lipscomb, y S.E. Goelz. The Crystal Structure of Human Interferon- β at 2.2 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11813-11818 (1997)).

10 Los resultados de los análisis de mutación se pueden resumir con respecto a la estructura 3D de interferón-beta-1a (no presentada en la presente memoria). Ciertas mutaciones crearon una reducción en la actividad (2 a >5 veces reducida). Las regiones mutadas correspondieron a las sustituciones dadas en las tablas 1 y 2. Los residuos importantes para la actividad antiviral y de antiproliferación se localizan en la mitad inferior de la molécula de IFN-beta-1a (panel a y b). Las mutaciones en la mitad superior de la molécula, en la que están situados los extremos amino- y carboxi-terminal, no tuvieron efecto sobre las actividades biológicas o sobre la unión a receptor.

15 Las mutaciones en la hélice A2, giros AB, AB2 y hélice E son las más significativas en su efecto sobre la función, y dieron como resultado una reducción drástica tanto en la actividad como en la unión a receptor de superficie celular. Esta región (hélice A2, giros AB y AB2 y hélice E) corresponde al sitio de unión de IFNAR2, ya que ninguno de estos mutantes unió IFNAR/Fc en el ensayo.

20 Aunque esas mutaciones que eran importantes para la unión a IFNAR2 también afectaron a la unión celular, las propiedades de unión a superficie celular también están influenciadas por residuos en otras regiones de la molécula (hélice B1, hélice C2). Se puede observar en los modelos 3D (no presentados en la presente memoria) que describen los efectos de los mutantes por sustitución con alanina que las regiones N-terminal, C-terminal y hélice C glicosilada de la molécula de IFN-beta-1a no se encuentran dentro del sitio de unión a receptor. Las mutaciones en estas regiones no redujeron la actividad biológica o la unión a receptor de superficie celular.

Ejemplo 2: Preparación y caracterización de interferón-beta-1a conjugado

A. Preparación de interferón PEGilado.

30 Se diluyó intermedio en bruto de interferón-beta-1a sin formular (vendido como AVONEX®) a 250 μ g/ml en fosfato sódico 100 mM de pH 7,2, NaCl 200 mM) con un volumen igual de MES 100 mM de pH 5,0, y el pH se ajustó a 5,0 con HCl. La muestra se cargó en una columna SP-Sepharose® FF (Pharmacia, Piscataway, NJ) a 6 mg de interferón-beta-1a/ml de resina. La columna se lavó con fosfato sódico 5 mM de pH 5,5, NaCl 75 mM, y el producto se eluyó con fosfato sódico 30 mM de pH 6,0, NaCl 600 mM. Se analizaron los valores de absorbancia de las fracciones de elución a 280 nm, y la concentración de interferón de las muestras se estimó a partir de la absorbancia usando un coeficiente de extinción de 1,51 para una disolución de 1 mg/ml.

35 A una disolución de 1 mg/ml del interferón-beta-1a del eluido de SP se le añadió fosfato sódico 0,5 M de pH 6,0 hasta 50 mM, cianoborohidruro sódico (Aldrich, Milwaukee, WI) a 5 mM, y aldehído de PEG 20K (Shearwater Polymers, Huntsville, AL) a 5 mg/ml. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 20 horas. El interferón pegilado se purificó de los productos de reacción mediante etapas de cromatografía secuencial en una columna de separación por tamaño de FPLC Superose® (Pharmacia) con fosfato sódico 5 mM de pH 5,5, NaCl 150 mM como fase móvil y SP-Sepharose® FF. La columna de separación por tamaño dio como resultado la separación inicial de interferón beta modificado y sin modificar (cromatograma no presentado en la presente memoria). La mezcla de elución que contenía PEG-interferón beta procedente de la filtración en gel se diluyó 1:1 con agua y se cargó a 2 mg de interferón beta/ml de resina en una columna de SP-Sepharose®. La columna se lavó con fosfato sódico 5 mM de pH 5,5, NaCl 75 mM, y después el interferón beta pegilado se eluyó de la columna con fosfato sódico 5 mM de pH 5,5, NaCl 800 mM. Se analizó el contenido de proteína en las fracciones de elución mediante

absorbancia a 280 nm. La concentración de interferón pegilado se informa en equivalentes de interferón, ya que el resto de PEG no contribuyó a la absorbancia a 280 nm

B. Caracterización bioquímica del interferón PEGilado.

5 Se analizó el grado de modificación en las muestras mediante SDS-PAGE (gel no presentado en la presente memoria). La adición de un único PEG dio como resultado un desplazamiento en la masa aparente de interferón de 20 kDa a 55 kDa, que fue fácilmente aparente en el análisis. En la muestra pegilada no había indicios de interferón-beta-1a sin modificar ni de formas con masa superior resultantes de la presencia de grupos PEG adicionales. La presencia de un único PEG se verificó mediante espectrometría de masas MALDI. La especificidad de la reacción de pegilación se analizó mediante cartografía de péptidos. Se digirieron alícuotas de 20 µg de interferón-beta-1a pegilado y sin modificar como control, en 240 µl de Tris-HCl 200 mM de pH 9,0, EDTA 1 mM con 1,5 µg de lisil-endopeptidasa de *Achromobacter* (Wako Bioproducts, Richmond, VA) durante 3-4 horas a 27°C. Se añadieron 200 mg de guanidina HCl a cada muestra y los productos de escisión se fraccionaron en una columna Vydac C₄ (0,46 x 25 cm) usando un gradiente de 30 min desde 0 hasta 70% de acetonitrilo, en 0,1% de TFA con un caudal de 1,4 ml/min. Se monitorizó la absorbancia a 214 nm en el efluente de la columna.

15 Los resultados del análisis se muestran en la Figura 6. Todos los péptidos predichos de la digestión con lisil-endopeptidasa de interferón-beta-1a se han identificado mediante secuenciación N-terminal y espectrometría de masas y de éstos, solamente el péptido que contiene el extremo N-terminal de interferón (AP8) se alteró por la modificación, como es evidente por su desaparición del gráfico. Los datos de cartografía indican, por lo tanto, que el resto de PEG está unido específicamente a este péptido. Los datos indican además que la modificación con PEG se dirige al extremo N-terminal de la proteína, ya que solamente la modificación N-terminal daría como resultado la pérdida específica de este péptido.

25 Se obtuvieron indicios adicionales para esta conclusión aislando el péptido N-terminal PEGilado de la digestión con lisil-endopeptidasa, digiriendo el péptido adicionalmente con bromuro de cianógeno (CNBr) y sometiendo a esta muestra a análisis de secuencia mediante descomposición metaestable por desorción/ionización con láser asistida por matriz (MALDI PSD). La digestión con CNBr del péptido N-terminal escindiría adicionalmente este péptido en dos fragmentos, la metionina terminal (M1) que contiene el resto de PEG y SYNLLGFLQR (residuos 2-11 de la secuencia de interferón beta maduro). El análisis de la secuencia identificó el péptido sin modificar SYNLLGFLQR, que era el resultado predicho de este tratamiento.

30 La actividad antiviral de las muestras de interferón-beta-1a se analizó con células de carcinoma de pulmón humanas (células A549) que se habían expuesto a virus de encefalomiocarditis (EMC) usando los procedimientos que implican la tinción con MTT resumidos anteriormente. Brevemente, las células A549 se pretrataron durante 24 horas con interferón-beta-1a o interferón-beta-1a modificado con PEG (4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 75, 62,5, 31,25, 50, 33,3, 22,2, 14,8, 9,9, 6,6, 4,39 pg/ml) antes de la exposición al virus. El análisis se realizó usando puntos duplicados para cada concentración de interferón-beta-1a. Las desviaciones estándar se muestran como barras de error en la Figura 7. La concentración de interferón-beta-1a (formulada o en bruto) que ofreció el 50% de destrucción viral (el "efecto citopático del 50%") (50% de la DO₄₅₀ máxima) fue de alrededor de 11 pg/ml, y el efecto citopático del 50% para interferón-beta-1a modificado con PEG fue alrededor de 11 pg/ml. Así, la conjugación de PEG no alteró la actividad antiviral de interferón-beta-1a. En este ensayo, se descubre de forma rutinaria que la actividad específica de interferón-beta-1a es alrededor de 10 veces mayor que la actividad específica de interferón-beta-1b, y por lo tanto interferón-beta-1a PEGilado es significativamente más activo que cualquier producto de interferón-beta-1b.

45 Se PEGiló también interferón-beta-1a con un resto de PEG 5K-aldehído que se adquirió de Fluka, Inc. (n° cat. 75936, Ronkonkoma, NY) siguiendo el mismo protocolo descrito para la modificación con aldehídos de PEG 20K, excepto que la reacción contenía 2 mg/ml de PEG 5K. La modificación con el PEG 5K fue también sumamente específica para el extremo N-terminal y no alteró la actividad antiviral de interferón-beta-1a. Como el aducto 20K, el interferón-beta-1a modificado con PEG 5K fue indistinguible del interferón-beta-1a sin modificar en el ensayo antiviral.

Ejemplo 3: La PEGilación protege al interferón-beta-1a de la agregación inducida por agresión

50 La agregación de interferón beta es un efecto perjudicial para la actividad. Previamente se ha demostrado que la glicosilación tiene un efecto drástico sobre la estabilidad de interferón-beta-1a respecto de las formas sin glicosilar de interferón beta, y se ha deducido que la glicosilación contribuye a la actividad específica superior de interferón-beta-1a (Runkel L. et al., *Pharm. Res.* 15: 641-649). Para investigar si la conjugación con polímero de polialquilenglicol podría estabilizar adicionalmente interferón beta, se sometió al interferón-beta-1a PEGilado a agresión térmica usando el siguiente protocolo:

55 Se llevó a cabo la desnaturalización térmica usando un espectrofotómetro de UV-visible CARY 3 con un soporte de cubetas controlado por ordenador y calentado de forma termoeléctrica. Las disoluciones de interferón-beta-1a en HEPES 20 mM de pH 7,5, NaCl 20 mM se equilibraron a 25°C en una cubeta de 1 ml. La temperatura del soporte de cubetas se elevó de 25°C a 80°C a una velocidad de 2°C/min, y la desnaturalización de la proteína se siguió

mediante monitorización continua de la absorbancia a 280 nm. Se obtuvo el punto medio del suceso de desplegamiento cooperativo, T_m , a partir de las curvas de desnaturalización, determinando la temperatura a la que la absorbancia medida estuvo a medio camino entre los valores definidos por las líneas extrapoladas de las regiones lineales de cada lado de las transiciones de desplegamiento cooperativo.

- 5 Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 8. Mientras el interferón-beta-1a sin PEGilar se desnaturalizó y agregó con un punto de transición del 50% a 60°C, no hubo indicios de agregación para el interferón PEGilado incluso a 80°C. En un análisis independiente, se amplió el tratamiento de agresión térmica a 95°C, e incluso a esta temperatura más elevada no se observaron indicios de agregación. Así, la conjugación con este polímero de polietilenglicol tiene un efecto profundo y beneficioso para la estabilidad de la proteína. Se observó una
10 estabilización similar con interferón-beta-1a modificado que contenía los PEG de 20K y 5K.

Ejemplo 4. Medida de la actividad antiviral de interferón-beta-1a en el plasma de ratones tratados con interferón-beta-1a e interferón-beta-1a PEGilado

- 15 Se inyectó i.v. a ratones (C57B1/6) por medio de la vena de la cola 50.000 unidades de interferón-beta-1a o 50.000 unidades de interferón-beta-1a PEGilado que contenía PEG 20K o un volumen igual de tampón fosfato dado como control. La sangre de estos ratones se obtiene por medio de extracciones retroorbitales en diferentes tiempos después de la inyección (inmediatamente, 0,25, 1, 4, 24 y 48 horas). Se extrae sangre al menos a 3 ratones para cada tiempo. La sangre completa se recoge en tubos que contienen anticoagulante, las células se eliminan y el plasma resultante se congela hasta el momento del análisis. Estas muestras de plasma se analizan después en ensayos antivirales.

- 20 Las muestras de plasma se diluyen 1:10 en medios sin suero y se pasan a través de un filtro de jeringa de 0,2 μ m. Las muestras diluidas se analizan en ensayos antivirales. Las muestras se titulan en pocillos designados de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos que contiene células A549. Se analizan en cada placa diluciones de un interferón-beta-1a patrón (10, 6,7, 4,4, 2,9, 1,3, 0,9 y 0,6 U/ml) y de cuatro muestras de plasma. Las células A549 se pretratan con muestras de plasma diluido durante 24 horas antes de la exposición a virus EMC. Después de una
25 incubación de dos días con virus, las células viables se tiñen con una disolución de MTT (a 5 mg/ml en tampón fosfato) durante 1 hora, se lavan con tampón fosfato y se solubilizan con HCl 1,2 N en isopropanol. Los pocillos se leyeron a 450 nm. Se generan curvas patrón para cada placa y se usan para determinar la cantidad de actividad de interferón-beta-1a en cada muestra de prueba. La actividad en las muestras de los diferentes ratones se representa gráficamente respecto de los tiempos en la Figura 9.

- 30 La pérdida menor de interferón-beta-1a PEGilado de la circulación como función del tiempo indica que la semivida de la muestra PEGilada es mucho más larga que la del control de interferón-beta-1a sin tratar. Mientras el control se aclaró en gran medida después de 4 h, se detectó una fracción significativa del producto PEGilado después de 48 h. Basándose en los niveles iniciales de actividad en suero y los que permanecen después de 48 h, se deduce que la semivida del interferón PEGilado se alarga cuando se compara con la semivida del interferón-beta-1a sin modificar.
35 Un segundo hallazgo sumamente significativo del estudio fue que se perdió muy poca cantidad de la forma PEGilada durante la fase de distribución, como se demuestra por los niveles elevados similares de actividad a tiempo 0 y después de 60 min. Los datos indican que, a diferencia del interferón-beta-1a de control, la distribución del producto PEGilado se limita en gran medida a la vasculatura.

Ejemplo 5: Farmacocinética y farmacodinámica comparativas en primates (protocolos generales)

- 40 Se llevan a cabo estudios comparativos con conjugados de polímero-interferón-beta 1a e interferón-beta 1a nativo (como interferón-beta-1a intermedio en bruto sin formular en fosfato sódico y NaCl, pH 7,2) para determinar su estabilidad y actividad relativas en primates. En estos estudios, se compara la farmacocinética y la farmacodinámica del conjugado de polímero-interferón-beta 1a en primates con la del interferón-beta 1a nativo, y las deducciones razonables se pueden ampliar a los humanos.

- 45 Animales y métodos

Diseño del estudio

Este es un estudio de grupo paralelo, y de dosis repetida para evaluar la farmacocinética y la farmacodinámica comparativas de interferón-beta-1a conjugado y sin conjugar.

- 50 Se usaron primates sanos (preferiblemente monos rhesus) para este estudio. Antes de la dosis, se valorarán signos de enfermedad en todos los animales por un veterinario de animales de laboratorio en dos ocasiones dentro de los 14 días anteriores a la administración del artículo de prueba; una evaluación debe ser dentro de las 24 horas anteriores a la primera administración del artículo de prueba. Solamente los animales sanos recibirán este artículo de prueba. Las evaluaciones incluirán un examen físico general y extracciones de sangre anteriores a la dosis para determinar la patología clínica inicial y la concentración de anticuerpos inicial para interferón-beta-1a. Todos los
55 animales se pesarán y se registrarán las temperaturas corporales dentro de las 24 horas anteriores a las administraciones del artículo de prueba.

5 Se utilizan y se asignan doce sujetos a grupos para recibir 1 MU/kg de interferón-beta-1a como conjugado de PEG-interferón-beta-1a o sin conjugar, pero por lo demás interferón-beta-1a idéntico. La administración es por vía subcutánea (SC) o intravenosa (IV). Todos los animales deben no haber sido sometidos a tratamiento previo con interferón-beta. A cada animal se le administrará la dosis en dos ocasiones; las dosis irán separadas por cuatro semanas. El volumen de dosis será de 1,0 ml/kg.

Se extrae sangre para las pruebas farmacocinéticas en diversos intervalos de tiempo después de cada inyección. También se extraen muestras de sangre para las medidas del marcador de respuesta biológica inducida por interferón, neopterina sérica, después de la administración del fármaco en estudio.

10 Las evaluaciones durante el periodo de estudio incluyen observaciones clínicas realizadas 30 minutos y 1 hora postdosis en busca de signos de toxicidad. Se realizarán observaciones diarias en las jaulas y se registrará la apariencia general, signos de toxicidad, molestias y cambios en el comportamiento. Los pesos corporales y las temperaturas corporales se registrarán a intervalos regulares durante 21 días postdosis.

Métodos de análisis

15 Las concentraciones de interferón beta en suero se cuantifican usando un bioensayo de efecto citopático (ECP). El ensayo de ECP mide los niveles de actividad antiviral mediada por interferón. El nivel de actividad antiviral en una muestra refleja el número de moléculas de interferón activo contenidas en esa muestra en el momento en el que se extrae la sangre. Esta aproximación ha sido el método estándar para analizar la farmacocinética de interferón beta. El ensayo de ECP usado en el estudio actual detecta la capacidad de interferón beta para proteger células de carcinoma de pulmón humanas (A549, n° CCL-185, ATCC, Rockville, MD) a partir de la citotoxicidad debida al virus de encefalomiocarditis (EMC). Las células se preincuban durante 15 a 20 horas con muestras de suero para permitir la inducción y síntesis de proteínas inducibles por interferón que después provocan una respuesta antiviral. Después, se añade el virus EMC y se incuba durante 30 horas adicionales antes de hacer el análisis de la citotoxicidad usando una tinción de violeta cristal. Se analiza un patrón de interferón beta interno, así como un patrón interno de conjugado con PEG, de forma concurrente con las muestras en cada placa de ensayo. Este patrón se calibra con respecto a un patrón de referencia de interferón natural de fibroblastos humanos (WHO Second International Standard for Interferon, Human Fibroblast, Gb-23-902-53). Cada placa de ensayo también incluye pocillos de control de crecimiento celular que no contienen ni interferón beta de ningún tipo ni EMC, y pocillos de control viral que contienen células y EMC pero sin interferón beta. Las placas de control que contienen el patrón y las muestras también se preparan para determinar el efecto, si procede, de las muestras sobre el crecimiento celular. Estas placas se tiñen sin la adición de virus.

Las muestras y los patrones se analizan por duplicado en cada una de las dos placas de ensayo duplicadas, lo que produce cuatro puntos por muestra. Se informa la concentración media geométrica de los cuatro duplicados. El límite de detección en este análisis es 10 unidades (U)/ml.

35 Las concentraciones séricas de neopterina se determinan en la unidad de farmacología clínica usando análisis disponibles comercialmente.

Farmacocinética y métodos estadísticos

40 Se usa el programa informático Rstrip™ (MicroMath, Inc., Salt Lake City, UT) para ajustar los datos a modelos farmacocinéticos. Se trazan las concentraciones medias geométricas por tiempo para cada grupo. Ya que los resultados del ensayo se expresan en diluciones, las medias geométricas se consideran más apropiadas que las medias aritméticas. Las concentraciones de interferón sérico se ajustan a los valores iniciales y las concentraciones séricas indetectables se establecen en 5 U/ml, que representa un medio del límite de detección inferior.

Para los datos de infusión IV, se ajusta un modelo de infusión IV de dos compartimentos a las concentraciones séricas detectables para cada sujeto, y los datos SC se ajustan a un modelo de inyección de dos compartimentos.

Se calculan los siguientes parámetros farmacocinéticos:

- 45 (i) concentración máxima observada, C_{max} (U/ml);
 (ii) área bajo la curva de 0 a 48 horas, ABC usando la regla trapezoidal;
 (iii) semivida de eliminación;

y de los datos de infusión IV (si se emplea IV):

- (iv) semivida de distribución (h);
 50 (v) aclaramiento (ml/h);
 (vi) volumen aparente de distribución, V_d (L).

Se usa del programa informático WinNonlin (Scientific Consulting Inc., Apex, NC) para calcular las semividas de eliminación después de inyección SC e IV.

5 Para neopterinina, se presentan las medias aritméticas por tiempo para cada grupo. Se calcula E_{max} , la máxima carga a partir del valor inicial. C_{max} , ABC y E_{max} se someten a un análisis de varianza de un factor para comparar grupos de dosis. C_{max} y ABC se transforman de forma logarítmica antes del análisis; se informan las medias geométricas.

Ejemplo 6: Evaluación comparativa de la farmacocinética de interferón beta-1a PEGilado e interferón-beta-1a en monos rhesus

Materiales y métodos

10 Se administró interferón beta-1a o IFN beta-1a PEGilado a monos rhesus en el día 1 y otra vez en el día 29 por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC) como se describió en el protocolo general del Ejemplo 5. En el día 1, seis monos recibieron IFN beta-1a (3 por vía) y otros seis monos recibieron IFN beta-1a PEGilado (3 por vía). En el día 29 las dosis se repitieron. La dosis IV se administró como una inyección en embolada lenta en una vena cefálica o safena.

15 La dosis SC se administró bajo la piel de la espalda después de afeitar el sitio de inyección. Se recogió sangre por medio de la vena femoral en los tiempos especificados y se dejó coagular para obtener suero. Se analizaron las concentraciones de sustancias farmacológicas funcionales en el suero usando un método de ECP antiviral validado, y las concentraciones de neopterinina y β 2-microglobulina sérica como medidas farmacodinámicas de la actividad. Se calcularon los parámetros farmacológicos usando el programa informático WinNonlin versión 2.0 (Scientific Consulting Inc., Apex, NC).

20 Los datos de concentración se analizaron mediante métodos independientes de modelo estándar (análisis no compartimental) para obtener los parámetros farmacocinéticos. Se calculó el área bajo la curva (ABC) usando la regla trapezoidal. Los análisis estadísticos, que incluyen la media aritmética y la desviación estándar, se realizaron usando del programa informático Microsoft Excel versión 5.0 (Microsoft Corp., Redmond WA). Los valores de concentración informados como inferiores a los límites de cuantificación (BLQ) no se usaron en el análisis farmacocinético. Debido al hecho de que diferentes ordenadores y programas informáticos redondean o truncan los números de forma diferente, los valores en algunas tablas (p.ej. medias, desviaciones estándar o valores individuales) pueden diferir ligeramente de los de otras tablas, a partir de los datos calculados de forma individual, o a partir de los datos de los análisis estadísticos. Ni la integridad ni la interpretación de los datos se vio afectada por estas diferencias.

Resultados y discusión

30 Dentro de cada vía de administración, IFN beta-1a pegilado exhibió una biodisponibilidad superior (tal como se mide mediante el área bajo la curva de concentración sérica-tiempo). Además, el IFN beta-1a pegilado tuvo una biodisponibilidad absoluta superior comparado con IFN beta-1a cuando se administró por vía SC. Se resumen los parámetros farmacocinéticos en la Tabla 5. La administración de IFN beta-1a pegilado por ambas vías IV y SC da como resultado un incremento de la semivida, así como el ABC de IFN beta-1a.

35 Tabla 5:

Media (\pm desv. est.) BG9418 parámetros farmacocinéticos después de administración IV o SC (dosis 1) de 1 MU/kg de IFN b-1a o IFN b-1a pegilado a monos Rhesus^a

Formulación (vía de administración)	C_{max}	T_{max}	ABC U*h/ml	CL (ml/kg)	Vss (ml/kg)	$T_{1/2}$
IFN B-1a (IV)	6400 (± 0)	0,083 (± 0)	4453 (± 799)	229 (± 38)	543 (± 147)	3,2 ($\pm 1,4$)
IFN-B-1a pegilado (IV)	10800 (± 3811)	0,083 (± 0)	34373 (± 3601)	29 (± 3)	250 (± 30)	9,5 ($\pm 2,1$)
IFN B-1a (SC)	277 (± 75)	5,3 ($\pm 1,2$)	4753 (± 3170)	N/D	N/D	10,0 ($\pm 2,9$)
IFN B-1a pegilado (SC)	1080 (± 381)	3,3 ($\pm 1,2$)	42283 (± 5934)	N/D	N/D	22,0 ($\pm 3,4$)

^an=3

40 Después de la administración IV de la primera dosis, las concentraciones séricas máximas (C_{max} medias (\pm desv. est.) de IFN beta-1a e IFN beta-1a pegilado fueron 6400 (± 0) y 10800 ($\pm 3,5$) U/ml, respectivamente. Los valores de

ABC medios (\pm desv. est.) fueron 4453 (\pm 799) y 34373 (\pm 3601) U*h/ml, respectivamente. Después de la primera administración SC, la Cmax media (\pm desv. est.) de IFN beta-1a e IFN beta-1a pegilado fueron 277 (\pm 75) y 1080 (\pm 381) U/ml, respectivamente. Los valores de ABC medios (\pm desv. est.) fueron 4753 (\pm 3170) y 44952 (\pm 1443) U*h/ml, respectivamente.

5 Las concentraciones de neopterina sérica y β 2-microglobulina sérica fueron elevadas después del tratamiento con IFN-beta e IFN-beta pegilado, lo que indica actividad farmacológica de los productos. A las dosis elevadas de los compuestos de prueba usados, no hubo diferencia en la actividad farmacológica de IFN beta-1a e IFN beta-1a pegilado por ninguna vía de administración (datos no mostrados).

10 Ejemplo 7: Análisis comparativo de la farmacocinética de interferón beta-1a pegilado e interferón-beta-1a en ratas después de diversos modos de administración

El propósito de este estudio fue determinar la biodisponibilidad comparativa de interferón beta-1a e interferón beta-1a pegilado mediante diversas vías de administración.

Materiales y métodos:

15 Se usaron ratas Lewis hembra (190 gramos cada una) para los análisis farmacocinéticos con dos ratas por vía/formulación. Se aplicó una cánula yugular y se administró interferón beta-1a humano o interferón beta-1a humano 5K PEGilado o un interferón beta-1a humano 20K PEGilado (en un vehículo que consistía en 14 mg/ml de HSA en fosfato sódico 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,2) de forma intravenosa, intraperitoneal, oral, subcutánea o intratraqueal. La sangre se procesó varias veces a lo largo de un período de 72 horas a los 0, 5 min, 15 min, 30 min, 75 min, 3 h, 24 h, 48 h y 72 h. El protocolo se presenta en la Tabla 6. El bioensayo de efecto citopático (ECP) se llevó a cabo con las muestras de suero para detectar interferón-beta en el suero. Los resultados generados con interferón beta-1a sin modificar e interferón beta-1a pegilado con PEG 20K se presentan en la Tabla 7. En todos los casos la pegilación dio como resultado incrementos significativos en $t_{1/2}$ y ABC.

Tabla 6

	hIFN- β_{1a} PEGilado 20K	hIFN- β_{1a} sin PEGilar
Intravenoso	0, 5, 15, 30, 75 min, 3, 24, 48, 72 h	0, 5, 15, 30, 75 min, 3, 5 h
Intraperitoneal	0, 5, 15, 30, 75 min, 3, 24, 48, 72 h	0, 5, 15, 30, 75 min, 3, 5 h
Oral	0, 15, 30, 60, 90 min, 4, 7, 24, 48, 72 h	0, 15, 30, 60, 90 min, 3, 5, 7 h
Subcutáneo	0, 30, 60, 90 min, 4, 7, 24, 48, 72 h	0, 30, 60, 90 min, 3, 5, 7, 24 h
Intratraqueal	0, 30, 60, 90 min, 4, 7, 24, 48, 72 h	0, 30, 60, 90 min, 3, 5, 7, 24 h

Tabla 7

Parámetros farmacocinéticos después de administración IV, SC, IP o IT de interferón beta-1a (IFN) e IFN-beta 1a pegilado (IFN-PEG) en ratas

Formulación (vía de administración)	C _{max} (U/ml)	T _{max} (hr)	ABC/dosis (U hr)/(ml µg)	T _{1/2} (hr)
IFN (dosis IV, 20 µg)	64000	0,25	3035	1,25
IFN-PEG (dosis IV, 3 µg)	23970	0,08	47728	8,44
IFN (dosis SC, 20 µg)	2400	1,00	464,4	0,96
IFN-PEG (dosis SC, 3 µg)	2400	7,0	14688	11,9
IFN (dosis IP, 20 µg)	26000	1,25	4159	1,53
IFN-PEG (dosis IP, 3 µg)	9700	1,25	52148	16,2
IFN-PEG (dosis IT, 15 µg)	240	1,5	70,7	1,29
IFN-PEG (dosis IT, 15 µg)	270	7,0	233,5	6,21

5 Ejemplo 8: Efecto anti-angiogénico de interferón beta-1a conjugado con polímero: Análisis de la capacidad de interferón-beta-1a PEGilado para inhibir la proliferación de células endoteliales in vitro

Se mantienen en cultivo células endoteliales venosas humanas (Cell Systems, nº de cat. 2V0-P75) y células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (Cell Systems, nº de cat. 2M1-C25) con CS-C Medium Kit (Cell Systems, nº de cat. 4Z0-500). Veinticuatro horas antes del experimento las células se tratan con tripsina, y se resuspenden en medio de ensayo, 90% de M199 y 10% de suero bovino fetal (FBS), y se ajustan a la densidad celular deseada. Después las células se colocan en placas de 24 ó 96 pocillos revestidas con gelatina, a 12.500 células/pocillo o a 2.000 células/pocillo, respectivamente.

Después de incubar durante la noche, el medio de ensayo se sustituye con medio fresco que contiene 20 ng/ml de Fibroblast Growth Factor (Becton Dickinson, nº de cat. 40060) básico recombinante humano y diversas concentraciones de proteínas de interferón-beta-1a conjugadas y sin conjugar o control positivo (se puede usar endostatina como control positivo, como se podría hacer con un anticuerpo para bFGF). El volumen final se ajusta a 0,5 ml en la placa de 24 pocillos o 0,2 ml en la placa de 96 pocillos.

Después de setenta y dos horas, las células se tratan con tripsina para contarlas en un Coulter, se congelan para la lectura de fluorescencia con CyQuant, o se marcan con [3H] timidina. La inhibición de la proliferación de células endoteliales in vitro mediante interferón-beta 1a conjugado y sin conjugar fue comparable, lo que indica que la PEGilación no interfirió con la capacidad del interferón para funcionar en esta situación.

Este análisis in vitro analiza los efectos sobre la proliferación de células endoteliales de las moléculas de interferón-beta humano de la invención, que pueden ser indicativos de efectos anti-angiogénicos in vivo. Véase O'Reilly, M.S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukal, G. Vasios, W. Lane, E. Flynn, J. Birkhead, B. Olsen, y J. Folkman. (1997). Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* 88, 277-285.

25 Ejemplo 9: Modelo in vivo para analizar los efectos anti-angiogénicos y de neovascularización del interferón-beta-1a conjugado

Se ha desarrollado una diversidad de modelos para analizar los efectos anti-angiogénicos y de anti-neovascularización de las moléculas descritas aquí. Algunos de estos modelos se han descrito en las patentes de Estados Unidos nºs 5.733.876 (31 de mar. de 1998: "Método para inhibir la angiogénesis") y 5.135.919 (4 de ago. de 1992: "Método y composición farmacéutica para la inhibición de la angiogénesis"). Otros ensayos incluyen el ensayo de la membrana corioalantoidea (MCA) sin cáscara de S. Taylor y J. Folkman; *Nature*, 297,307 (1982) y R. Crum. S. Szabo y J. Folkman; *Science*. 230.1375 (1985); el modelo de antiangiogénesis del método de saco de aire dorsal en ratón de Folkman, J. et al.; *J. Exp. Med.*, 133, 275 (1971) y el ensayo de microbolsa corneal en rata de Gimbrone, M.A. Jr. et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 413 (1974) en el que la vascularización corneal se induce en ratas macho adultas de la raza Sprague-Dawley (Charles River, Japón) implantando miniesferas de 500 ng de FGF básico (bovino, R & D Systems, Inc.) impregnado con EVA (copolímero de etileno-acetato de vinilo) en cada córnea.

Otros métodos para analizar los efectos anti-angiogénicos de interferón-beta murino PEGilado en un modelo animal incluyen (pero no se limitan a) los protocolos para cribar nuevos agentes antineoplásicos potenciales como se describe en *Cancer Chemotherapy Reports*, parte 3, vol. 3, nº 2, septiembre de 1972 original y en el suplemento *In Vivo Cancer Models*, 1976-1982, publicación del NIH Nº 84-2635, febrero de 1984.

Debido a las barreras entre especies de los interferones de tipo I, para analizar la actividad anti-angiogénica de interferón-beta conjugado con polímero en modelos de roedores, se generan preparaciones de interferón-beta de

roedor conjugado con polímero. Tales métodos de cribado se ejemplifican mediante un protocolo para analizar los efectos anti-angiogénicos del interferón-beta murino pegilado sobre el carcinoma pulmonar de Lewis implantado de forma subcutánea.

Origen de la línea tumoral:

5 Apareció de forma espontánea en 1951 como un carcinoma de pulmón en un ratón C57BL/6.

Resumen de los procedimientos de ensayo: Se implanta un fragmento de tumor de forma subcutánea en la región axilar de un ratón B6D2F1. El agente de ensayo (es decir, un interferón PEGilado de la invención) se administra en dosis diversas, de forma subcutánea (SC) o intraperitoneal (IP) en múltiples días después de la implantación del tumor. El parámetro medido es el tiempo de supervivencia medio. Los resultados se expresan como un porcentaje del tiempo de supervivencia de control.

Animales:

Propagación: Ratones C57BL/6.

Ensayo: Ratones B6D2F1

15 Peso: Los ratones deberían estar dentro de un intervalo de peso de tres gr con un peso mínimo de 18 gr para los machos y 17 gr para las hembras.

Sexo: Se usa un sexo para todos los animales de ensayo y de control en un experimento.

Fuente: Una fuente, si es factible, para todos los animales en un experimento.

Tamaño del experimento:

Diez animales por grupo de ensayo.

20 Transferencia del tumor:

Propagación:

Fragmento: Preparar un fragmento de 2-4 mm de un tumor s.c. donante

Tiempo: Día 13-15

Localización: Implantar el fragmento s.c. en la región axilar con una punción en la región inguinal.

25 Ensayo:

Fragmento: Preparar un fragmento de 2-4 mm de un tumor donante s.c.

Tiempo: Día 13-15

Localización: Implantar el fragmento s.c. en la región axilar con una punción en la región inguinal.

Calendario de ensayo:

30 Día 0: Implantar el tumor. Establecer cultivos bacterianos. Ensayar el compuesto de control positivo en cada experimento impar. Preparar los materiales. Registrar las muertes diariamente.

Día 1: Comprobar los cultivos. Descartar el experimento si está contaminado. Aleatorizar los animales. Tratar como se indicó (en el día 1 y en los siguientes días).

Día 2: Volver a comprobar los cultivos. Descartar el experimento si está contaminado.

35 Día 5: Pesarse el día 2 y el día de la evaluación inicial de la toxicidad del agente de ensayo.

Día 14: Controlar las muertes prematuras.

Día 48: Controlar los "no prendidos".

Día 60: Finalizar y evaluar el experimento. Examinar los pulmones macroscópicamente en busca de tumores.

Control de calidad:

40 Programar el calendario del compuesto de control positivo (NSC 26271 (citoxano a una dosis de 100 mg/kg/inyección)) en cada experimento impar, para el que el régimen es intraperitoneal solamente en el día 1. El

Límite inferior de ensayo/control para el control positivo es el 140%. El tiempo de supervivencia medio del control sin tratar aceptable es 19-35,6 días.

Evaluación:

5 El parámetro medido es el tiempo de supervivencia medio. Calcular los pesos corporales medios de los animales para el día 1 y el día 5, calcular la proporción ensayo/control para todos los grupos de ensayo. Se calculan los pesos corporales medios de los animales para el día de inicio y el día de la evaluación final. La proporción ensayo/control se calcula para todos los grupos de ensayo con >65% de supervivientes en el día 5. Un valor de la proporción ensayo/control <86% indica toxicidad. Una diferencia de cambio de peso corporal excesiva (ensayo menos control) se puede usar también al evaluar la toxicidad.

10 Criterios de actividad:

Una proporción inicial ensayo/control mayor o igual a 140% se considera necesariamente que demuestra una actividad moderada. Un valor de la proporción ensayo/control reproducible mayor o igual de 150% se considera actividad significativa.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Biogen Idec MA Inc.
- <120> Conjugados con polímeros de interferón beta-1a y usos de los mismos
- <130> P2884Ep-D1-PCT
- 5 <140> EP06003415.4
<141> 15-10-1999
- <150> EP99970609.6
<151> 16-10-1999
- 10 <150> 60/104.572
<151> 16-10-1998
- <150> 60/120.161
<151> 16-2-1999
- <160> 40
- <170> PatentIn ver. 3.2
- 15 <210> 1
<211> 549
<212> ADN
<213> Mus sp.
- <400> 1
- | | | | | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| tccgggggccc | atcatcatca | tcatcatagc | tccgggagagc | atgatgacaa | gatgagctac | 60 |
| aacttgcttg | gattcctaca | aagaagcagc | aattttcagt | gtcagaagct | cctgtggcaa | 120 |
| ttgaatggga | ggcttgaata | ctgcctcaag | gacaggatga | actttgacat | ccctgaggag | 180 |
| attaagcagc | tgcagcagtt | ccagaaggag | gacgccgat | tgaccatcta | tgagatgctc | 240 |
| cagaacatct | ttgctatfff | cagacaagat | tcatctagca | ctggctggaa | tgagactatt | 300 |
| gttgagaacc | tcctggctaa | tgtctatcat | cagataaacc | atctgaagac | agtcctggaa | 360 |
| gaaaaactgg | agaaagaaga | tttcaccagg | ggaaaaactca | tgagcagtct | gcacctgaaa | 420 |
| agatattatg | ggaggattct | gcattacctg | aaggccaagg | agtacagtca | ctgtgcctgg | 480 |
| accatagtca | gagtggaaat | cctaaggaac | ttttacttca | ttaacagact | tacaggttac | 540 |
| ctccgaaac | | | | | | 549 |
- 20
- <210> 2
<211> 183
<212> PRT
<213> Mus sp.
- 25 <400> 2

ES 2 447 772 T3

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

5 <210> 3
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
ttctccggag acgatgatga caagatgagc tacaacttgc ttggattcct acaaagaagc 60

10 <210> 4
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
gccgctcgag ttatcagttt cggaggtaac ctgtaagtc 39

15 <210> 5
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
agcttccggg ggccatcatc atcatcatca tagct 35

20 <210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
ccggagctat gatgatgatg atgatggccc ccgga 35

ES 2 447 772 T3

	<210> 7		
	<211> 87		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 7		
	ccggagacga tgatgacaag atggcttacg ccgctcttgg agccctacaa gcttctagca	60	
	attttcagtg tcagaagctc ctgtggc	87	
	<210> 8		
	<211> 60		
	<212> ADN		
10	<213> Homo sapiens		
	<400> 8		
	gatctagcaa tgctgcctgt gctgccctcc tggctgcctt gaatgggagg ctggaatact	60	
	<210> 9		
	<211> 52		
15	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 9		
	gcctcaagga caggatgaac tttgacatcc ctgaggagat taagcagctg ca	52	
	<210> 10		
20	<211> 76		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 10		
	aattgaatgg gagggctgca gcttgcgctg cagacaggat gaactttgac atccctgagg	60	
	agattaagca gctgca	76	
25	<210> 11		
	<211> 76		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 11		
30	aattgaatgg gaggcttgaa tactgcctca aggacagggc tgcatttgct atccctgcag	60	
	agattaagca gctgca	76	
	<210> 12		
	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 12		
	aattgaatgg gaggcttgaa tactgcctca aggacaggat gaactttgac a	51	
	<210> 13		
	<211> 43		
	<212> ADN		
40	<213> Homo sapiens		
	<400> 13		
	tccctgagga gattgctgca gctgcagctt tcgctgcagc tga	43	
	<210> 14		
	<211> 78		
45	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 14		

	cgccgcggtg accatctatg agatgctcgc taacatcgct agcattttca gacaagattc	60
	atctagcact ggctggaa	78
	<210> 15	
	<211> 78	
	<212> ADN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 15	
	cgccgcattg accatctatg agatgctcca gaacatcttt gctattttcg ctgcagcttc	60
	atctagcact ggctggaa	78
	<210> 16	
	<211> 72	
10	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 16	
	ggaatgcttc aattggttgc gcaactcctga gcaatgtcta tcatcagata aaccatctga	60
	agacagttct ag	72
	<210> 17	
	<211> 72	
15	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 17	
	ggaatgagac cattgttgag aacctcctgg ctaatgtcgc tcatcagata gcacatctgg	60
	ctgcagttct ag	72
	<210> 18	
	<211> 44	
20	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 18	
25	ctagctgcaa aactggctgc agctgatttc accaggggaa aact	44
	<210> 19	
	<211> 69	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 19	
	ctagaagaaa aactggagaa agaagcagct accgctggaa aagcaatgag cgcgctgcac	60
	ctgaaaaga	69
	<210> 20	
	<211> 51	
	<212> ADN	
35	<213> Homo sapiens	
	<400> 20	
	tattatggga ggattctgca ttacctgaag gccaaggagt actcacactg t	51
	<210> 21	
	<211> 76	
40	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 21	
	catgagcagt ctgcacctga aaagatatta tggggcaatt gctgcatacc tggcagccaa	60
	ggagtactca cactgt	76
	<210> 22	

ES 2 447 772 T3

<211> 87
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 22

5 catgagcagt ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccgc 60
 tgcatactca cactgtgcct ggacgat 87

<210> 23
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 23

catgagcagt ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggcaaa 60
 ggagtacgct gcatgtgcct ggacgat 87

<210> 24
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 24

cgtcagagct gaaatcctag caaactttgc attcattgca agacttacag 50

<210> 25
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 25

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

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

25 <210> 26
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 27

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Ala Ala
 1 5 10 15
 Cys Ala Ala Leu Leu Ala Ala Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln

ES 2 447 772 T3

<400> 29

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

<210> 30
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30

5

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

<210> 31
 <211> 166
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Ala
 50 55 60
 Asn Ile Ala Ser Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

ES 2 447 772 T3

<210> 32
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 32

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

<210> 33
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 33

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

<210> 34
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 34
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Ala His Gln Ile Ala
 85 90 95
 His Leu Ala Ala Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr

130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 35
 <211> 166
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 35

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

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Ala Ala Lys Leu Ala Ala Ala Asp Phe Thr
 100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 36
 <211> 166
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

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

<210> 37
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 37
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Ala
 115 120 125
 Ile Ala Ala Tyr Leu Ala Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

ES 2 447 772 T3

<210> 38
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 38

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

<210> 39
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 39

ES 2 447 772 T3

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

<210> 40
 <211> 166
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 40
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

ES 2 447 772 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un interferón-beta-1a o una proteína de fusión que comprende el interferón-beta-1a, en la que el interferón-beta-1a consiste en la secuencia de aminoácidos:

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWN ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEK
EDFTRGKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRN FYFINRLTG
YLRN, y

5 en la que el interferón-beta-1a está acoplado a un único polímero que no se da de forma natural en el extremo N-terminal de dicho interferón-beta-1a, en el que el acoplamiento entre el interferón-beta-1a y dicho polímero es obtenible mediante el uso de un método de alquilación reductora, y en el que dicho polímero comprende un resto de polialquilenglicol.

10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión comprende una porción de una molécula de inmunoglobulina.

3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el polímero tiene un peso molecular de alrededor de 5 a alrededor de 40 kilodaltons.

4. Una composición farmacéutica que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

15 5. El uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de una composición farmacéutica.

6. El uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de tumores y cánceres, afecciones autoinmunitarias, enfermedades virales o enfermedades angiogénicas.

20 7. El uso de la reivindicación 6, en el que dichos tumores y cánceres se seleccionan del grupo que consiste en sarcoma osteogénico, linfoma, leucemia linfática aguda, carcinoma de mama, melanoma o carcinoma nasofaríngeo.

8. El uso de la reivindicación 6, en el que dichas afecciones autoinmunitarias se seleccionan del grupo que consiste en fibrosis, lupus y esclerosis múltiple.

9. El uso de la reivindicación 6, en el que dichas enfermedades virales se seleccionan del grupo que consiste en infección por ECM, gripe, infecciones virales de las vías respiratorias, rabia y hepatitis.

25 10. El uso de la reivindicación 6, en el que dichas enfermedades angiogénicas se seleccionan del grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, degeneración macular, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasias retrolenticulares, rubeosis y síndrome de Osler-Webber.

30 11. Una composición que comprende un mutante de interferón-beta-1a o una proteína de fusión que comprende el mutante de interferón-beta-1a, en el que el mutante de interferón-beta-1a consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

(i) MAYAALGALQASSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWN ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
GKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRN FYFINRLTG YLRN,

(ii) MSYNLLGFLQRSSNAACAALLAALNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWN ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
GKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRN FYFINRLTG YLRN,

(iii) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRAACAADRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWN ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
GKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRN FYFINRLTG YLRN,

(iv) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRAAFAPAEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
GKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,

(v) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIAAAAAFAAAD
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
GKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,

(vi) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLANIASIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
GKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,

(vii) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFAAASSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
GKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,

(viii) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWNASIVAALLSNVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
GKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,

(ix) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVAHQIAHAAVLEEKLEKEDFTR
GKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,

(x) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLAAKLAADFTR
GKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,

(xi) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEAATA
GKAMSALHLKRYYGRI LHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,

(xii) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
GKLMSSLHLKRYYGAI AAYLAAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,

(xiii) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
GKLMSSLHLKRYYGRI LHYLKAAYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTG YLRN,

(xiv) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
 AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
 GKLMSSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYAAACAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRN,

(xv) MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED
 AALTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR
 GKLMSSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRAEILANFAFIARLTGYLRN, y

5 en la que el mutante de interferón-beta-1a está acoplado a un único polímero que no se da de forma natural en el extremo N-terminal de dicho mutante de interferón-beta-1a, en el que el acoplamiento entre el mutante de interferón-beta-1a y dicho polímero es obtenible mediante el uso de un método de alquilación reductora, y en el que dicho polímero comprende un resto de polialquilenglicol.

12. La composición de la reivindicación 11, en la que la proteína de fusión comprende una porción de una molécula de inmunoglobulina.

13. Una composición farmacéutica que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12.

10 14. Un método *in vitro* para prolongar la actividad del interferón-beta-1a en un sistema *in vitro*, que comprende acoplar dicho interferón-beta-1a en el extremo N-terminal a un único resto de polímero que no se da de forma natural mediante el uso de un método de alquilación reductora para proporcionar una composición de polímero-interferón-beta-1a acoplado, e introducir la composición de polímero-interferón-beta-1a acoplado en el sistema *in vitro*, y dicho resto de polímero que no se da de forma natural comprende un resto de polialquilenglicol.

15 15. El uso de un resto de polímero que no se da de forma natural para proporcionar una composición de polímero-interferón-beta-1a acoplado como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de una composición farmacéutica, y dicho resto de polímero que no se da de forma natural comprende un resto de polialquilenglicol.

16. El uso de la composición de la reivindicación 3 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la angiogénesis en un sujeto.

20 17. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, 11 y 12, en la que el polímero es polietilenglicol.

18. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, 11, 12 y 17, en la que el polímero tiene un peso molecular de entre 10.000 y 40.000 daltons.

19. La composición según la reivindicación 18, en la que el polímero tiene un peso molecular de 20.000 daltons.

25 20. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en el tratamiento de tumores y cánceres, afecciones autoinmunitarias, enfermedades virales o enfermedades angiogénicas.

21. La composición para el uso según la reivindicación 20, en la que dichos tumores y cánceres se seleccionan del grupo que consiste sarcoma osteogénico, linfoma, leucemia linfática aguda, carcinoma de mama, melanoma o carcinoma nasofaríngeo.

30 22. La composición para el uso según la reivindicación 20, en la que dichas afecciones autoinmunitarias se seleccionan del grupo que consiste en fibrosis, lupus y esclerosis múltiple.

23. La composición para el uso según la reivindicación 20, en la que dichas enfermedades virales se seleccionan del grupo que consiste en infección por ECM, gripe, infecciones virales de las vías respiratorias, rabia y hepatitis.

35 24. La composición para el uso según la reivindicación 20, en la que dichas enfermedades angiogénicas se seleccionan del grupo que consiste en retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, degeneración macular, rechazo de injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasias retrolenticulares, rubeosis y síndrome de Osler-Webber.

25. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

40 26. El uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

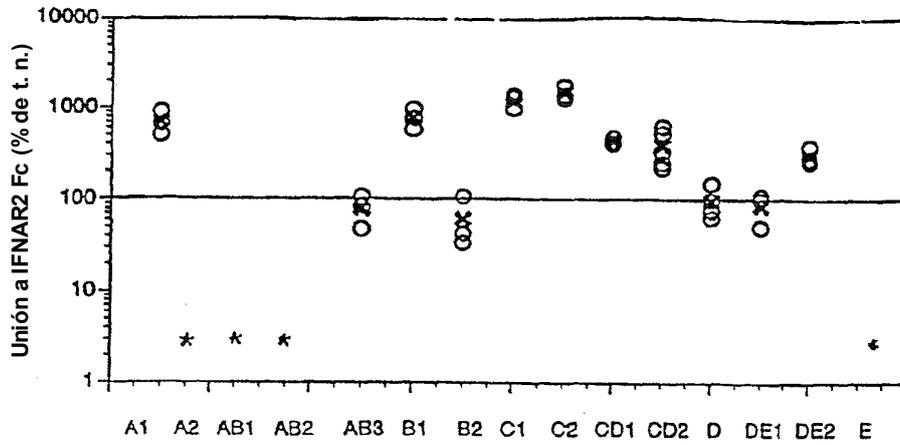


FIG. 1

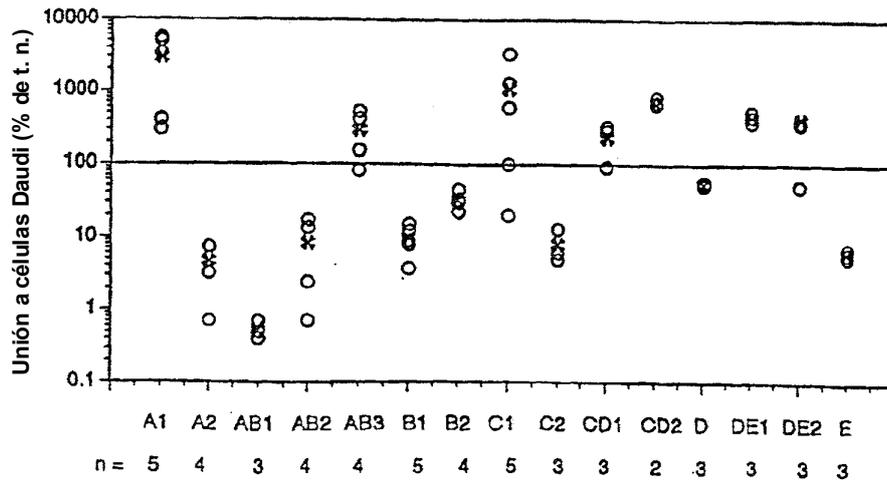


FIG. 2

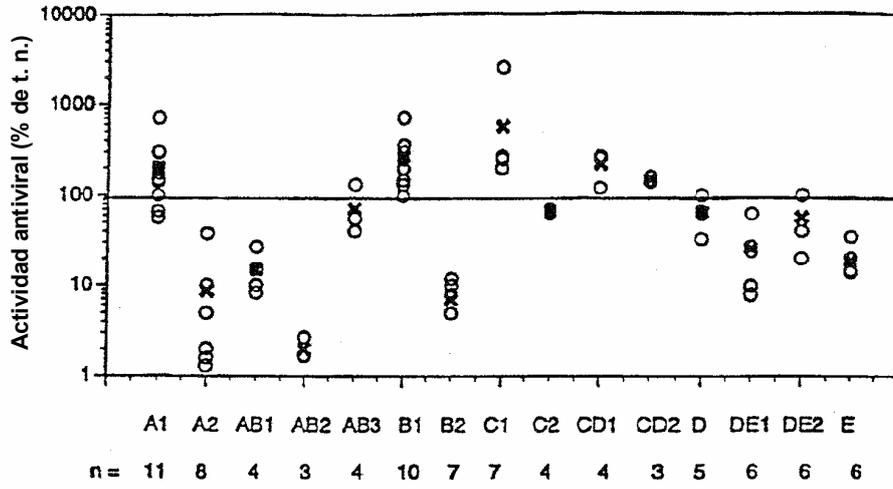


Fig. 3

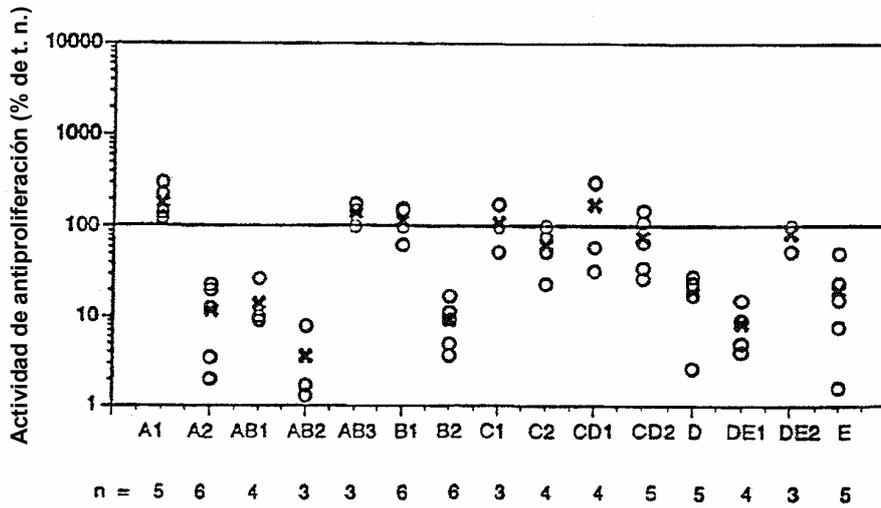


FIG. 4

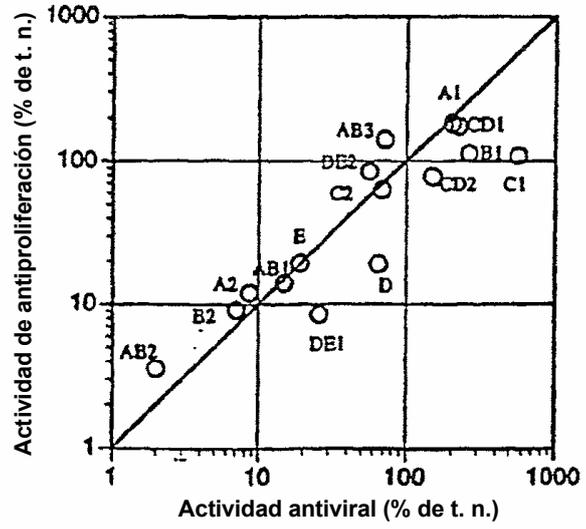


FIG. 5

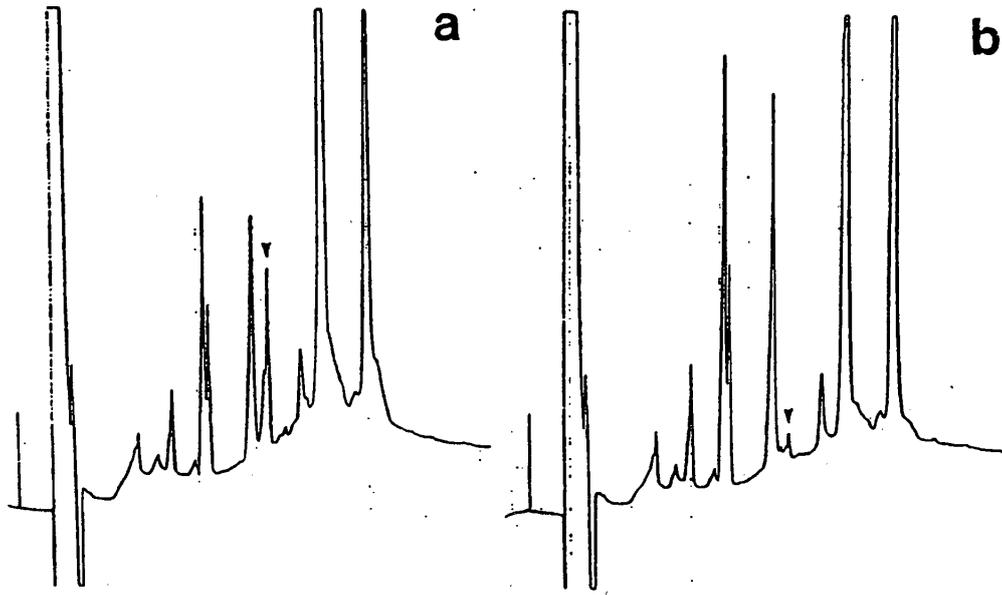


FIG. 6

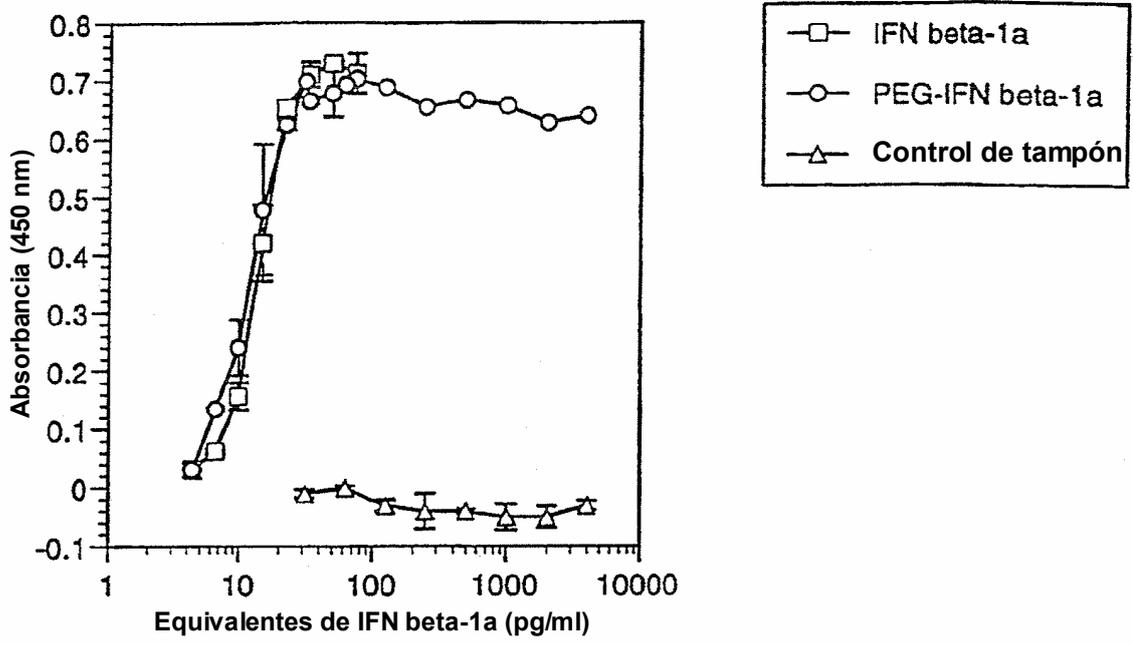


Fig. 7

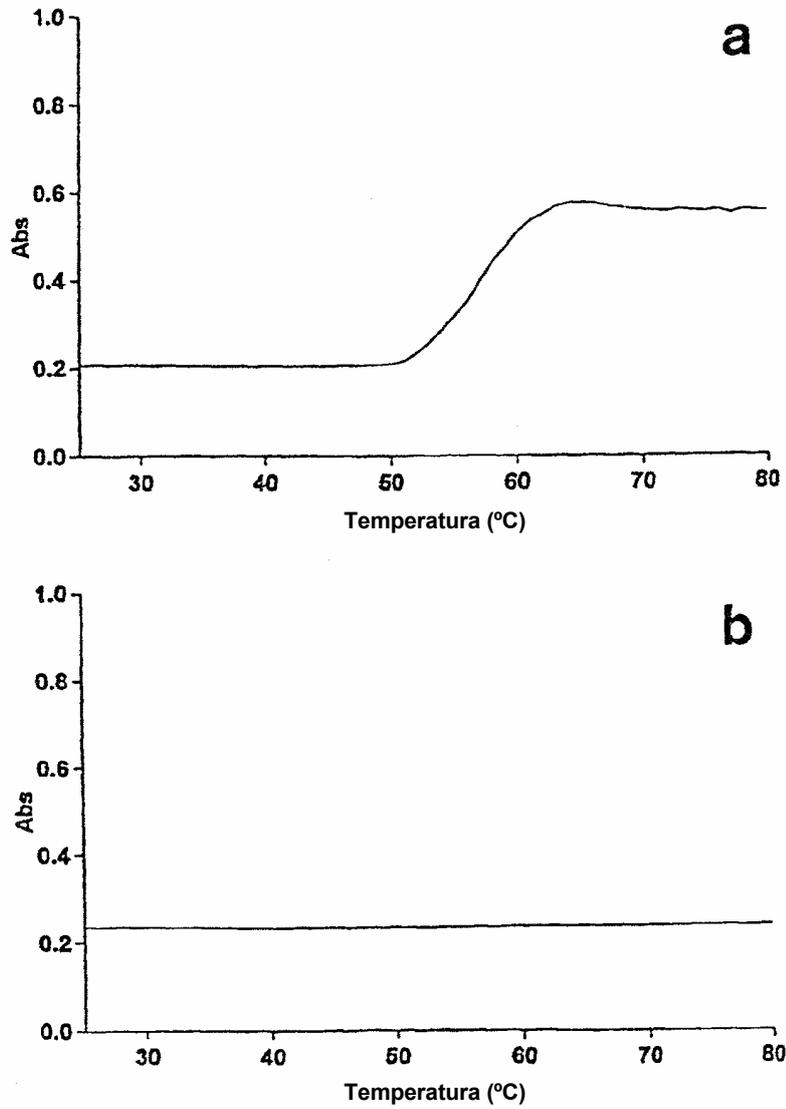
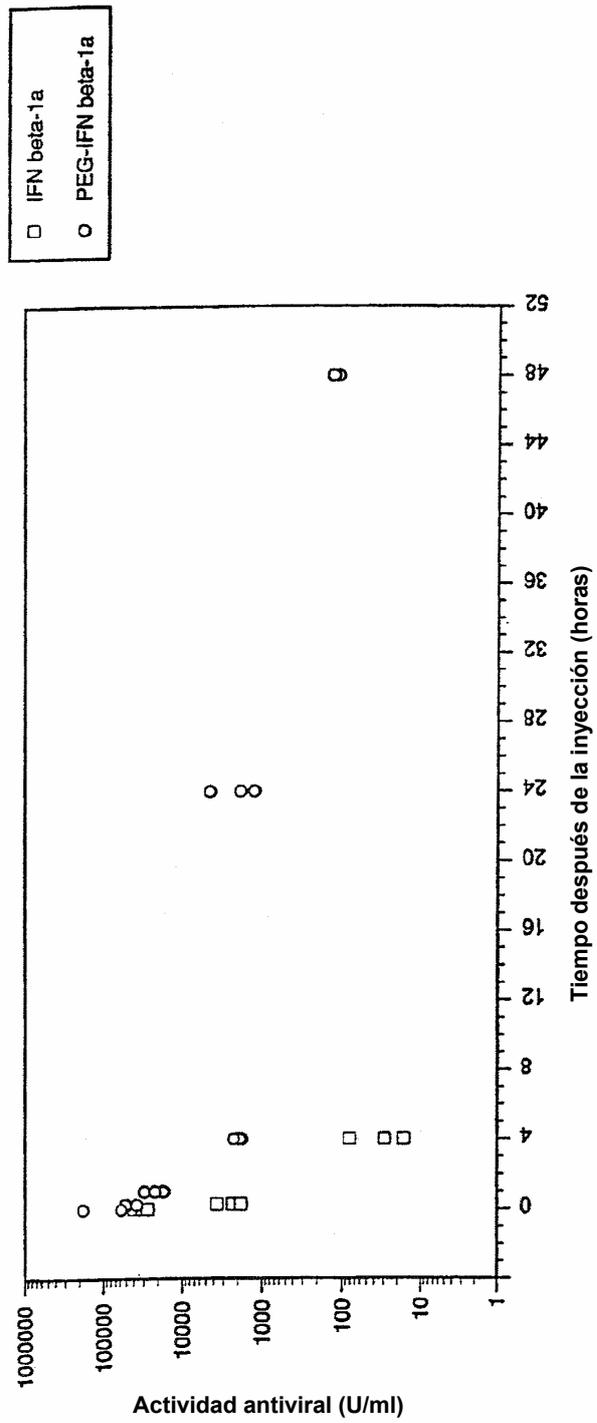


FIG. 8

FIG. 9



1 TCCGGGGG . ATCATCATCA TCATCATAGC TCCGGAGACG ATC TGACAA GATGAGCTAC
 AGCCCCCGG TAGTAGTAGT AGTAGTATCG AGGCCTCTGC TACTACTGTT CTACTCGATG
 1 ▶ Ser Gly Gly H is His His His s His s His s Ser Ser Gly Asp A sp Asp Asp Lys s Met Ser Tyr

 61 AACTTGCTTG GATTCCTACA AAGAAGCAGC AATTTTCAGT GTCAGAAGCT CCTGTGGCAA
 TTGAACGAAC CTAAGGATGT TTCTTCGTCG TTAAAAGTCA CAGTCTTCGA GGACACCGTT
 21 ▶ Asn Leu Leu G ly Phe Leu Gl n Arg Ser Ser Asn Phe Gl n C ys Gl n Lys Le u Leu Tr p Gl n

 121 TTGAATGGGA GGCTTGAATA CTGCCTCAAG GACAGGATGA ACTTTGACAT CCCTGAGGAG
 AACTTACCCT CCGAACTTAT GACGGAGTTC CTGCCTACT TGAAACTGTA GGGACTCCTC
 41 ▶ Leu Asn Gly A r g Leu Gl u Ty r Cys Leu Lys Asp Arg Met A sn Phe Asp l l e Pr o Gl u Gl u

 181 ATTAAGCAGC TGCAGCAGTT CCAGAAGGAG GACGCCGCAT TGACCATCTA TGAGATGCTC
 TAATTCGTCG ACGTCGTCAA GGTCTTCTCT CTGCGGCGTA ACTGGTAGAT ACTCTACGAG
 61 ▶ Ile Lys Gl n L eu Gl n Gl n Ph e Gl n Lys Gl u Asp Ala Ala l eu Thr l l e Ty r Gl u Met Leu

 241 CAGAACATCT TTGCTATTTT CAGACAAGAT TCATCTAGCA CTGGCTGGAA TGAGACTTTT
 GTCTTGAGA AACGATAAAA GTCTGTCTA AGTAGATCGT GACCGACCTT ACTCTGATAA
 81 ▶ Gl n Asn l l e P he Ala l l e Ph e Arg Gl n Asp Ser Ser Ser T hr Gl y Tr p As n Gl u Thr l l e

 301 GTTGAGAACC TCCTGGCTAA TGTCTATCAT CAGATAAACC ATCTGAAGAC AGTCCTGGAA
 CAACTCTTGG AGGACCGATT ACAGATAGTA GTCTATTTGG TAGACTTCTG TCAGGACCTT
 101 ▶ Val Gl u Asn L eu Leu Ala As n Val Tyr His Gl n l l e Asn H is Leu Lys Th r Val Leu Gl u

 361 GAAAACTGG AGAAAGAAGA TTTCACCAGG GGAAAACTCA TGAGCAGTCT GCACCTGAAA
 CTTTTGACC TCTTCTTCT AAAGTGGTCC CCTTTTGAGT ACTCGTCAGA CGTGGACTTT
 121 ▶ Gl u Lys Leu G l u Lys Gl u As p Phe Thr Arg Gly Lys Leu M et Ser Ser Le u His Leu Lys

 421 AGATATTATG GGAGGATTCT GCATTACCTG AAGGCCAAGG AGTACAGTCA CTGTGCCTGG
 TCTATAATAC CCTCCTAAGA CGTAATGGAC TTCCGGTTC TCATGTCAGT GACACGGACC
 141 ▶ Arg Tyr Tyr G ly Arg l l e Le u His Tyr Leu Lys Ala Lys G l u Tyr Ser His Cys Ala Tr p

 481 ACCATAGTCA GAGTGGAAAT CCTAAGGAAC TTTTACTTCA TTAACAGACT TACAGGTTAC
 TGGTATCAGT CTCACCTTTA GGATTCCTTG AAAATGAAGT AATTGTCTGA ATGTCCAATG
 161 ▶ Thr l l e Val A r g Val Gl u l l e Leu Arg Asn Phe Tyr Phe l l e Asn Arg Le u Thr Gly Tyr

 541 CTCCGAAAC
 GAGGCTTTG
 181 ▶ Leu Arg Asn

Fig. 10