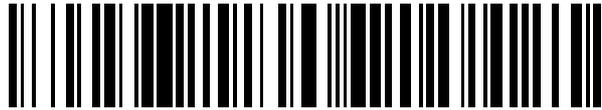


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 622**

51 Int. Cl.:

C07K 14/56

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2004 E 04809634 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 1663110**

54 Título: **Usos de interferones con estructura espacial alterada**

30 Prioridad:

28.08.2003 US 498449 P
28.08.2003 US 498785 P
28.08.2003 US 498923 P
05.03.2004 IN MU02792004
05.03.2004 IN MU02802004

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2014

73 Titular/es:

SUPERLAB FAR EAST LIMITED (100.0%)
OMC Chambers, P.O. Box 3152
Road Town, Tortola, VG

72 Inventor/es:

WEI, GUANGWEN

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 473 622 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

Usos de interferones con estructura espacial alterada.

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 0001 Esta invención se refiere a un interferón recombinante súper-compuesto (rSIFN-co) obtenible mediante un proceso que comprende introducir en *E. coli* la secuencia de polinucleótido mostrada en la Fig. 1 con configuración espacial cambiada. Una característica de rSIFN-co en esta invención es que no sólo puede inhibir la duplicación del ADN (ácido desoxiribonucleico) del virus de la hepatitis B sino también la secreción de HBsAg y HBeAg.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 0002 rSIFN-co es una nueva molécula de interferón construida con el aminoácido conservador más popular encontrado en subtipos de IFN- α naturales humanos utilizando métodos de ingeniería genética. Las patentes US N° 4,695,623 y 4,897,471 lo han descrito. Había sido demostrado que rSIFN-co tiene actividad de IFN de amplio espectro e inhibición de virus y tumor y actividad de células asesinas naturales. La patente US N° 5,372,808 de Amgen, Inc. aborda el re-tratamiento de rSIFN-co en hepatitis C. La patente China N° 98114663.5 de Shenzhen Jiusheng Bio-engineering Ltd. aborda el tratamiento rSIFN-co para la hepatitis B y C.

- 15 0003 La Administration de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) autorizó a Amgen a producir rSIFN-co con *E. Coli*. para el tratamiento clínico de la hepatitis C a finales de 1997.

- 20 0004 Los pacientes con hepatitis B pueden ser identificados al detectar el HBsAg y el HBeAg. α -IFN se usa comúnmente en clínicas para el tratamiento de la hepatitis B. IFN se une a receptores de membrana de células superficiales, inhibiendo la duplicación del ADN y ARN (ácido ribonucleico), incluyendo la inducción de algunas enzimas para evitar la duplicación del virus en células infectadas con hepatitis. Todos los IFNs pueden inhibir sólo la duplicación del ADN de los virus, no el antígeno e y s.

0005 Esta descripción describe interferón recombinante súper-compuesto, método para producir el mismo y sus usos.

- 25 0006 Un brote de neumonía atípica, conocida como síndrome respiratorio agudo grave (SARS) e identificado por primera vez en la provincia de Guangdong, China, se ha extendido a varios países. Casos similares se detectaron en pacientes en Hong Kong, Vietnam y Canadá a partir de Febrero y Marzo de 2003. La Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió una alerta mundial para la enfermedad. A mediados de Marzo de 2003, se reconoció SARS en personal sanitario y personal doméstico que habían cuidado de pacientes con enfermedad respiratoria grave en el Lejano Oriente. Muchos de estos casos pudieron ser rastreados a través de múltiples cadenas de transmisión hasta
30 un trabajador sanitario de la provincia de Guangdong que visitó Hong Kong, donde fue hospitalizado con neumonía y falleció. A finales de Abril de 2003, se informó de miles de casos de SARS y cientos de muertes relacionadas con SARS a la OMS desde más de 25 países del mundo. La mayoría de estos casos se produjeron después de la exposición a pacientes con SARS en entornos domésticos o sanitarios. Esta descripción proporciona un método para evitar y/o tratar el SARS.

- 35 0007 Otra alarma epidémica actual en Asia es el virus de la gripe aviar (H5N1). La gripe aviar es una enfermedad infecciosa de las aves causada por cepas de tipo A del virus de la gripe. Hay 15 subtipos de virus de la gripe aviar; H5N1 es especialmente preocupante porque muta rápidamente infectando no sólo a animales, sino también a humanos. El recuento confirmado de muertes humanas por gripe aviar, a 4 de Febrero de 2004, se situó en trece. Laboratorios de la red mundial de gripe de la OMS han estado trabajando para controlar el virus y evitar más
40 muertes humanas. Sin embargo, para comprender plenamente la magnitud de H5N1 y sus formas de distribución, es necesario realizar ensayos más meticulosos. Además, los medicamentos antivirales sólo son eficaces en el tratamiento o la prevención de cepas del virus aviar A contra aquellos que tienen una salud aceptable. Ver http://www.who.int/csr/don/2004_01_15/en, 15 de Enero de 2004.

- 45 0008 Los investigadores de St. Jude y otros laboratorios principales de gripe están en una carrera para crear un prototipo de vacuna humana contra el H5N1. Esperan que pueden estar listas vacunas prototipo en tan sólo tres semanas. No obstante, hasta que se cree una vacuna, los científicos están preocupados de que el virus H5N1 puede convertirse en una supergripe humana. Ver The Wall Street Journal, Scientists Rush to Create Vaccine for Bird Flu - Just in Case, 28 de Enero de 2004.

- 50 0009 Esta revelación describe un interferón recombinante súper-compuesto, como se definió anteriormente, método para producir el mismo y usos del mismo. En particular, el interferón súper-compuesto aquí revelado es capaz de inhibir, evitar y/o tratar los virus de la hepatitis, virus del SARS, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus, y el virus de la gripe aviar.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 0010 Esta invención proporciona un método para inhibir, evitar o tratar enfermedades virales o tumores en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del interferón súper-compuesto obtenible por un proceso que comprende introducir en *E. coli* la secuencia de polinucleótido que se muestra en la Fig. 1.
- 5 0011 Esta invención proporciona el método descrito anteriormente en donde el interferón súper-compuesto es administrado oralmente a través de inyección en vena, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal o mucosal, o por inhalación a través de un inspirador.
- 0012 Esta invención proporciona el método para evitar o tratar enfermedades virales en el que las enfermedades virales es hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, otros tipos de hepatitis, infecciones de virus causadas por virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus, virus de herpes simple, u otros tipos de virus del herpes, papovavirus, poxvirus, picornavirus, adenovirus, rinovirus, virus I de leucemia de células T humanas I, o virus II de leucemia de células T humanas, o virus III de leucemia de células T humanas.
- 10 0013 Esta invención proporciona un método para actividades anti-hepatitis. Puede inhibir la replicación del ADN-VHB, la producción de HBsAg y HBeAg.
- 15 0014 Esta invención proporciona un método para evitar o tratar enfermedades de infección del tracto respiratorio superior.
- 0015 Esta invención proporciona un método para evitar o tratar tumores o cánceres en el que el tumor es cáncer de piel, carcinoma de células basales y melanoma maligno, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer rinofaríngeo, carcinoma sólido, cáncer de próstata, cáncer de estómago/abdominal, cáncer de esófago, cáncer de recto, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, y cáncer superficial de vejiga, hemangioma, carcinoma epidermoide, cáncer cervical, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, glioma, leucocitemia, leucocitemia aguda y leucocitemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia de células pilosas, linfadenoma, mieloma múltiple, policitemia vera, o sarcoma de Kaposi.
- 20 0016 Esta invención proporciona un método para evitar o tratar el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de interferón recombinante súper-compuesto como se define anteriormente.
- 25 0017 El interferón súper-compuesto puede ser administrado por vía oral, a través de inyección en vena, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal o mucosal, o por inhalación a través de un inspirador.
- 30 0018 Esta invención proporciona un método para inhibir el agente causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus, que comprende poner en contacto el agente con una cantidad eficaz del interferón súper-compuesto.
- 0019 Esta invención también proporciona un método para inhibir el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, las células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz del interferón súper-compuesto con dicho virus o células. Este contacto puede ser directo o indirecto.
- 35 0020 Esta invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz del interferón súper compuesto capaz de inhibir, evitar o tratar el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, las células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus, y un portador adecuado.
- 40 0021 Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del interferón súper-compuesto recombinante como se ha definido anteriormente capaz de inhibir, evitar o tratar el Síndrome Respiratorio Agudo Severo, las células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus en un sujeto, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 0022 Es un objeto adicional de la invención un polinucleótido aislado que tiene la secuencia que se muestra en la Fig. 1.
- 0023 Es un objeto adicional de la invención, el interferón recombinante como se define anteriormente para uso médico.
- 50 0024 Es un objeto adicional de la invención el uso del interferón recombinante como se define anteriormente para la fabricación de un medicamento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

0025

Figura 1. Secuencia ADNc rSIFN-co diseñada de acuerdo con el uso de codón de *E. Coli* y la secuencia de aminoácidos rSIFN-co deducida

5 **Figura 2.** La secuencia de otro interferón súper-compuesto

Figura 3. Diagrama de vector plásmido de clonación de Plac T7

Figura 4. Diagrama de vector plásmido de expresión de pH-4

Figura 5. Proceso de construcción de plásmido de expresión pHY-5

Figura 6-A. Espectro de Dicroísmo Circular de Infergen®

10 (Ensayado por el Centro de Medición y Análisis de la Universidad de Sichuan)

Rango de espectro: 250nm – 190nm

Sensibilidad: 2 m⁰/cm

Trayectoria de haz luminoso: 0.20 cm

Equipo: Dicroísmo Circular J-500C

15 Muestras: contiene 30µg/ml IFN-con 1, 5.9 mg/ml de NaCl y 3.8 mg/ml de Na₂PO₄, pH7.0.

Infergen® (interferón alfacon-1) hecho por Amgen Inc., también conocido como interferón de consenso, se comercializa para el tratamiento de adultos con infecciones de virus de hepatitis C crónica (VHC). Es actualmente el único interferón aprobado por la FDA, bio-optimizado, desarrollado a través de diseño racional de fármacos y el único interferón con datos en la etiqueta específicamente para pacientes que no responden o refractarios. El equipo de ventas de InterMune relanzó Infergen® en Enero de 2002 con una campaña activa para educar a los hepatólogos de Estados Unidos sobre el uso seguro y apropiado de Infergen®, que representa una nueva esperanza para más del 50 por ciento de pacientes con VHC que fracasaron con otras terapias actualmente disponibles. Ver <http://www.intermune.com/p/ITMN/Infergen>, 8/27/2003

25 **Figura 6-B.** Espectro de Dicroísmo Circular de Infergen® De Referencia [Journal of Interferon and Cytokine Research. 16:489-499(1996)]

Espectros de dicroísmo circular de subformas de interferón de consenso. El interferón de consenso se fraccionó utilizando una columna de intercambio de aniones. Las muestras se dializaron en fosfato de sodio 10mM, pH 7,4. Las mediciones se realizaron en espectropolarímetro Jasco J-170, en un termostato de células a 15°C. (-----), forma acilada; (--) forma terminal cis; (···), forma terminal met. A. Lejos del espectro UV. B. cerca del espectro UV.

30 **Figura 6-C.** Espectro de Dicroísmo Circular de rSIFN-co

Rango de espectro: 320nm – 250nm

Sensibilidad: 2 m⁰/cm

Trayectoria de haz luminoso: 2 cm

Equipo: Dicroísmo Circular J-500C

35 Muestras: contiene 0.5mg/ml rSIFN-co, 5.9 mg/ml de NaCl y 3.8 mg/ml de Na₂PO₄, pH7.0.

Figura 6-D. Espectro de Dicroísmo Circular de rSIFN-co

Rango de espectro: 250nm – 190nm

Sensibilidad: 2 m⁰/cm

Trayectoria de haz luminoso: 0.20 cm

40 Equipo: Dicroísmo Circular J-500C

Muestras: contiene 30µg/ml rSIFN-co, 5.9 mg/ml de NaCl y 3.8 mg/ml de Na₂PO₄, pH7.0.

Claramente, como se evidencia por los espectros anteriores, la estructura secundaria o incluso terciaria de rSIFN-co es diferente de Infergen®.

Figura 7A-C. Interferón recombinante súper-compuesto en Aerosol

Altura: 90 mm

5 Anchura: 25mm (abajo), 6mm (arriba)

Peso: 9g

Volumen de entrega: 0.1 ml

10 **Figura 7D.** El Interferón Súper Compuesto Recombinante en Aerosol. Cuando se usa el aerosol por primera vez, quite la tapa y descargue en el aire varias veces hasta que se expulse algo de líquido. No es necesario probar el aerosol para usos posteriores. Para su uso, siga las ilustraciones que se muestran en la figura, es decir: (1) Pre-rocio y (2) Presionar hacia abajo la boquilla para liberar el medicamento.

Figura 8. Comparación de efectos de inhibición de diferentes Interferones sobre la expresión del gen HBV

Figura 9A-1. Curvas de cambios de la temperatura corporal en el Grupo A (5 pacientes)

Esta figura es el registro de los cambios de temperatura corporal de 5 pacientes en el Grupo A.

15 **Figura 9A-2.** Curvas de cambios de la temperatura corporal en el Grupo A (6 pacientes)

Esta figura es el registro de los cambios de temperatura corporal de los otros 6 pacientes en el Grupo A.

Figura 9B-1. Curvas de cambios de la temperatura corporal en el grupo B (5 pacientes)

Esta figura es el registro de los cambios de temperatura corporal de 5 pacientes en el Grupo B.

Figura 9B-2. Curvas de cambios de la temperatura corporal en el grupo B (5 pacientes)

20 Esta figura es el registro de los cambios de temperatura corporal de los otros 5 pacientes en el Grupo B.

Figura 10. rSIFN-co Cristal I

Figura 11. rSIFN-co Cristal II

Figura 12. La difracción de rayos X de rSIFN-co Cristal

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 0026 Esta invención proporciona un método para producir un interferón súper compuesto recombinante con configuración espacial cambiada y actividad antiviral mejorada que comprende las etapas de:

(a) Introducir la molécula de ácido nucleico como se muestra en la Fig. 1 que codifica para dicho interferón con codones preferidos para la expresión a un huésped E. coli; y

(b) Colocar el huésped introducido en condiciones que permitan la expresión de dicho interferón.

30 0027 Esta invención proporciona el método para la producción de interferón, que comprende además la recuperación del interferón expresado.

0028 Esta invención proporciona un interferón recombinante súper-compuesto como se ha descrito anteriormente con configuración espacial cambiada. Esta invención revela que proteínas con la misma secuencia primaria pueden tener diferentes actividades biológicas. Como se ilustra en el siguiente ejemplo, esta invención revela dos proteínas con secuencias de aminoácidos idénticas pero con diferentes actividades. La eficacia de esta actividad puede a veces ser mejorada y, a veces, la proteína con configuración espacial cambiada revelaría una nueva función.

0029 También se describen equivalentes o mímicos del interferón recombinante como se describe anteriormente.

40 0030 Un equivalente es una molécula que es similar en función al compuesto interferón. Un equivalente podría ser una delección, sustitución, o mutante de sustitución de la secuencia original. Mímicos podrían ser un péptido, polipéptido o una entidad química pequeña.

0031 El interferón aquí descrito incluye pero no se limita a interferón α , β , o ω . En una realización, es IFN-1a, IFN-2b u otros mutantes.

- 0032 En una realización, el interferón súper-compuesto revelado tiene una mayor eficacia que el interferón descrito en las patentes US 4,695,623 o 4,897,471. Se cree que este interferón súper-compuesto tiene estructura secundaria o terciaria única. (Ver, p. ej. Figura 6.)
- 5 0033 El súper compuesto interferón descrito aquí tiene cambio(s) de estructura espacial como resultado de los cambios de su proceso de producción.
- 0034 El interferón súper-compuesto descrito anteriormente puede ser producido por un sistema de expresión de alta eficiencia que utiliza un promotor especial. En una realización, el promotor es P_{BAD}. Como puede fácilmente apreciarse por otros artesanos expertos ordinarios. Otros promotores inducibles, tales como promotores de choque térmico o promotores inducibles de metales pesados, pueden ser utilizados en esta invención.
- 10 0035 El interferón súper-compuesto también puede ser producido con su gen como ADNc artificialmente sintetizado con ajuste de su secuencia desde el tipo salvaje de acuerdo a la preferencia de codones de *E. Coli*. Discusión amplia de dicho uso de codones (preferencia) se puede encontrar en la patente US 4,695,623. Ver, por ejemplo columna 6, línea 41-columna 7, línea 35.
- 15 0036 El interferón súper-compuesto descrito anteriormente posee actividad anti-viral o anti-tumoral, y, por lo tanto, es útil en la inhibición, presentación y tratamiento de enfermedades virales, tumores o cánceres.
- 0037 Como aquí se usa, enfermedades virales incluyen, pero no se limitan a, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, otros tipos de hepatitis, infecciones causadas por virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus, virus del herpes simplex, otros virus del herpes, papovavirus, poxvirus, picornavirus, adenovirus, rinovirus, virus I de leucemia de células T humanas, virus II de leucemia de células T humanas, o virus III de leucemia de células T humanas.
- 20 0038 Infección respiratoria viral, nombres alternativos resfriado común, resfriados. Esta es una infección viral contagiosa del tracto respiratorio superior que se caracteriza por la inflamación de las membranas mucosas, estornudos y dolor de garganta. Generalmente es causada por más de 200 virus diferentes, conocidos como rinovirus. Los resfriados no son causados por los mismos virus responsables de la gripe. Los resfriados se propagan a través de gotitas de la tos o los estornudos de otras personas con un resfriado o por contacto de las manos con objetos contaminados por una persona resfriada. La incidencia de los resfriados es más alta entre los niños, y la incidencia disminuye con la edad porque tras la enfermedad ocurre inmunidad al virus que causa el resfriado. Gradualmente, se desarrolla en adultos inmunidad a una amplia variedad de virus que causan los resfriados. Los niños pueden tener 10 resfriados al año, y los adultos pueden tener 3 resfriados al año.
- 25 0039 Los Centros para Control y Prevención de Enfermedades de E.E.U.U. han estimado que la incidencia media anual de infecciones del tracto respiratorio superior (URIs) en los Estados Unidos es de 429 millones de episodios, resultando en más de \$ 2.5 mil millones en costos sanitarios directos e indirectos.
- 30 0040 El resfriado común es más frecuentemente causado por uno de varios cientos de rinovirus (52%), pero los coronavirus (8%) o el virus sincitial respiratorio (7%) también pueden dar lugar a infección. Otros virus, como la gripe (6%), parainfluenza y adenovirus, pueden producir síntomas respiratorios, pero éstos se asocian a menudo con neumonía, fiebre o escalofríos.
- 35 0041 Los resfriados se producen en un patrón estacional que suele comenzar a mediados de Septiembre y concluye a finales de Abril hasta principios de Mayo. El resfriado común es muy contagioso y se puede transmitir por contacto de persona a persona o por gotitas aerotransportadas. Los síntomas del tracto respiratorio superior comienzan generalmente 1 a 2 días tras la exposición y generalmente duran 1 ó 2 semanas, aunque la diseminación del virus y el contagio pueden continuar durante 2 a 3 semanas más. Pueden persistir síntomas con aparición de complicaciones como sinusitis o afectación del tracto respiratorio inferior, como bronquitis o neumonía.
- 40 0042 El resfriado común tiene una variedad de síntomas evidentes, incluyendo malestar general, congestión nasal, rinorrea, tos no productiva, dolor de garganta leve, y, en algunos casos, algo de fiebre. Debido a la similitud de los síntomas, un resfriado puede ser confundido con rinitis alérgica perenne, pero por lo general pueden descartarse las alergias debido a las diferencias en cronicidad.
- 45 0043 Si un paciente se presenta con un URI viral, el espectro de remedios es extenso. Dado que la mayoría de estas infecciones son autolimitantes, los médicos suelen recomendar reposo y líquidos, pero otros tratamientos incluyen terapias ambientales y nutricionales, descongestionantes de venta libre y de receta y productos antihistamínicos, nuevas formulaciones nasales antihistamínicas y anticolinérgicas, y antibióticos. La Tabla 1
- 50 enumera medicaciones comúnmente utilizadas para la tos y el resfriado y sus efectos secundarios.

Tabla 1. Un perfil de medicaciones habituales en la tos común y el resfriado y sus efectos secundarios

Medicación	Propósito	Efectos secundarios y consideraciones especiales
Agonistas beta2 en aerosol (por ejemplo, albuterol)	Revertir broncoespasmo postinflamatorio	Aumenta el ritmo cardíaco y puede causar temblores
Productos de combinación de líquidos a base de alcohol	Tratar síntomas múltiples	Potencial somnolencia y problemas de coordinación
Agonistas Alfa1 (oral) (por ejemplo, pseudoefedrina, fenilpropanolamina)	Descongestión	Puede causar taquicardia, nerviosismo, estimulación transitoria, mareos, somnolencia, elevación de la presión arterial
Compuestos anticolinérgicos: Bromuro de ipratropio (tópico)	Secar	Puede causar sequedad nasal y epistaxis ocasional
Otros anticolinérgicos (por ejemplo, metescopolamina, atropina, hiosciamina)	Secar	Puede causar ortostasis, disfunción de la regulación térmica, sequedad de boca, estreñimiento
Antihistamínicos (oral) (por ejemplo, clorfeniramina, difenhidramina)	Secar	Somnolencia, sequedad de boca, hipertensión ortostática
Cápsulas de benzonatato	Supresión de la tos, anestesia local	Masticar puede entumecer la boca; puede causar sedación, mareos
Codeína, hidrocodona	Supresión de la tos	Somnolencia, estreñimiento, náuseas
Dextrometorfano	Supresión de la tos	Posible somnolencia, pero efectos secundarios poco frecuentes
Guaifenesina	Promueve la expectoración (mucolisis)	No tiene efectos secundarios, debe ser tomada con mucha agua para mejorar la eficacia
Descongestionantes tópicos (por ejemplo, oximetazolina, fenilefrina)	Descongestión	Ardor local, el uso prolongado puede causar dependencia
Pastillas de Zinc y vitamina C	Posible reducción en la gravedad y duración del síntoma	Posible alteración del gusto, aumento de cálculos de oxalato si es susceptible

Resumen de

<http://www.physsportsmed.com/issues/1998/02feb/swain.htm>

5 **El uso del interferón súper-compuesto para evitar o tratar URI**

0044 Casi el 70-80% de URI son causadas por virus tales como el virus respiratorio Sincitial, adenovirus, rinovirus, virus de coxsackie, coronavirus y su variante, virus de gripe A y su variante, virus de gripe B y su variante, virus de parainfluenza y su variante, o enterovirus y su variante. Una causa principal de URI en el adulto es del rinovirus. Para los niños, el virus sincitial respiratorio y el virus parainfluenza son dos de las principales causas de URI.

10 0045 El interferón súper-compuesto juega un papel importante en la lucha contra el virus que causa URI. El interferón súper-compuesto obtiene sus efectos anti-virus principalmente por dos mecanismos:

1. Fijar a la superficie de células sensibles e inducir las a producir la proteína anti-virus, luego bloquear la duplicación y reproducción de los virus *in vivo*.

15 2. El interferón súper-compuesto puede ajustar la respuesta inmune, incluyendo respuesta inmune de células T, actividad de células NK, función de fagocitosis de monocarion, e incluso formación de algunos anticuerpos *in vivo*.

0046 En el tratamiento de URI, el interferón súper-compuesto puede aplicarse directamente en la zona afectada a través de una inspiración de aerosol. Este método de tratamiento permite al interferón llegar a las células diana directamente. En consecuencia, comercializar el suministro como aerosol, en lugar de vía oral o inyección, sería más seguro y eficaz para administrar el interferón.

5 **Uso del interferón súper-compuesto para evitar o tratar el SARS**

10 0047 Con el consentimiento del *grupo de trabajo de Sichuan en la prevención y control del SARS*, la distribución del súper compuesto interferón se inició en mayo de 2003. El aerosol de interferón súper-compuesto fue distribuido a médicos y enfermeras en hospitales, zonas pobladas con un alto riesgo de SARS, y al *grupo de investigación Nacional sobre prevención y control de SARS*. Entre los 3.000 usuarios al 19 de Diciembre de 2003, no hubo informes de efectos secundarios relacionados con el uso del aerosol. Por otra parte, ninguno de los médicos y enfermeras, la gente de la provincia de Sichuan, u otras organizaciones que han usado el aerosol de interferón súper-compuesto ha sido infectado por el SARS.

15 0048 Por lo tanto, esta invención proporciona un método para inhibir, evitar o tratar la replicación del virus o células infectadas por el virus poniendo en contacto dicho virus o células infectadas con una cantidad eficaz del interferón súper-compuesto definido anteriormente.

0049 Este interferón súper-compuesto es útil en la inhibición, prevención o tratamiento de los siguientes cánceres o tumores:

Cáncer	Cáncer de Piel	Carcinoma basocelular
		Melanoma maligno
	Carcinoma de células renales	
	Cáncer de hígado	
	Cáncer de tiroides	
	Cáncer rinofaríngeo	
	Carcinoma sólido	Cáncer de próstata
		Cáncer de estómago/abdominal
		Cáncer de esófago
		Cáncer rectal
		Cáncer de páncreas
	Cáncer de ovario y cáncer de vejiga superficial	
	Hemangioma	
	Carcinoma epidermoide	Cáncer de cuello uterino
Cáncer de pulmón de células no pequeñas		
Cáncer de pulmón de células pequeñas		
Glioma		
Enfermedad de Hemal maligno	Leucocitemia	Leucocitemia aguda
		Leucocitemia Crónica
	Leucemia mieloide crónica	
	Leucemia de células pilosas	
	Linfadenoma	
	Mieloma múltiple	
Policitemia Vera		
Otros	Sarcoma de Kaposi	

- 5 0050 **Paciente #1.** Una paciente con cáncer de ovario comenzó a recibir inyecciones. Ella recibió inyecciones de 15µg el 14 de Julio, 16 de Julio, 18 de Julio, 20 de Julio y 22 de Julio. El 14 de Julio, se observó 2000ml de líquido peritoneal. La paciente se sometió a quimioterapia el 22 de Julio. El 3 de Agosto, se abrió el peritoneo de la paciente. Se esperaba encontrar 2l de líquido, pero sólo se observó 200ml de líquido. Los ovarios derecho e izquierdo y los nodos linfáticos eran cancerosos. Todos los demás órganos estaban limpios.
- 10 0051 **Paciente #2.** Un paciente con cáncer de riñón fue tratado de la siguiente manera. En un período de medio mes, el paciente recibió 3 inyecciones de 9 µg de rSIFN-co y 3 inyecciones de 15 µg de rSIFN-co. En un mes completo después de estas inyecciones, recibió inyecciones de 9 µg y 15 µg de rSIFN-co cada dos días. Una biopsia renal no mostró metástasis después de este curso de tratamiento. El paciente mostró una recuperación completa. Cada medio año después de la recuperación, el paciente recibió inyecciones de 15 µg de rSIFN-co 15 veces durante un período de un mes.
- 15 0052 En consecuencia, esta invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de tumor o célula cancerosa por contacto con el interferón súper-compuesto como se ha definido anteriormente con dichas células tumorales o cancerosas.
- 20 0053 En una realización adicional, el interferón súper-compuesto inhibe la duplicación del ADN y la secreción de HBsAg y HBeAg del virus de la Hepatitis B.
- 0054 Esta invención también proporciona códigos de genes artificiales para el interferón súper-compuesto. Está dentro de la experiencia ordinaria para diseñar un gen artificial. Muchos métodos para generar secuencia de nucleótidos y otras técnicas de biología molecular se han descrito anteriormente. Ver por ejemplo, Joseph Sambrook y David W. Russell, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Diciembre de 2000, publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 25 0055 Esta invención proporciona un vector que comprende la secuencia de polinucleótido mostrada en la Fig. 1 que codifica para el interferón súper-compuesto como se define anteriormente.
- 0056 Esta invención proporciona un sistema de expresión que comprende el vector como se define anteriormente. Las células incluyen, pero no se limitan a, células procariotas o eucariotas.
- 30 0057 Esta invención también proporciona una célula huésped que comprende el vector como se define anteriormente.
- 0058 Esta invención proporciona un proceso para la producción de interferón súper-compuesto recombinante como se define anteriormente, que comprende introducir la secuencia de polinucleótido mostrada en la Fig. 1 con preferencia de codón seleccionado en huésped E. Coli, cultivar dicho huésped introducido en una condición apropiada para la expresión de dicho interferón compuesto y cosechar el interferón compuesto expresado.
- 35 0059 El proceso puede comprender la extracción del interferón súper-compuesto del caldo de fermentación, recolección de cuerpos de inclusión, desnaturalización y renaturalización de la proteína cosechada.
- 0060 El proceso puede mantener la alta eficacia incluso cuando el interferón súper-compuesto es usado con un agente y en una concentración particular. El proceso también comprende separación y purificación del súper-compuesto interferón. El proceso comprende además la liofilización del interferón súper-compuesto purificado. El proceso comprende producción de inyección de líquido del súper-compuesto interferón.
- 40 0061 Esta invención también proporciona el interferón súper-compuesto producido por los procesos anteriores.
- 0062 Esta invención proporciona una composición que comprende el interferón recombinante súper-compuesto como se define anteriormente y un portador adecuado.
- 45 0063 Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el interferón súper-compuesto recombinante como se define anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 0064 Esta invención proporciona un método para tratar o evitar enfermedades virales o tumores en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del interferón súper-compuesto como se define anteriormente.
- 50 0065 Esta invención proporciona el método descrito anteriormente en el que las enfermedades virales incluyen, pero no se limitan a, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, otros tipos de hepatitis, infecciones de virus causadas por el virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus del herpes simple, u otro tipo de virus de herpes, papovavirus, poxvirus, picornavirus, adenovirus, rinovirus, virus I de leucemia de células T humanas, o virus II de leucemia de células T humanas, o virus III de leucemia de células T humanas.
- 0066 Esta invención proporciona el método descrito anteriormente en donde se administró interferón súper-compuesto por vía oral, por inyección en vena, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal o mucosal, o por inhalación mediante un inspirador.

0067 Esta invención proporciona el método descrito anteriormente en donde el interferón súper-compuesto se administró siguiendo el protocolo de inyecciones de 9µg o 15 µg cada dos días, 3 veces por semana, durante 24 semanas.

5 0068 Fue sorprendente descubrir que rSIFN-co, cuya estructura espacial se ha cambiado, no es sólo una preparación para inhibir la duplicación de ADN de la hepatitis B, sino que inhibe la secreción de HBsAg y HBeAg en células 2.2.15.

0069 Un objetivo de esta invención es ofrecer una preparación de rSIFN-co para inhibir directamente la duplicación del ADN de virus de hepatitis B y la secreción de HBeAg y HBsAg de la hepatitis B y disminuirlas a niveles normales.

10 0070 En una realización, se produjo rSIFN-CO con técnicas recombinantes. En la condición de secuencia fija de aminoácidos, el ADN IFN fue rediseñado de acuerdo con el uso de codones *E. Coli.* y luego el gen rSIFN-co fue sintetizado artificialmente. ADNc rSIFN-CO fue clonado en el vector de alta expresión de *E. Coli.* por técnicas de recombinación de ADN, y se logró una alta expresión de rSIFN-co usando mecanismo de inducción/activación de L-arabinosa para activar la transcripción del promotor P_{BAD}.

15 0071 En comparación con la termo-inducción usual, sistemas de inducción de pH e inducción de IPTG de ingeniería genética, el sistema de inducción/activación de arabinosa tiene algunas ventajas: (1) Sistemas comunes liberan la función promotora mediante la creación de un patrón de "desrepresión". Luego los promotores inducen expresión génica aguas abajo. El cambio de temperatura y pH y la adición de IPTG no pueden activar promotores directamente. En el sistema aquí revelado, L-arabinosa no sólo desactiva y reprime sino también activa la transcripción del promotor P_{BAD} que induce una alta expresión de rSIFN-co. Por lo tanto, el sistema de inducción/activación de arabinosa es un sistema de expresión más eficaz. (2) La relación entre exógeno y dosis de L-arabinosa es lineal. Esto significa que la concentración de arabinosa se puede cambiar para ajustar el nivel de expresión del gen exógeno. Por lo tanto, es más fácil controlar el nivel de expresión del gen exógeno en *E. Coli.* por arabinosa que por cambios de temperatura y valor de pH. Esta característica es significativa para la formación de cuerpos de inclusión. (3) L-arabinosa es capaz, barata y segura, que, por el contrario, son las desventajas de otros inductores tales como IPTG.

20 0072 Esta realización crea una cepa de ingeniería de *E. Coli.* que expresa rSIFN-co eficaz y resistente con un sistema de inducción/activación de L-arabinosa. La cepa se cultiva y fermenta en condiciones adecuadas para cosechar los organismos bacterianos. Los cuerpos de inclusión se purifican después de destruir bacterias y lavar repetidamente. El resultado final, la masa de alta pureza de proteína rSIFN-co de configuración espacial cambiada para esta invención y para tratamiento clínico, se obtuvo de la desnaturalización y renaturalización de cuerpos de inclusión y de una serie de etapas de purificación.

30 0073 Las siguientes son algunas preparaciones de rSIFN-co: comprimidos, cápsulas, líquidos para consumo oral, pastas, inyecciones, aerosoles, supositorios, y soluciones. Se recomiendan inyecciones. Es común inyectar el medicamento por vía subcutánea o por vena. El portador del medicamento podría ser cualquier portador de medicamento aceptable, incluyendo carbohidratos, celulosa, adhesivo, colapso, emoliente, relleno, agente de adición de disolvente, amortización, conservante, agente espesante, adaptador, etc.

0074 Esta invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la composición anterior y un portador farmacéuticamente aceptable.

40 0075 Para los fines de esta invención, "portadores farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquiera de los portadores farmacéuticos convencionales. Ejemplos de portadores adecuados son bien conocidos en la materia y pueden incluir, pero no se limitan a, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato y diversos agentes humectantes. Otros portadores pueden incluir aditivos utilizados en comprimidos, gránulos, cápsulas, etc. Normalmente, tales portadores contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales del mismo, estearato de calcio o magnesio, talco, grasas o aceites vegetales, goma, glicoles u otros excipientes conocidos. Tales portadores también pueden incluir aditivos de sabor y color u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden tales portadores se formulan por métodos convencionales bien conocidos.

45 0076 Esta invención proporciona un método para evitar o tratar el Síndrome Respiratorio Agudo Grave, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus, de un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de interferón recombinante súper-compuesto como se define anteriormente.

0077 En una realización del método anterior, el interferón es α , β , o ω .

0078 El interferón súper-compuesto como se ha definido anteriormente puede ser administrado por vía oral, por inyección en vena, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal o mucosal, o, por inhalación vía un inspirador.

55 0079 En una realización, el interferón es suministrado por un dispositivo de aerosol.

0080 En una realización específica, el dispositivo se describe en la Figura 7.

0081 En una de las realizaciones, el interferón se liofiliza.

5 0082 Esta invención proporciona un método para inhibir el agente causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidos por virus, que comprende poner en contacto el agente con una cantidad eficaz del interferón súper compuesto como se ha definido anteriormente.

0083 Se determina que el agente causante del SARS es un virus. Véase, por ejemplo. Rota et al (2003), Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. Science 1085952 www.scienceexpress.org and Marra, et al. (2003), The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus. Science 1085853 www.scienceexpress.org.

10 0084 Esta invención también proporciona un método para inhibir el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo o células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus o células infectadas con virus capaces de inducir enfermedades del tracto respiratorio superior, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz del interferón súper-compuesto como se define anteriormente, con dicho virus o célula. Este contacto puede ser directo o indirecto.

15 0085 Esta invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz del interferón súper-compuesto como se ha definido anteriormente capaz de inhibir el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo o células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus o células infectadas con virus capaces de inducir enfermedades del tracto respiratorio superior, y un portador adecuado.

20 0086 Esta invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz del interferón súper-compuesto como se ha definido anteriormente capaz de evitar o tratar el Síndrome Respiratorio Agudo Severo, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus, de un sujeto y un portador adecuado.

25 0087 Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del súper compuesto interferón recombinante como se ha definido anteriormente capaz de inhibir el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo o células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus, y un portador farmacéuticamente aceptable.

30 0088 Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del interferón recombinante súper-compuesto como se define anteriormente capaz de evitar o tratar el Síndrome Respiratorio Agudo Severo, o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus, en un sujeto y un portador farmacéuticamente aceptable.

0089 Esta invención proporciona un dispositivo para suministrar la composición farmacéutica descrita anteriormente.

0090 En una realización preferida, el sujeto es un humano. Como fácilmente se puede apreciar, el interferón súper-compuesto como se ha definido anteriormente se puede utilizar en otros animales o mamíferos.

35 0091 Esta invención proporciona un método para evitar el Síndrome Respiratorio Agudo Severo o enfermedades del tracto respiratorio superior inducidas por virus, en humanos que comprende la aplicación del interferón súper-compuesto como se ha definido anteriormente tres veces al día vía un aerosol que contiene veinte microgramos de interferón, igual a diez millones de unidades de actividad en tres mililitros.

40 0092 Esta invención se entenderá mejor a partir de los ejemplos que siguen. Sin embargo, un experto en la materia apreciará fácilmente que los métodos específicos y los resultados discutidos son meramente ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen posteriormente.

DETALLES EXPERIMENTALES

EJEMPLO 1

45 0093 rSIFN-co es una nueva molécula de interferón construida de acuerdo a aminoácidos conservadores en el subtipo IFN- α humano utilizando métodos de ingeniería genética. Se ha demostrado que rSIFN-co tiene actividad IFN de amplio espectro, tal como alta actividad antiviral y de inhibición de tumores, especialmente para tratar eficazmente la hepatitis C.

0094 El codón de E. coli. se utilizó para rediseñar el ADNc de rSIFN-co y luego sintetizar artificialmente el ADNc de rSIFN-co de secuencias publicadas de ADN de rSIFN-co y secuencias de aminoácidos deducidas (Figura 1).

50 0095 Con el fin de conseguir proteína-rSIFN co pura, se clonó ADN de rSIFN-co en el vector de alta expresión de E. Coli., y se utilizó L-arabinosa, que puede activar el promotor fuerte P_{BAD} en vectores, para inducir alta expresión del gen rSIFN-co.

Síntesis de la secuencia de ADN de *E. Coli*

Rediseño de la secuencia de ADN de rSIFN-co

5 0096 ADNc de rSIFN-co se rediseñó de acuerdo con el uso de codones de *E. Coli*. para conseguir una alta expresión en *E. Coli*. La secuencia deducida de aminoácidos de la secuencia rediseñada de ADNc de rSIFN-co es completamente coincidente con la secuencia de aminoácidos primitiva del rSIFN-co publicado (Figura 1).

Síntesis de la secuencia de ADNc de rSIFN-co

Síntesis semi-molecular del ADNc de rSIFN-co del extremo 5' y extremo 3'.

0097 Dos semi-moleculares pueden ser sintetizados directamente: ADNc de rSIFN-co 280pb extremo 5' (fragmento I) y 268bp extremo 3' (fragmento II) por PCR. Hay superposición de 41bp entre fragmento II y fragmento I.

10 (1) fragmento oligodeoxinucleótido de síntesis química:

0098

Oligómero A:

5 ' ATGTGCGACCTGCCGCAGACCCACTCCCTGGGTAACCGTCGTGCTCTGATCCTGCTGGCTCA
GATGCGTCGTATCTCCCCGTTCTCCTGCCTGAAAGACCGTCACGAC3 '

Oligómero B:

5 ' CTGAAAGACCGTCACGACTTCGGTTTCCCGCAGGAGAGGTTTCGACGGTAACCGTTCAGAG
AGCTCAGGCTATCTCCGTTCTGCACGAAATGATCCAGCAGACCTTC3 '

15

Oligómero C:

5 ' GCTGCTGGTACAGTTCGGTGTAGAATTTTCCAGCAGGGATTCGTCCCAAGCAGCGGAGGAG
TCTTTGGTGGAGAACAGGTTGAAGGTCTGCTGGATCATTTTC3 '

Oligómero D:

5 ' ATCCCTGCTGGAAAAATTCTACACCGAACTGTACCAGCAGCTGAACGACCTGGAAGCTTGCG
TTATCCAGGAAGTTGGTGTGAAGAAACCCCGCTGATGAAC3 '

20

Oligómero E:

5 ' GAAGAAACCCCGCTGATGAACGTTGACTCCATCCTGGCTGTTAAAAAATACTTCCAGCGTAT
CACCTGTACCTGACCGAAAAAAATACTCCCCGTGCGCTTGGG3 '

Oligómero F:

5 ' TTATTCTTTACGACGCAGACGTTCCCTGCAGGTTGGTGGACAGGGAGAAGGAACGCATGATTT
CAGCACGAACAACTTCCCAAGCGCACGGGGAGTATTTTTTTTTTCGGTCAGG3 '

ES 2 473 622 T3

0099 PCR I para el Fragmento I: oligodesoxinucleótido B como plantilla, oligodesoxinucleótido A y C como cebadores, 280 pb de Fragmento I sintetizados.

0100 Mezcla PCR I: (unidades: µl)

Agua destilada esterilizada	39
Tampón 10xPfu (Stratagen American Ltd.)	5
Mezcla dNTP (concentración de dNTP 2.5 mmol/L)	2
Cebador de Oligómero A (25 µmol/L)	1
Cebador de Oligómero C (25 µmol/L)	1
Plantilla de Oligómero B (1 µmol/L)	1
Pfu ADN Polimerasa (Stratagen American Ltd.)	1
Volumen total	50µl
PCR, ciclo : 95 I	
2m→(95°C45s→65°C1m→72°C1m)x25 ciclo→72°C10m→4°C	

5

0101 PCR II para el Fragmento II: oligodesoxinucleótido E como plantilla, oligodesoxinucleótido D y F como cebadores, 268 pb sintetizados de Fragmento II.

Mezcla PCR II:

(unidades: µl)

Agua destilada esterilizada	39
Tampón 10xPfu (Stratagen American Ltd.)	5
Mezcla dNTP (concentración de dNTP 2.5 mmol/L)	2
Cebador de Oligómero A (25 µmol/L)	1
Cebador de Oligómero C (25 µmol/L)	1
Plantilla de Oligómero B (1 µmol/L)	1
Pfu ADN Polimerasa (Stratagen American Ltd.)	1
Volumen total	50µl
Ciclo PCR: el mismo que PCR I	

10

Montaje del ADNc de rSIFN-co

0102 Fragmento I y II fueron montados juntos para obtener la secuencia molecular completa del ADNc de rSIFN-co utilizando el método de superposición y extensión de PCR. Enzimas de restricción Nde I y Pst I se introdujeron para clonar la secuencia de ADNc de rSIFN-co en el plásmido.

15 (1) Cebadores de síntesis química

0103

Oligómero G: 5'ATCGGCCATATGTGCGACCTGCCGCAGACCC3'

Oligómero H: 5'ACTGCCAGGCTGCAGTTATTCTTTACGACGCAGACGTTCC3'

(2) Superposición y extensión de PCR

0104

Mezcla PCR:	(unidades: µl)
Agua destilada esterilizada	38
Tampón 10XPfu (Stratagen American Ltd.)	5
Mezcla dNTP (concentración dNTP 2.5 mmol/L)	2
Cebador G (25 µmol/L)	1
Cebador H (25 µmol/L)	1
*producción fragmento I (1 µmol/L)	1
*producción fragmento II (1 µmol/L)	1
Pfu ADN Polimerasa (Stratagen American Ltd.) (2.5U/µL)	1
Volumen total	50µl
*separar y purificar la producción PCR con el kit de purificación de PCR StratePrep producido por Stratagen American Ltd. Y disolver en agua destilada esterilizada.	
Ciclo PCR: el mismo que PCR I	

5 **Análisis de clonación y secuencia del gen rSIFN-co**

0105 El plásmido pLac T7 como vector de clonación. El plásmido pLac T7 se reconstruye con pBluescript II KS(+) plásmido producido por Stratagen (Figura 3).

10 0106 La producción de PCR purificado de ADNc de rSIFN-co con el kit de purificación de PCR StrataPrep. Digerir ADNc y plásmido pLac T7 con NdeI y PstI. Ejecutar electroforesis en gel de agarosa 1% y separar estos fragmentos de ADN de doble digestión. Recuperar fragmento de ADN de rSIFN-co 507bp de longitud y el fragmento de ADN plásmido de 2.9kb. Ligar estos fragmentos mediante ADN ligasa T4 para formar un plásmido recombinante. Transformar las células competentes DH_{5α} (Gibco) con el plásmido recombinante, cultivar a 37°C durante la noche. Identificar la colonia recombinante positiva, llamado PHY-1.

15 0107 Ejecutar la secuenciación de ADN con el Kit De Secuenciación De Ciclo SequiTherm™ producido por American Epicentre Technologies Ltd utilizando L1-COR Model 4000L. Los cebadores son cebador de secuencia común T7 y T3, el resultado de la secuenciación de ADN coincide con el diseño teórico.

0108 Purificar el rSIFN-co, secuenciar los aminoácidos N-terminal, la secuencia de aminoácidos N-terminal coincide con el diseño experimental que es como sigue:

20 N- Cys-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser-Leu-Gly-Asn-Arg-Arg-Ala-
Leu-

Construcción, transformación, identificación, y estabilidad hereditaria del vector de expresión

Construcción y transformación de vector de expresión

25 0109 El vector de expresión *E. Coli*. digerido PHY-4 (ver la Figura 3) con Nde I para linealizar y posteriormente digerir con Xba I. Ejecutar al electroforesis en gel de agarosa 1%, y purificar el fragmento de digestión 4.8 kb PHY-4 Nde I-Xba I con el kit QIAEX II producido por QIAGEN Germany Ltd.

30 0110 Al mismo tiempo, el plásmido pHY-4 es doblemente digerido con Nde I-Xba I. Ejecutar electroforesis en gel de agarosa 1% y purificar el fragmento de 715bp. Ligar los fragmentos de rSIFN-co y PHY-4 con ADN ligasa T4 para construir el plásmido recombinante (Ver Figura 4). Transformar las células competentes DH_{5α} con el plásmido recombinante. Extender las células transformadas sobre placa LB con Amp, cultivar a 37°C durante la noche.

Cribado de cepa de clonación positiva

5 0111 Las colonias *E. Coli.* se eligen al azar de arriba de la placa LB, se criba las cepas positivas que contienen el vector recombinante por digestión con endonucleasas y análisis de PCR. Se nombra uno de los plásmidos recombinantes positivos pHY-5, y se nombra la cepa que contiene plásmido pHY-5 PVIII. Se amplifica y almacena la cepa positiva con glicerol a -80°C.

Alta Expresión del gen rSIFN-co en *E. Coli.*

10 0112 En el plásmido pHY-5, el gen rSIFN-co está bajo el control del promotor fuerte P_{BAD}. Este promotor está regulado positiva y negativamente por el producto del gen *araC*. *AraC* es un regulador transcripcional que forma un complejo con arabinosa. En ausencia de arabinosa, el dímero *AraC* se enlaza a O₂ y I₁, formando un bucle de 210pb. Esta conformación conduce a una inhibición completa de la transcripción. En presencia de arabinosa, el dímero se libera de O₂ y se une a I₁ e I₂ conduciendo a la transcripción. El enlace de arabinosa desactiva, reprime, e incluso activa la transcripción del promotor P_{BAD}, que estimula P_{BAD}, induciendo alta expresión de rSIFN-co. El nivel de expresión de rSIFN-co en PVIII es más de 50% del total de proteína *E. Coli.*

Resumen

15 0113 RSIFN-CO es una nueva molécula de interferón construida artificialmente de acuerdo con el aminoácido conservador de interferones α humanos. Se ha demostrado como un fármaco eficaz contra la hepatitis. Con el fin de obtener suficiente proteína rSIFN-co pura, se construyó una cepa *E. Coli.* recombinante estable que expresa altamente la proteína rSIFN-co.

20 0114 Primero, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de rSIFN-co publicada, se usó el codón *E. Coli.* para sintetizar todo el ADNc de rSIFN-co. Este fragmento de ADN fue secuenciado, probando que la secuencia de 501bp de codón y la secuencia de codón de terminación TAA son válidas e idénticas al diseño teocrático. El análisis subsiguiente reveló que la secuencia de aminoácidos N-terminal y de aminoácidos compuesta de rSIFN-co producida por la cepa recombinante eran ambas idénticas a la predicción.

25 0115 El ADNc de rSIFN-co fue clonado en el plásmido pHY-4 del vector de alta expresión de *E. coli.* para construir el plásmido recombinante pHY-5. La cepa *E. coli.* LMG194 fue de nuevo transformada con plásmido pHY-4 para obtener el transformante de alta expresión rSIFN-co estable. Este transformante se cultivó durante 30 generaciones. La herencia de plásmido recombinante pHY-5 en *E. Coli.* LMG194 fue normal y estable, y la expresión de rSIFN-co fue alta y constante.

30 0116 *E. Coli.* LMG194, que contiene plásmido pHY-5 recombinante, es de hecho una ideal cepa de ingeniería de alta expresión.

Referencias

0117

1. Blatt LM, Davis JM, Klein SB. et al. The biologic activity and molecular characterization of a novel synthetic interferon-alpha species, consensus interferon. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 1996;16(7):489-499.

35 2. Alton,K. et al: Production characterization and biological effects of recombinant DNA derived human IFN- α and IFN- γ analogs. In: De Maeger E, Schellekens H. eds. *The Biology of Interferon System*.2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983: 119-128

3. Pfeffer LM. Biologic activity of natural and synthetic type 1 interferons. *Seminars in Oncology*, 1997;24 (3 suppl 9):S9-63--S9-69.

40 4. Ozes ON, Reiter Z, Klein S, et al. A comparison of interferon-con1 with natural recombinant interferons-(: antiviral, antiproliferative, and natural killer-inducing activities. *J. Interferon Res.*, 1992; 12:55-59.

5. Heathcote E JL, Keeffe EB, Lee SS, et al. Re-treatment of chronic hepatitis C with consensus interferon. *Hepatology*, 1998;27(4):1136-1143.

45 6. Klein ML, Bartley TD, Lai PH, et al. Structural characterization of recombinant consensus interferon-alpha. *Journal of Chromatography*, 1988; 454:205-215.

7. The Wisconsin Package, by Genetics Computer Group, Inc. Copyright 1992, Medison, Wisconsin, USA

8. Nishimura, A et al: A rapid and highly efficient method for preparation of competent *E. coli* cells. *Nuclei. Acids Res.* 1990, 18:6169

50 9. All molecular cloning techniques used are from: Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.1989.

10. Guzman, L. M et al: Tight regulation, modulation, and high-level express-ion by vectors containing the arabinose PBAD promoter. J. Bacteriol. 1995, 177: 4121~ 4130.

SECUENCIA DE ADNc DE rSIFN-co DISEÑADA SEGÚN EL USO DEL CODON E.COLI. Y SECUENCIA DEDUCIDA DE AMINOACIDO DE rSIFN-co

5 0118

```

5'      11      21      31      41      51
+1 M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A
1 ATGTGCGACC TGCCGCAGAC CCACTCCCTG GGTAACCGTC GTGCTCTGAT CCTGCTGGCT

TACACGCTGG ACGGCGTCTG GGTGAGGGAC CCATTGGCAG CACGAGACTA GGACGACCGA

5'      71      81      91      101     111
+1 Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P
61 CAGATGCGTC GTATCTCCCC GTTCTCCTGC CTGAAAGACC GTCACGACTT CGGTTTCCCG
GTCTACGCAG CATAGAGGGG CAAGAGGACG GACTTTCTGG.CAGTGCTGAA GCCAAAGGGC

5'      131     141     151     161     171
+1 Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E
121 CAGGAAGAAT TCGACGGTAA CCAGTTCCAG AAAGCTCAGG CTATCTCCGT TCTGCACGAA
GTCTTCTTA AGCTGCCATT GGTCAAGGTC TTTTCGAGTCC GATAGAGGCA AGACGTGCTT

5'      191     201     211     221     231
+1 M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E
181 ATGATCCAGC AGACCTTCAA CCTGTTCTCC ACCAAAGACT CCTCCGCTGC TTGGGACGAA
TACTAGGTCG TCTGGAAGTT GGACAAGAGG TGGTTTCTGA GGAGGCGACG AACCTGCTT

5'      251     261     271     281     291
+1 S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C
241 TCCCTGCTGG AAAAAATTCTA CACCGAACTG TACCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCTTGC
AGGGACGACC TTTTAAAGAT GTGGCTTGAC ATGGTCGTCG ACTTGCTGGA CCTTCGAACG

5'      311     321     331     341     351
+1 V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A
301 GTTATCCAGG AAGTTGGTGT TGAAGAAACC CCGCTGATGA ACGTTGACTC CATCCTGGCT
CAATAGGTCC TTCAACCACA ACTTCTTTGG GCGACTACT TGCAACTGAG GTAGGACCGA

5'      371     381     391     401     411
+1 V K K Y F Q R I T L Y L T E K K Y S P
361 GTTAAAAAAT ACTTCCAGCG TATCACCTG TACCTGACCG AAAAAAATA CTCCCCGTGC
CAATTTTTTA TGAAGGTCGC ATAGTGGGAC ATGGACTGCG TTTTTTTAT GAGGGGCACG

```

ES 2 473 622 T3

```
5'          431          441          451          461          471
+1 A W E V V R A E I M R S F S L S T N L
Q
421 GCTTGGGAAG TTGTTCTGTC TGAAATCATG CGTTCCTTCT CCCTGTCCAC CAACCTGCAG
   CGAACCTTC AACAAGCACG ACTTTAGTAC GCAAGGAAGA GGGACAGGTG GTTGGACGTC

          5'          491          501
+1   E R L R R K E #
481 GAACGTCTGC GTCGTAAAGA ATAA
   CTTGCAGACG CAGCATTCT TATT
```

EJEMPLO 2

Separación y purificación de rSIFN-co

1. Fermentación

- 5 0119 Se inocula la cepa recombinante en medio LB, agitando (200 rpm) a 37°C durante la noche (aproximadamente 18 horas), luego añadir 30% de glicerol al caldo de fermentación para obtener una concentración final de 15%, asignado a un tubo de 1 ml y mantenido a -20°C como semilla para producción.
- 10 0120 Añadir 1% de la semilla a medio LB, agitando (200 rpm) a 37°C durante la noche para ampliar la escala de la semilla, luego añadir a medio RM con una proporción de 10%, cultivando bajo 37°C. Añadir arabinosa (solución al 20%) al 0.02% como un inductor cuando la OD600 alcanza aproximadamente 2.0. 4 horas después de ello, detener el proceso de cultivo, recoger las bacterias mediante centrifugación, resuspender el pellet con tampón A, y mantener en -20°C durante la noche. Descongelar y romper las bacterias mediante homogeneizador, después centrifugar. Lavar el pellet con tampón B, tampón C, y agua destilada para conseguir un cuerpo de inclusión relativamente puro.

2. Desnaturalización y renaturalización

- 15 0121 Disolver el cuerpo de inclusión en Guanidina-HCl (o urea) de 6 mol/L. La solución será un poco nublada. Centrifugar a una velocidad de 10.000 rpm. Determinar la concentración de proteína del sobrenadante. Este sobrenadante se llama "solución de desnaturalización." Añadir la solución de desnaturalización al tampón de renaturalización, y mantener la concentración final de proteína a 0.3 mg/ml. Es mejor añadir la solución totalmente desnaturalizada en tres pasos en lugar de un solo paso. Mantener la solución durante la noche a 4°C. Después,
- 20 dializar 10 mol/L, 5 mol/L de tampón PB y agua destilada, y luego ajustar su pH por 2 mol/L HAc-NaAc. Dejar reposar y luego filtrar.

3. Purificación

0122 POROS HS/M cromatografía de intercambio de aniones:

- 25 Columna equivalente con 20 mmol/L de HAc-NaAc (pH 5.0)
- ↓
- Cargar muestras a una velocidad de 30 ml/min
- ↓
- Lavar con 20 CV 20 mmol/L de HAc-NaAc(pH 5.0)
- 30 ↓
- 5 CV de 0.15 mol/L de NaCl 20 mmol/L HAc-NaAc (pH 5.0) de lavado
- ↓
- 3 CV de 0.18 mol/L de NaCl+20 mmol/L HAc-NaAc(pH 5.0) de lavado
- ↓

ES 2 473 622 T3

0.25 mol/L de NaCl + 20 mmol/L de HAC-NaAc (pH 5.0) eluir proteína diana

0123 Quelante de Sefarosa™ de flujo rápido: Añadir tampón PB de 0.2 mol/L (pH 6.6) y NaCl de 4 mol/L en la solución de HS para ajustar pH de solución a pH 6.0 y la concentración de NaCl a 1 mol/L.

Columna con tampón D

5

↓

Cargando a una velocidad de 1 ml/min

↓

Lavar con tampón E

↓

10

Lavar con tampón F

↓

Eluir con tampón G

0124 Condensar la solución eluída por POROS HS/M. A veces se puede añadir una etapa de purificación por Sephacryl S-100 para cumplir con los requisitos de pureza más estrictos.

15 Nota:

0125

Tampón A: 100 mmol/l de Tris-HCl, pH 7.5-10 mmol/L de EDTA-100 mmol/L de NaCl

Tampón B: 50 mmol/L de Tris-HCl, pH 7.5-1 mol/L de urea-10 mmol/L de EDTA-0.5% de Triton X-100

Tampón C: 50 mmol/L de Tris-HCl, pH 7.5-2 mol/L de urea-10 mmol/L de EDTA-0.5% de Triton X-100

20

Tampón D: 1 mol/L de NaCl --- 50 mmol/L de Na₂HPO₄ (pH 5.5)

Tampón E: 1 mol/L de NaCl --- 50 mmol/L de Na₂HPO₄ (pH 5.0)

Tampón F: 1 mol/L de NaCl --- 50 mmol/L de Na₂HPO₄ (pH 4.0)

Tampón G: 1 mol/L de NaCl --- 50 mmol/L de Na₂HPO₄ (pH 3.6)

Tampón de renaturalización: 0.5 mol/L de Arginina-150 mmol/L de Tris-HCl, pH 7.5 a 0.2 mmol/L de EDTA

25 **Medio LB: 1L**

0126

Triptona 10 g

Extractos de levadura 5 g

NaCl 10 g

30 **Medio RM: 1L**

0127

Caseína 20 g

MgCl 1 mmol/L (0.203 g)

Na₂HPO₄ 4g;

35

KH₂PO₄ 3 g,

NaCl 0.5 g

NH₄Cl 1 g

0128 Después de la purificación, el tampón se cambió a PBS (pH 7.0) junto con la etapa de condensación por POROS HS/M. Esto se conoce como la "Solución Madre de Proteína". Se puede utilizar directamente en la preparación de inyecciones o aerosoles, o almacenado a 2-8°C.

Fórmula para inyección:

5 0129

	Solución	Polvo liofilizado
Solución de-rSIFN-co	34.5 µg/ml	34.5 µg/ml
PB (pH 7.0)	25 mmol/L	10 mmol/L
Glicina	--- ---- --	0.4 mol/L
NaCl	0.1 mol/L	---- --- ---

10

Para aerosol:

0130

EDTA	0.01%
Tween 80	0.05%
Citrato trisódico	10mmol/L
Glicerol	1.26%
Cloruro de sodio	0.03%
Fenilmetanol	0.5%
HSA	0.1%
rSIFN-co	10 mg/ml

15

20

PROCESO DE CONTROL DE CALIDAD

0131 Durante la purificación, se llevan a cabo ensayos para contenido de proteína, pureza de proteína, actividad específica y pirógeno después de cada paso. Cuando se obtiene la solución madre, todos los ensayos listados en la tabla se realizan uno después de otro.

25 0132 La calidad del producto se controla de acuerdo a "Requisitos Chinos para Biológicos."

1. Solución de proteína original

Lowry

0133

Artículo de Ensayo	Método
Solución Madre de Proteína	
Ensayo de Contenido de Proteína	Lowry
Ensayo de Pureza de la Proteína	Análisis SDS-PAGE no reductor (electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio) Análisis HPLC
Ensayo de Pesos Moleculares	SDS-PAGE reductor
Ensayo de Actividad Especifica	Según método en "Ensayo de Actividad Especifica" de Interferón
Ensayo de ADN Exógeno Sobrante	Utilizando un kit de detección y etiquetado de ADN

ES 2 473 622 T3

Ensayo de Actividad de Antibióticos Sobrantes	Según el método en "Métodos Químicos y otras Pruebas para Biológicos"
Ensayo de Endotoxina Bacteriana	Según el método en "Requerimientos para ensayo de endotoxina bacteriana de biológicos"
Ensayo de Punto Isoelectrónico	Electroforesis de focalización Isoeléctrica
Ensayo para Identificar Características de la Proteína	Espectro UV (rango de longitud de onda: 190-380nm)
	Mapeo de Péptidos (hidrolizado por enzima pancreática, analizado por columna C-18)
	Ensayo de secuencia N-terminal
	Ensayo de secuencia C-terminal
	Dicroísmo Circular
	Análisis de aminoácidos
Producto Semi-acabado	
Ensayo de Endotoxina Bacteriana	Según el método en "Requerimientos para la prueba de endotoxina bacteriana de biológicos"
Producto	
Control de Apariencia	
Química	Según método en "Métodos Químicos y Otras Pruebas para Biológicos"
Ensayo de Actividad Específica	Según método en "Prueba de Actividad Específica del Interferón"
Ensayo de Esterilidad	Según método en "c"
Ensayo de Toxicidad Anormal	Ensayo en Ratón
Ensayo de Pirógenos	Según método en "Requerimientos para la prueba de pirógenos de biológicos"
Ensayo de Estabilidad del Producto	
Nota: "Métodos de Ensayo Químicos y Otras para Biológicos", "Requerimientos para ensayo de pirógenos de biológicos" y "Requerimientos para ensayo de endotoxina bacteriana de biológicos" todos se pueden encontrar en "Requerimientos Chinos para Biológicos." "Requerimientos Chinos para Biológicos", PAN Zhengan, ZHANG Xinhui, DUAN Zhibing, et al. Comité Chino de Normalización de Biológicos. Publicado por Chemical Industry Publishing Company, 2000.	

EJEMPLO 3

Estabilidad de Polvo Liofilizado de la Inyección de Interferon Súper-Compuesto Recombinante

- 5 0134 Los experimentos de estabilidad se llevaron a cabo con muestras de polvo liofilizado de inyección de interferón súper-compuesto recombinante (rSIFN-CO) en dos especificaciones y tres lotes. Los experimentos comenzaron en Abril de 2000.

1. Fuente de Muestra

0135 Las muestras fueron administradas por Sichuan Huiyang Life-engineering Ltd., Provincia de Sichuan. Lot: 990101-03, 990101-05, 990102-03, 990102-05, 990103-03, 990103-05

2. Especificaciones de la Muestra

5 0136 Cada muestra en este experimento debe cumplir con los requisitos de la siguiente tabla.

Tabla 1 Estándar de muestras en el Experimento

Elementos	Estándares
1. Apariencia	polvo suelto blanco
2. Tiempo de disolución	disolver rápidamente en agua de inyección (dentro de 2min) a temperatura ambiente
3. Claridad	líquido incoloro o con poco resplandor lechoso; no debe ser turbio, con impureza o con depósito indiscernible
4. Valor pH	6.5~7.5
5. Potencia (IU/dosis)	80%~150% de cantidad indicada (9µg:4.5 3 10 ⁶ IU, 15µg: 7.5 3 10 ⁶ IU)
6. Humedad	No más de 3.0% (P/P)

3. Contenido Experimental

10 0137 Muestras de ensayo a 2~8°C: Las muestras de ensayo se pusieron en un refrigerador a 2~8°C, luego los elementos anteriores de estas muestras se ensayaron respectivamente en el mes 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36. Se registraron los resultados.

0138 Muestras de ensayo a 25°C: Las muestras de ensayo se pusieron en un termostato a 25°C, luego los elementos anteriores de estas muestras se ensayaron respectivamente en el en el mes 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30. Se registraron los resultados.

15 0139 Muestras de ensayo a 37°C: Las muestras de ensayo se pusieron en un termostato a 37°C, luego los elementos anteriores de estas muestras se ensayaron respectivamente en el mes 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24. Se registraron los resultados.

4. Resultados y Conclusión

0140

- 20 1) A 37°C, según los datos recogidos en los puntos designados durante el ensayo y comparados con los datos antes del ensayo, la potencia comenzó a descender a partir del 6º mes y los cambios en los tres lotes fueron similares. La apariencia de otros elementos no tenía cambios.
- 25 2) A 25°C, según los datos recogidos en los puntos designados durante el ensayo y comparados con los datos antes del ensayo, la potencia solo tuvo un pequeño cambio, y los cambios en los tres lotes fueron similares. La apariencia de otros elementos no tenía cambios.
- 3) A 25°C, según los datos recogidos en los puntos designados durante el ensayo y comparados con los datos antes del ensayo, las potencias de los tres lotes fueron todas estables. La apariencia de otros elementos tampoco no tuvo cambios.

30 0141 En conclusión, se sugiere que el polvo liofilizado de interferón súper-compuesto recombinante para inyección debe ser mejor almacenado y transportado a temperaturas bajas. Sin estas condiciones, el producto también puede ser almacenado durante periodos cortos (es decir, 3 meses) a temperatura ambiente.

EJEMPLO 3.5

Diagrama de Flujo de Producción de rSIFN-co

0142

1. Producción

5 1.1 Fermentación

Usar mezcla de LB+M9 como medio de cultivo. La cantidad de inóculo será 1.5%. Agitar a OD600=0.4 (unas 3.5 horas) a 32°C, luego elevar la temperatura a 42°C. Continuar la agitación otras 6 horas, la expresión de rSIFN-co alcanzará el máximo nivel. El examen bajo el escaneo del gel resultante de SDS-PAGE muestra que el nivel de expresión es de hasta 57%, que es el más alto estándar en China.

10 1.2 Purificación

Centrifugar la solución de bacterias para recoger el pellet bacteriano



Lavar con solución salina fisiológica dos (2) veces



15 Agregar tampón (50mM de Tris-HCl, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1-2 M urea), sonicación para romper las células bacterianas durante 20-30 minutos



Precipitar la solución tampón y lavar unas pocas veces hasta que el color se convierte en blanco puro



20 Usar 7M guanidina HCl para desnaturalizar



Diluir la Guanidina HCl para renaturalizar, dejar durante la noche



Usar Sefadex G25 para desalar

25



Usar 0.1 M de NaCl para aplicar Sefarosa-CM



Hacer elución escalonada para recoger el pico activo



30 Después de desalado el pico activo, aplicar a columna HPLC cargada positivamente



Usar 0.1 M de NaCl para hacer elución paso a paso, recoger el pico activo que es el producto de rSIFN-co



Agregar un portador de protección y agente liofilizante

35



Separar los materiales liofilizados (rSIFN-co)

La pureza del producto (rSIFN-CO) a partir de este procedimiento de producción es hasta 95% bajo la prueba de SDS-PAGE donde el peso molecular es de 14.5 kDa. La HPLC de fase inversa muestra un solo pico y la pureza es de hasta 97%. Su actividad específica es de hasta 1×10^9 UI/mg de proteína.

1.3 Envasado e Inspección

5 Después de la purificación por HPLC, se agregan 2% de albúmina de suero humano, 1% de sacarosa y 1% de glucosa a la rSIFN-co. A continuación se separa y se liofiliza en la muestra de inyección. Cuando se ensayó bajo el sistema de inspección Wish-VVS, el resultado fue 4.5×10^8 IU. Cuando se ensayó con inspección aséptica e inspección de pirógeno bajo el requisito estándar de China, los resultados fueron negativos. Este resultado cumple los requisitos para la inyección IV.

10 2. Control de Calidad

2.1 Características biológicas

(1) Al utilizar LB + M9 para cultivar bacterias, las características deben coincidir con las características típicas de la bacteria *E-coli*. No se detectaron otras bacterias.

(2) Cuando se frotó para la tinción de Gram e inspeccionó bajo un microscopio, es bacteria negativa.

15 (3) La reacción a los antibióticos es la misma que las bacterias originales.

(4) La inspección por microscopio electrónico muestra características típicas de la bacteria *E-coli*. No se detectó micoplasma, esporas de virus u otros microcontaminantes.

(5) El ensayo de reacción bioquímica muestra las características de bacteria *E-coli*.

2.2 Control de calidad de la expresión de interferón

20 (1) La expresión de interferón (cultivado en una plataforma de agitación) coincide con la cantidad de expresión en bacterias de entrada originales.

(2) Cuando se ensaya con suero anti-interferón, se muestra una reacción.

(3) inspección de plásmido: La digestión de restricción coincidió con el plásmido inicial.

2.3 Producto de cepa bacteriana

25 El producto de cepa bacteriana denota el espécimen de la cepa de la bacteria original que fue producido a partir de los procedimientos que se muestran en 1.2.

El producto de cepa bacteriana debe ser inspeccionado como sigue para asegurarse de que no hay derivación: Usar LB para colocar en placa 2-3 piezas y cultivar. Separar y tomar 5-10 grupos de bacterias para el ensayo de expresión de interferón. Repetir el ensayo al menos dos (2) veces. Utilizar únicamente el que muestra el mayor % para ser el producto de cepa bacteriana.

30

2.4 Inóculo

El inóculo denota el producto de cepa bacteriana elegida después de la fermentación. La cantidad, el tiempo de cultivo y el valor de OD más adecuado de inóculo pueden decidirse según la cepa bacteriana. Un procedimiento de bacterias anti-contaminadas debe aplicarse para cualquier inóculo que se produjera.

35 2.5 Crecimiento de la cepa bacteriana

El crecimiento de la cepa bacteriana se haría en un ambiente de sala Libre de Bacterias en donde no más de una bacteria esta creciendo en la misma sala. El mismo medio de cultivo será usado tanto para la cepa bacteriana como para el inóculo. El usado en rSIFN-co es LB.

2.6 Fermentación

40 (1) La fermentación se lleva a cabo sólo en una sala de fermentación limpia con un único entorno de fermentación de bacterias.

(2) La limpieza del recipiente de fermentación y el tubo se realiza dos veces, antes y después de la inserción del medio de cultivo. Luego, el recipiente se debe congelar para alcanzar la temperatura apropiada para el inóculo.

45 (3) Evitar el uso de antibióticos que pueden afectar al crecimiento celular en el medio de cultivo.

(4) Parámetros de la fermentación tales como temperatura, valor de pH, oxígeno disuelto y tiempo requerido se podrían variar de acuerdo con diferentes tipos de cepas bacterianas.

2.7 Recolección de bacterias

5 (1) Centrifugar la solución bacteriana para recoger las bacterias o usar otro método. Todos los aparatos deben limpiarse antes y después de la operación. La solución de desecho debe ser drenada después del procedimiento de limpieza.

(2) Las bacterias deben mantenerse a 4-8°C si se van a dividir dentro de las 24 horas. De lo contrario, deben mantenerse a -30°C. Las que se mantienen bajo tales condiciones se pueden usar dentro de 6 meses.

10 2.8 Lisis celular de bacterias

(1) Usar solución tampón apropiada para equilibrar la cepa bacteriana. La lisis celular se puede hacer por métodos físicos, químicos o biológicos. Usar centrifugadora para precipitar las bacterias y aplicar soluciones de limpieza.

15 2) Si se utiliza el método químico para dividir células, no se deben utilizar soluciones nocivas para los seres humanos.

2.9 Purificación

(1) La purificación se deshará de la mayor parte de los contenidos sin interferón. En el proceso de purificación, no debe encontrarse material tóxico alguno si se añaden elementos adicionales.

20 (2) Si se usa cromatografía de afinidad de anticuerpos para la purificación, debería haber una indicación de la fuente y el grado de pureza. También, se debe realizar inspección de IgG de menor calidad.

(3) Durante el proceso de purificación, la depuración de pirógenos es crítica. Todos los aparatos deben ser evaluados para eliminar esta interferencia.

25 (4) El interferón altamente concentrado se conoce como "producto intermedio". Tras la inspección y ensayos, agregar albúmina para elevar la concentración al 2%, lo que ahora se conoce como "producto intermedio de albúmina". Después del examen y ensayos, debe mantenerse a -30°C y nunca descongelarse antes de su uso. Este producto debe ser utilizado dentro de los 6 meses.

(5) La albúmina que se utiliza en este proceso también debe cumplir ensayos y requisitos tales como: negatividad bajo inspección RBSAG y una indicación de la proporción entre monómero, dímero y polímero.

2.10 Producción en producto de tubo

30 (1) Filtración: Usar membrana de 0.22 µ para filtrar las bacterias. El producto debe ser manipulado, con técnicas asépticas. Las muestras deben ser tomadas para ensayar el valor del interferón.

(2) Dilución: Diluir el producto intermedio de albúmina con un 2% de diluyente. No se debe añadir conservante. El producto se puede liofilizar después de la inspección aséptica y la inspección de pirógenos.

2.11 Liofilización

35 La liofilización no debería afectar a la actividad del interferón, y el contenido de agua de dicho liofilizado se mantendrá

2.12 Inspección

40 Hay dos tipos de rSIFN-co hechas. Uno es para inyección y el otro para uso tópico. Las especificaciones de los dos son diferentes. Hay productos intermedios y productos finales para cada tipo. En el tipo de inyección, los productos intermedios incluyen interferón purificado, producto intermedio de albúmina y producto intermedio de albúmina libre de bacterias. El producto final a partir del tipo de inyección denotará solo producto liofilizado. El producto intermedio en el tipo tópico denota sólo interferón purificado. El producto final a partir del tipo tópico denota solo productos liofilizados formados de líquido envasados por separado.

2.13 Envasado

45 Hay diferentes envases para el tipo de inyección y el tipo tópico.

2.14 Almacenamiento

El producto debe mantenerse a 4°C. La solución de purificación no debe almacenarse en estado congelado.

2.15 Expiración

El periodo de expiración es de dos (2) años después del procedimiento de liofilización para productos liofilizados. El periodo de expiración es de 6 meses desde el envasado individual para los productos líquidos.

EJEMPLO 4

5 rSIFN-co inhibe la duplicación de ADN-HBV y la secreción de HBsAg y HBeAg.

Materiales

0143 Disolvente y Método de dispensación: Añadir 1ml de solución salina en cada vial, disolver y mezclar con medio de cultivo MEM a diferentes concentraciones. Mezclar en el acto.

10 0144 Medicamentos de control: IFN- α 2b (Intron A) como polvo liofilizado, adquirido de Schering Plough. Cada 3×10^6 U, mezclar a 3×10^6 IU/ml con medio de cultivo; Infergen® (solución líquida), adquirido de Amgen, 9 μ g, cada 0.3 ml, igual a 9×10^6 IU, y mezclar con medio de cultivo 9×10^6 IU/ml conservar a 4°C; célula 2.2.15: línea celular 2.2.15 de hepatoma (Hep G2) clonado y transfectado por ADN-HBV, construido por Mount Sinai Medical Center.

15 0145 Reactivo: Polvo MEM, Gibco American Ltd. suero sanguíneo fetal de ganado, HycloneLab American Ltd. G-418 (Geneticina); dispensar MEM, Gibco American Ltd.; L-Glutamil, importado y envasado por JING KE Chemical Ltd.; caja de radioinmunoensayo en fase sólida de HBsAg y HBeAg, Northward Reagent Institute of Chinese Isotope Ltd.; Biograncetina, Northern China Medicine; Y Lipofectina, Gibco American Ltd.

0146 Productos y equipos experimentales: frasco de cultivo, Denmark Tunclon™; placa de cultivo de 24 pocillos y 96 pocillos, Corning American Ltd.; caja de incubación de Dióxido de Carbono, Shel-Lab American Ltd.; medio de cultivo MEM 100ml: 10% suero sanguíneo fetal de ganado, 3% Glutamil 1%, 380 μ g/ml G418, biograncetina 50U/ml.

20 **Método**

0147 Cultivo celular 2.2.15: Añadir 0.25% de enzima pancreática en la caja de cultivo con llenado de célula 2.2.15, digerir a 37°C durante 3 minutos, y añadir medio de cultivo para parar digestión y alterarlo para dispersar las células, reproducir con proporción 1:3. Alcanzarán crecimiento total en 10 días.

25 0148 Prueba de toxicidad: Establecer grupos de diferentes concentraciones y un grupo de control en el que no se ha actuado sobre las células con medicamento. Digerir las células, y dispensar a una solución de 100.000 cel/ml. Inocular al tablero de cultivo de 96 pocillos, 200 μ l cada pocillo, cultivar a 37°C durante 24 horas con 5% de CO₂. Ensayar cuando crezca la capa simple de células.

30 0149 Dispensar rSIFN-co a 1,83107IU/ml de solución, luego preparar una serie de soluciones diluidas en gradientes dobles. Añadir en placa de cultivo de 96 pocillos, 3 pocillos por concentración. Cambiar la solución cada 4 días. Ensayar efecto citopático por microscopio después de 8 días. Destruir completamente como 4, 75% como 3, 50% como 2, 25% como 1, cero como 0. Calcular tasa promedio de lesión celular y de inhibición de diferentes concentraciones. Calcular TC50 y TC0 según el método de Reed Muench.

$$TC50 = \text{Antilog} \left(B + \frac{50 - B}{A - B} \times C \right)$$

35 A = log > 50% concentración de medicamento, B = log <50% concentración de medicamento, C = log potencia de dilución

40 0150 Ensayo de inhibición de HBeAg y HBsAg: Separar en grupos de contraste positivos y negativos de HBeAg y HBsAg, grupo de contraste de células y grupos de concentración de medicamento. Inocular 700.000 células/ml de células 2.2.15 en placa de cultivo de 6 pocillos, 3 ml cada pocillo, cultivar a 37°C durante 24 horas con 5% de CO₂, luego preparar 5 soluciones diluidas en gradiente con 3 veces el grado (Preparar 5 soluciones, cada una con una concentración de proteína diferente. La concentración de la Solución 2 es 3 veces menor que la de la Solución 1, la concentración de la Solución 3 es 3 veces menor que la de la Solución 2, etc.) 4.5×10^6 IU/ml, 1.5×10^6 IU/ml, 0.5×10^6 IU/ml, 0.17×10^6 IU/ml, y 0.056×10^6 IU/ml, 1 pocillo por concentración, cultivar a 37°C durante 24 horas con 5% de CO₂. Cambiar las soluciones cada 4 días usando la misma solución. Recoger todo el medio de cultivo en el octavo día. Conservar a -20°C. Repetir el ensayo 3 veces para estimar HBsAg y HBeAg con caja de radioinmunoensayo en fase sólida (Northward Reagent Institute of Chinese isotope Ltd.). Estimar el valor cpm de cada pocillo con una máquina de recuento γ -.

0151 Cálculo de Efectos: Calcular el valor medio de cpm de los grupos de contraste y los grupos de diferente concentración y su desviación estándar, valor de P/N como tasa de inhibición, IC50 y SI.

1)

$$\text{Tasa de inhibición de antígeno (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A = cpm de grupo control; B = cpm de grupo de ensayo;

2) Contar la concentración de eficiencia mitad del medicamento

5

$$\text{IC50 de inhibición de antígeno} = \text{Antilog} \left(B + \frac{50-B}{A-B} \times C \right)$$

A=log>50% concentración de medicamento, B=log <50%concentración de medicamento, C=log poder de dilución

3) SI de efecto rSIFN-co de interespacio-conformación cambiada en HBsAg y HBeAg en cultivo celular 2.2.15:

$$\text{SI} = \frac{\text{TC50}}{\text{IC50}}$$

10

4) Estimar las diferencias en cpm de cada grado de dilución respecto al grupo de control mediante el ensayo t de Student

15

0152 Southern blot: (1) extracto de ADN-VHB en célula 2.2.15: Cultivar células 8 días. Medio de cultivo exsuction (Separar células del medio de cultivo mediante drenaje del medio de cultivo.). Añadir tampón de lisis para romper las células, a continuación, extraer 2 veces con una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (1:1:1), centrifugar a 10000 g. Recoger el sobrenadante añadiendo alcohol anhidro para depositar ácido nucleico. Drenar al vacío, redissolver en tampón 20µlTE. (2) Electroforesis: Añadir tampón de carga de 6XADN, electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, IV/cm, a presión fija durante 14-18h. (3) Desnaturalización e hibridación: respectivamente sumergir gel en HCl, tampón de desnaturalización y tampón de neutralización. (4) Transmembrana: Hacer una transferencia ordenada de ADN a membrana Hybond-N. Secar al horno, hibridar y exponer con hibridación dot blot. Escanear y analizar la densidad relativa con software gel-pro. Calcular la tasa de inhibición y IC50.

20

Resultados

25

0153 Los resultados de las Tablas 4.1, 4.2 y 4.3 muestran: Después de cultivar a exponente de concentración máximo inocuo durante 8 días con célula 2.2.15, la máxima es $9.0 \pm 0 \times 10^6$ IU/ml tasa de inhibición promedio de la concentración máxima inocua de rSIFN-co para HBeAg es $46.0 \pm 5.25\%$ ($P < 0.001$), IC50 es $4.54 \pm 1.32 \times 10^6$ IU/ml, SI es 3.96; la tasa para HBsAg es $44.8 \pm 6.6\%$, IC50 es $6.49 \pm 0.42 \times 10^9$ IU/ml, SI es 2.77. Esto muestra que rSIFN-co puede inhibir significativamente la actividad de HBeAg y HBsAg, pero que el IFN del grupo de contraste y Infergen® no pueden. También se ha demostrado clínicamente que rSIFN-co puede disminuir HBeAg y HBsAg o devolverlos a los niveles normales.

Tabla 4.1 Resultados de tasa de inhibición de rSIFN-co para HBsAg y HBeAg

Primer lote: (rSIFN-co)											
Efecto de inhibición para HBeAg											
Concentración (X10 ⁴ U/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada		
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo					
900	9026	8976	10476	0.436227	0.43935	0.345659	0.945909	0.592921	0.614693546		
300	9616	12082	10098	0.3993754	0.245347	0.369269	0.5388299	1.254924	0.300392321		
100	9822	16002	12800	0.386508	0.0005	0.2005	0.200833	2.059088	0.08867188		
33.33333	15770	19306	16824	0.014991	0	0	0.0049969	3.054091	0.001633453		
11.11111	19172	22270	18934	0	0	0	0	4.054091	0		
Control	Célula	16010		Vacío	0		Dilución	3	602.74446016		
Efecto de inhibición para HBsAg											
Concentración (X10 ⁴ U/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada		
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo					
900	7706	7240	7114	0.342155	0.381936	0.392693	0.922258	0.627739	0.595006426		
300	8856	7778	9476	0.2439816	0.336008	0.191053	0.5499972	1.370724	0.286349225		
100	10818	10720	10330	0.07649	0.084856	0.118149	0.292983	2.27756	0.113977019		
33.33333	10744	11114	10570	0.082807	0.051221	0.097661	0.1998179	3.20033	0.058767408		
11.11111	10672	9352	10810	0.088953	0.201639	0.077173	0.122588	4.077742	0.02918541		
Control	Célula	11714		Vacío	0		Dilución	3	641.7736749		
Segundo lote: (rSIFN-co)											
Efecto de inhibición para HBeAg											
Concentración (X10 ⁴ U/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada		
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo					
900	7818	8516	9350	0.554378	0.514592	0.467054	1.371181	0.487992	0.737521972		
300	10344	10628	9160	0.4103967	0.394209	0.477884	0.8591731	1.060496	0.447563245		
100	12296	14228	13262	0.299134	0.18901	0.244072	0.4316522	1.816423	0.19201839		
33.33333	15364	17414	16188	0.124259	0.00741	0.77291	0.1876045	2.74677	0.063933386		
11.11111	17386	13632	15406	0.009006	0.222982	0.121865	0.117951	3.628819	0.03148073		
Control	Célula	16962		Vacío	0		Dilución	3	365.9357846		

Efecto de inhibición para HBsAg										
Concentración (X10 ⁴ IU/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Tasa de inhibición promedio	Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo				
900	5784	6198	5792	0.498265	0.462353	0.497571	0.486063	0.893477	0.513937	0.634835847
300	7150	8534	8318	0.379771	0.259715	0.278452	0.30598	0.4074138	1.207957	0.252210647
100	9830	11212	10210	0.147294	0.027412	0.11433	0.096345	0.101434	2.111612	0.04583464
33.33333	13942	12368	13478	0	0	0	0	0.0050891	3.111612	0.001632835
11.11111	12418	11634	11352	0	0	0.015267	0.005089	0.005089	4.106523	0.001237728
Control	Célula			Vacio	0		Dilución	3	IC50	611.0919568
Tercer lote: (rSIFN-co)										
Efecto de inhibición para HBeAg										
Concentración (X10 ⁴ IU/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Tasa de inhibición promedio	Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo				
900	9702	9614	8110	0.428016	0.433204	0.521872	0.461031	1.316983	0.538969	0.709599543
300	8914	10032	8870	0.4744723	0.40856	0.477066	0.453366	0.8559525	1.085603	0.440859127
100	16312	12688	13934	0.038321	0.251975	0.178517	0.156271	0.402586	1.929332	0.172641621
33.33333	15080	12814	13288	0.110954	0.244547	0.216602	0.190701	0.2463153	2.738631	0.082519158
11.11111	21928	15366	15728	0	0.094093	0.072751	0.0055615	0.055615	3.683017	0.014875633
Control	Célula	17544		Vacio	0		Dilución	3	IC50	382.0496935
Efecto de inhibición para HBsAg										
Concentración (X10 ⁴ IU/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Tasa de inhibición promedio	Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo				
900	5616	6228	5346	0.496864	0.442035	0.521054	0.486651	0.763125	0.513349	0.597838293
300	8542	8590	7096	0.234725	0.230425	0.364272	0.276474	0.2764738	1.236875	0.182690031
100	11420	11360	11394	0	0	0	0	0	2.236875	0
33.33333	12656	11582	13110	0	0	0	0	0	4.236875	0
11.11111	13142	12336	13342	0	0	0	0	0	IC50	694.7027149
Control	Célula	11528		Vacio	0		Dilución	3	IC50	694.7027149
HBeAg: Promedio IC50: 450.2434 DE: 132.315479										
HBsAg: Promedio IC50: 649.1894 DE: 42.29580										

Tabla 4.2: Resultados de tasa de inhibición de Intron A (IFN- α 2b) para HBsAg y HBeAg
Efecto de inhibición para HBeAg

Concentración (X10 ⁴ IU/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo			
300	14918	11724	9950	0	0.029711	0.176529	0.068747	0.931253	0.068746724
100	14868	16890	15182	0	0	0	0	1.931253	0
33.33333	16760	21716	16400	0	0	0	0	2.931253	0
11.11111	20854	15042	16168	0	0	0	0	3.931253	0
3.703704	12083	12083	12083	0	0	0	0	4.931253	0
Control	Célula	17544		Vacío	0		Dilución	3	FALSO

Efecto de inhibición para HBsAg									
Concentración (X10 ⁴ IU/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo			
300	9226	8196	9658	0.152489	0.247106	0.521054	0.189295	0.8292	0.185857736
100	10946	10340	10828	0	0.050156	0.364272	0.0184947	1.810705	0.010110817
33.33333	12250	12980	13934	0	0	0	0	2.810705	0
11.11111	12634	12342	12000	0	0	0	0	3.810705	0
3.703704	10886	10886	10866	0	0	0	0	4.810705	0
Control	Célula	10886		Vacío	0		Dilución	3	FALSO

Tabla 4.3: Resultados de tasa de inhibición de Infergen® para HBsAg y HBeAg

Primer lote: (Infergen®)											
Efecto de inhibición para HBeAg											
Concentración (X10 ⁴ IU/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada	Tasa de inhibición acumulada	Control
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo					
900	14172	12156	17306	0.091655	0.220869	0	0.104175	0.895825	0.254710274		
300	13390	12288	16252	0.1417767	0.212409	0	0.118062	1.777764	0.102024519		
100	14364	18834	14194	0.079349	0	0.090245	0.056531	2.721232	0.029916678		
33.33333	15722	16034	16340	0	0	0	0	3.721232	0.007306592		
11.11111	17504	17652	14320	0	0	0.082169	0.02739	4.693843	0.005801377		
Control	Célula	10886		Vacío	0		Dilución	3		FALSO	
Efecto de inhibición para HBsAg											
Concentración (X10 ⁴ IU/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada	Tasa de inhibición acumulada	Control
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo					
900	12080	11692	12234	0	0.01275	0	0.00425	0.99575	0.024647111		
300	12840	11484	12350	0	0.030313	0	0.010104	1.985646	0.010422073		
100	12894	14696	15086	0	0	0	0	2.985646	0.003606955		
33.33333	15032	12928	13020	0	0	0	0	3.985646	0.002704416		
11.11111	11794	11984	11508	0.004137	0	0.028287	0.010808	4.974837	0.002167838		
Control	Célula	11843		Vacío	0		Dilución	3		FALSO	
Segundo lote: (Infergen®)											
Efecto de inhibición para HBeAg											
Concentración (X10 ⁴ IU/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada	Tasa de inhibición acumulada	Control
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo					
900	6278	6376	6408	0.200051	0.187564	0.183486	0.190367	0.809633	0.253290505		
300	7692	9092	6394	0.0198777	0	0.18527	0.068383	1.74125	0.046161005		
100	8960	7474	8190	0	0.047655	0	0.015885	2.725365	0.005794856		
33.33333	8530	8144	9682	0	0	0	0	3.725365	0		
11.11111	7848	7848	7848	0	0	0	0	4.725365	0		
Control	Célula	7848		Vacío	0		Dilución	3		FALSO	

Efecto de inhibición para HBsAg											
Concentración (X10 ⁴ IU/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Tasa de inhibición promedio	Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada	
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo					
900	12364	12268	12274	0.036171	0.043655	0.043187	0.041004	0.140162	0.958996	0.12751773	
300	11590	12708	13716	0.0965076	0.009355	0	0.035287	0.0991581	1.923709	0.0490186	
100	12448	13468	13982	0.029623	0	0	0.009874	0.063871	2.913834	0.02144964	
33.33333	12616	11346	12444	0.016526	0.115529	0.029935	0.053996	0.0539965	3.859838	0.013796309	
11.11111	12828	12828	12828	0	0	0	0	0	4.859838	0	
Control	Célula	12828		Vacio	0		Dilución	3	IC50	FALSO	
Tercer lote: (Infegen®)											
Efecto de inhibición para HBeAg											
Concentración (X10 ⁴ IU/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Tasa de inhibición promedio	Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada	
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo					
900	7240	6642	6158	0.064599	0.14186	0.204393	0.136951	0.217399	0.863049	0.201211735	
300	11072	8786	6902	0	0	0.108269	0.03609	0.0804479	1.82696	0.042176564	
100	7016	9726	7552	0.09354	0	0.024289	0.039276	0.044358	2.787683	0.015663017	
33.33333	7622	8866	8676	0.015245	0	0	0.005082	0.0050018	3.782601	0.001341671	
11.11111	7740	7740	7740	0	0	0	0	0	4.782601	0	
Control	Célula	7740		Vacio	0		Dilución	3	IC50	FALSO	
Efecto de inhibición para HBsAg											
Concentración (X10 ⁴ IU/ml)	Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo	Tasa de inhibición			Tasa de inhibición promedio	Acumulación	Acumulación-1	Tasa de inhibición acumulada	
				Primer pocillo	Segundo pocillo	Tercer pocillo					
900	11048	11856	11902	0.04775	0	0	0.015917	0.015917	0.984083	0.015916796	
300	13454	12896	11798	0	0	0	0	0	1.984083	0	
100	12846	13160	12546	0	0	0	0	0	2.984083	0	
33.33333	12680	12458	12360	0	0	0	0	0	3.984083	0	
11.11111	11602	11602	11602	0	0	0	0	0	4.984083	0	
Control	Célula	11602		Vacio	0		Dilución	3	IC50	FALSO	
HBeAg: Promedio IC50: 0 DE: 0											
HBsAg: Promedio IC50: 0 DE: 0											

EJEMPLO 5**Preparación de rSIFN-co**

Preparación de inyección liofilizada

5 Polvo liofilizado

0154

Solución madre de rSIFN-co	34.5 µg/ml
PB (pH7.0)	10mmol/L
Glicina	0.4mol/L

10 0155 Técnica de preparación: Pesar los materiales según la receta. Disolver con agua estéril y libre de pirógenos. Filtrar a través de membrana de 0.22 µm para de-bacterializar, conservar a 6-10°C. Rellenar en viales después de confirmar que son estériles y sin pirógenos, 0.3 ml/vial o 0.5 ml/vial y liofilizar en liofilizador.

Preparación de la inyección líquida

Solución

15 0156

Solución madre de rSIFN-co	34.5 µg/ml
PB (pH7.0)	25mmol/L
NaCl	0.1mol/L

20 0157 Preparación: Pesar los materiales según la receta. Añadir hasta el nivel deseado con agua estéril y libre de pirógenos. Filtrar a través de membrana de 0.22 µm para de-bacterializar, conservar a 6-10°C. Rellenar en frasco hermético tras confirmar que es estéril y sin pirógeno a 0.3 ml/vial o 0.5 ml/vial. Almacenar a 2-10°C, y proteger de la luz.

EJEMPLO 6**Toxicidad aguda de rSIFN-co**

25 0158 Tratar ratones con dosis grande (150µg/kg, igual a 1000 veces la dosis normal por kilo usada en tratamiento de pacientes adultos) de rSIFN-co en una vez mediante inyección intramuscular. Luego observar y registrar sus muertes y reacciones tóxicas. Los resultados muestran que: 24 horas después de la inyección, no se había registrado reacción anormal alguna. Los órganos de los animales que habían sido seleccionados para ser sacrificados tampoco tenían signos de cambios anormales. Esos ratones restantes fueron mantenidos vivos y estaban normales después de dos semanas. Los pesos de los ratones en el grupo experimental y en el grupo de control aumentaron todos, y la proporción de aumento no mostró ninguna diferencia obvia entre los dos grupos (P> 0.05) de acuerdo a sus pesos en el día catorce. No se observaron cambios anormales de los principales órganos de los ratones después de dos semanas.

1. Material experimental

35 1.1 Animales

0159 40 ratones adultos sanos, con un peso de 18-22g, mitad machos y mitad hembras, calificados por el centro de control animal experimental de Sichuan.

1.2 Medicamentos

40 0160 Solución esterilizada rSIFN-co (Proporcionada por Sichuan Huiyang Life-engineering Ltd.) 0.15 mg/ml, Lote: 981201 rSIFN-co se administró i.m. en solución salina.

2. Método

45 0161 Separar los 40 ratones en dos grupos al azar, uno para medicina experimental, otro para control. Inyectar medicamentos o solución salina en la misma proporción (0.1 ml/10 g) por vía muscular a cada ratón según el grupo al que pertenece. (150 µg/kg de rSIFN-co para el grupo experimental, y solución salina para el grupo de control). Después de la inyección, observar y registrar la toxicidad aguda mostrada en los ratones. Matar la mitad de los

ratones (mitad machos y mitad hembras) para comprobar si había cambios patológicos anormales en sus principales órganos, como corazón, bazo, hígado, pulmón, riñón, glándula suprarrenal, estómago, duodeno, etc, después de 24 horas. Los que quedan son conservados y observados hasta el día catorce. Pesaron todos los ratones, mataronlos, y luego observaron la apariencia de los órganos antes mencionados para ver si hay alguna anomalía. Tomaron tejido patológico y lo examinaron, utilizando el examen para evaluar la diferencia en aumentos de peso en los dos grupos.

3. Resultados

0162 Los resultados muestran que no hubo toxicidad aguda vista después de que todos los ratones fueron tratados con i.m. rSIFN-co con 150 µg/kg de una vez, igual a 1000 veces la dosis normal por kilo usada en tratamiento de pacientes adultos. En los 14 días después de la inyección, todos los ratones vivían bien. Comieron, bebieron, se ejercitaron, y excretaron con normalidad y mostraron condiciones de pelo normales. Ninguno de ellos murió. La observación de los principales órganos de los ratones seleccionados al azar no muestra cambios anormales 24 horas después de la inyección. 14 días después de la inyección, los ratones restantes fueron sacrificados. Las autopsias tampoco mostraron cambios. Los pesos de los ratones en ambos grupos aumentaron todos, pero no se mostró diferencia obvia cuando se trató con método estadístico ($p > 0.05$). Ver Tabla 6.1:

Tabla 6.1 Influencia en el peso de los ratones después de la inyección de rSIFN-co

Grupo	Dosis	Animal	Pesos antes de inyección	Pesos después de inyección	Valor incrementado de pesos (g)
Control	0	20	19.8 ± 1.7	30.8 ± 2.8	11.0 ± 2.9
rSIFN-co	150	20	19.4 ± 1.7	32.1 ± 3.3	12.7 ± 4.3

4. Conclusión

0163 Bajo las condiciones de este experimento, no hubo reacciones tóxicas en ninguno de los ratones después de la inyección de rSIFN-co con 150 µg/kg. Se puede llegar a la conclusión de que la dosis máxima tolerable de i.m. en ratones es de 150 µg /kg, que es igual a 1000 veces la dosis normal por kilo usada en el tratamiento de pacientes adultos.

EJEMPLO 7

Los efectos clínicos del súper-compuesto interferón recombinante (rSIFN-co)

0164 El interferón súper-compuesto recombinante (rSIFN-co) es una invención para terapia de enfermedad viral, especialmente para hepatitis. Mientras tanto, puede inhibir la actividad de los virus de EB, VSV, virus de herpes simplex, coronavirus, virus del sarampión, y otros. Usando el sistema de células WISH/VEV como ensayo para actividad anti-virus, los resultados mostraron que: el otro rIFN, era 0.9×10^8 UI/mg, Intrón A era 2.0×10^8 UI/mg y rSIFN-co era 9×10^8 UI/mg. La actividad anti-viral de rSIFN-co es mucho mayor que las de los dos primeros.

0165 Bajo el permiso de la Administración de Alimentos y Medicamentos (SFDA), República Popular de China, los ensayos clínicos han tenido lugar en el Hospital de China Occidental, la Universidad de Sichuan, el Segundo Hospital de la Universidad Médica de Chongqing, el Primer Hospital de la Facultad de Medicina, Universidad de Zhejiang desde Febrero de 2003. El tratamiento clínico que se centra en la hepatitis B se lleva a cabo bajo la guía del ensayo aleatorio doble ciego multicéntrico. IFN-α1b se utilizó como control, y los resultados primarios mostraron lo siguiente:

El efecto de rSIFN-co comparado con IFN-α1b en el tratamiento de hepatitis B crónica activa

0166

1. Estándar de selección de pacientes: Estándares 1-4 son efectivos para ambos tratamientos con rSIFN-co (9µg) y IFN-α1b (5MU, 50µg), y estándar 1-5 son para tratamiento rSIFN-co (15µg).

- 1) Edad: 18-65
- 2) Ensayo HBsAg positivo durante los últimos seis meses, ensayo HBeAg positivo, ensayo PCR, copias de ADN de VHB $\geq 10^5$ /ml
- 3) ALT \geq dos veces el valor normal
- 4) Nunca recibido tratamiento IFN; o recibido tratamiento Lamivudine pero fracasado o recidivante

- 5) Una vez recibido otro tratamiento de IFNs (3MU o 5MU) hace seis meses siguiendo el estándar de SFDA, pero fracasado o recidivante

2. Evaluación de los efectos:

- 5 En referencia a las recomendaciones del Décimo Comité Nacional de China de Virus de Hepatitis y Hepatopatías, los efectos fueron divididos en tres grados de acuerdo con los ensayos ADN-VHB y HBeAg, nivel ALT.

Respuesta: nivel ALT normal, ADN-HBV negativa, HBeAg negativa

Respuesta parcial: nivel ALT normal, ADN-HBV o HBeAg negativa

Sin respuesta: ALT, ADN-HBV y HBeAg no alterado

Los grupos de respuesta y respuesta parcial se consideraron casos eficaces.

10 3. Resultados de ensayo clínico:

Grupo A: tratamiento con rSIFN-co (9µg)

Grupo B: tratamiento con IFN-α1b (5MU, 50µg)

Periodo	Grupo	Medicamento	Casos	Tasa efectiva	Transferencia de HBsAg a tasa negativa	Transferencia de HBeAg a tasa negativa	Transferencia de ADN-HBV a tasa negativa	Tasa de recuperación de la función Heptal
Semana 8-12	A	rSIFN-co (9µg)	32	46.88 (15)	9.38 (3)	28.12 (9)	37.50 (12)	84.38 (27)
	B	IFN-α1b (5MU, 50µg)	32	21.88 (7)	0.00 (0)	9.38 (3)	15.62 (5)	56.25 (18)
Semana 16-24	A	rSIFN-co (µg)	64	54.69 (35)	7.81 (5)	25.00 (16)	34.38 (22)	90.62 (58)
	B	IFN-α1b (5MU, 50µg)	64	25.00 (16)	0.00 (0)	9.38 (6)	18.75 (12)	78.13 (50)

- 15 En el Grupo C, los casos fueron tratamiento previo de hepatitis B crónica activa con otros IFNs (3MU o 5MU) que fracasaron o recidivaron y fueron tratados luego con rSIFN-co (15 µg), inyección subcutánea, cada día, durante 24 semanas. Los casos totales fueron 13. Después de 12 semanas de tratamiento, 7 de 13 (53.85%) fueron eficaces. 3 de 13 (23.08%) HBeAg transferido a negativo, 7 de 13 (53.85%) DNA-HBV transferido a negativo, 11 de 13 (84.62%) las funciones heptales recuperaron la normalidad.

20 4. Los efectos secundarios de rSIFN-co comparado con IFN-α1b en el tratamiento

- 25 Los efectos secundarios de IFN incluyen fiebre, náuseas, mialgia, anorexia, pérdida de pelo, leucopenia y trombocitopenia, etc. La dosis máxima de IFN-α1b es 5MIU por vez; la dosis de rutina es 3 MIU. Cuando se tomó la dosis habitual, 90% de los pacientes tienen efectos secundarios grado I-II (estándar OMS). Tuvieron fiebre inferior a 38°C, náuseas, mialgia, anorexia, etc. Cuando se tomó en dosis máxima, la tasa de efectos secundarios no se elevó obviamente, pero fueron más graves. La dosis máxima de rSIFNco es 24 µg, inyección subcutánea, cada día durante 3 meses. La dosis rutinaria es 9 µg. Cuando se utilizaron dosis de rutina, menos de 50% de pacientes tenían efectos secundarios grado I-II (estándar OMS), como fiebre inferior a 38°C, náuseas, mialgias, anorexia, leucopenia y trombocitopenia leve. Con dosis máxima, alrededor de 50% de pacientes sufrieron leucopenia y trombocitopenia después de usar rSIFN-co un mes, pero esos efectos secundarios desaparecieron después de suspender el tratamiento durante una semana. Es seguro para uso continuado.
- 30

Las observaciones de rSIFN-co tratando hepatitis C

1. Estándar de selección de pacientes

0167

- 1) Edad: 18-65
- 5 2) Anticuerpo HCV positivo
- 3) ALT \geq 1.5 veces del valor normal, dura más de 6 meses

2. Evaluación de los efectos:

0168

10 Haciendo referencia al estándar de Infigen® para el tratamiento de hepatitis C y de acuerdo con el nivel de ALT y ensayo ARN-VHC, dividió a los efectos en tres grados:

Respuesta: nivel ALT normal, ARN-HCV negativo

Respuesta parcial: nivel ALT normal, ARN-HCV no alterado

Sin respuesta: ALT y ARN-HCV no alterado

3. Efectos en clínica

15 0169 El ensayo clínico se llevó a cabo al mismo tiempo con tratamiento de hepatitis B. 46 casos recibieron el tratamiento, 9 µg cada vez, inyección subcutánea, cada día durante 24 semanas. Después del tratamiento, 26 de 46 (56.52%) tienen efectos obvios, 12 de 46 (26.08%) ARN-HCV transferido a negativo, 26 de 46 (56.52%) funciones hepáticas recuperaron la normalidad.

EJEMPLO 8

20 **Aerosol del Súper Compuesto Interferón Recombinante**

0170

Componente principal: Interferón Súper Compuesto Recombinante

Característica: Líquido, material no insoluble

25 **Farmacología:** El Interferón Súper-Compuesto Recombinante tiene un amplio espectro de actividad anti-virus. Sus efectos son 5-20 veces mayores que los interferones (IFN) que están disponibles en el mercado. Puede inhibir el crecimiento de coronavirus en cultivo celular. El mecanismo es la interrupción de la reacción de combinación entre el IFN y el receptor correspondiente, y la inducción de la expresión de enzima de síntesis 2'5'-A, proteína quinasa R en la célula diana, por lo tanto, inhibiendo la expresión de la proteína viral. IFN puede inducir la expresión de diversas proteínas anti-virus para inhibir la reproducción de proteínas virales, mejorar la función de las células asesinas naturales (NK) y otras funciones reguladoras inmunes, e inhibir la invasión de virus. **Toxicidad aguda:** Todos los ratones están vivos tras la inyección subcutánea de dosis máxima (1000 veces la dosis humana), no se observó DL50.

Indicación: Prevención del Síndrome Respiratorio Agudo Severo **Dosificación y Administración:** Rocíar la cavidad nasal y la garganta, tres veces al día.

35 **Reacciones adversas:** No hubo ningún informe de reacciones adversas por el aerosol rIFN. No indujo alergia. Si la estimulación es ocasional, la reacción adversa gastrointestinal es pequeña, y no se observó ninguna otra reacción adversa obvia durante el tratamiento, es seguro para continuar el uso. Todas las reacciones se resolverán solas.

Advertencia: Los pacientes alérgicos a α IFN y producciones de *E. coli*. no pueden utilizar este producto.

40 **Precauciones:** Antes del primer uso, rocíar dos veces para expulsar el aire. Si hay algún material de precipitación turbio, si ha caducado el producto, o si hay material sobre el vial, no lo use.

Uso pediátrico: No está claro.

Uso geriátrico: No está claro.

Madres lactantes y mujeres embarazadas: Prohibido

Interacciones del medicamento: No está claro.

Sobredosis: Exceso 150.µg ($7,5 \times 10^7$ UI) cada vez, fiebre, anorexia, mialgias, escalofríos ocurrirán con más frecuencia. No hay ninguna reacción adversa grave.

Presentación: 1 aerosol/paquete, 20 µg (1×10^7 IU)/3 ml

Almacenamiento: Almacenar a 4-8°C. No congelar, proteger de la luz.

5 **Vigencia:** Aproximadamente un año.

Fabricación: Fabricado por Sichuan Huiyang Life Engineering Ltd.

Dirección: 8 Yusa Road, Room 902, Edificio A

Chengdu, 610017

Sichuan, P.R. China

10 **EJEMPLO 9-A**

Efecto in vitro de un compuesto interferón recombinante de estilo nuevo sobre coronavirus asociado al SARS

0171

Muestra suministrada por: Sichuan Huiyang Life Engineering Ltd. Company, Provincia de Sichuan

15 **Experimentador:** Departamento de Biología Molecular, Instituto de microorganismo y epidemiología, Academia de Ciencias Médicas Militares

Datos originales: Conservado en el archivo del Departamento de Biología Molecular, Instituto de microorganismo y epidemiología, Academia de Ciencias Médicas Militares

1. Materiales

20 0172

Medicamento: Nuevo tipo de interferón compuesto recombinante, 9 µg cada uno, suministrado por Huiyang Life Engineering Lt Company, Provincia de Sichuan, Número de lote: 20020501.

Células: Vero E₆, suministradas por el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Microorganismos y Epidemiología, Academia de Ciencias Médicas Militares.

25 **Virus:** Coronavirus asociado al SARS, BJ-01, suministrado por Departamento de Biología Molecular del Instituto de Microorganismos y Epidemiología, Academia de Ciencias Médicas Militares.

Medio celular: DMEM suplementado con 10% de FBS.

2. Condición

El virus se midió en laboratorio 3° grado de bioseguridad

30 **3. Método**

0173 **Ensayo de CPE (efecto citopático) de DICT₅₀:** 100 µl de células Vero E₆ se sembraron en placas de 96 pocillos a 2×10^4 células por pocillo. Después de 24 horas de incubación a 37°C, las células Vero E₆ monocapa se trataron con 9 niveles de dilución de coronavirus asociado al SARS por dilución de 10 veces, 4 pocillos por dilución. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. El CPE (efecto citopático) se examinó por microscopía diariamente. CPE menos de 25% se determinó como +, 26-50% como ++, 51-75% como +++, 76-100% como +++++. Se registró el CPE. Entonces se calculó TCID₅₀ por el método de Reed-Muench.

35

0174 **Citotoxicidad del medicamento:** Las células Vero E₆ se inocularon en placas de 96 pocillos a 2×10^4 células (100 ul) por pocillo. Después de la incubación de 24 horas a 37°C, las células crecieron hasta monocapa. El medicamento se diluyó en 36, 18, 9, 4,5, 2.25µg/ml (concentración final) y se añadió a los pocillos cada uno para 4 pocillos. Se fijaron las células normales como grupo de control. El CPE del grupo del medicamento se observó diariamente durante un período de 5 días, y luego se determinó la concentración del medicamento que no presenta toxicidad.

40

0175 **Ensayo de CPE de la actividad del medicamento contra el coronavirus asociado al SARS:** 100 µl de células Vero E₆ se sembraron en placas de 96 pocillos a 2×10^4 células por pocillo. Después de incubar 24 horas a 37°C, las células crecieron hasta monocapa. El medicamento a la concentración máxima que no presenta

45

5 citotoxicidad se diluyó en 5 niveles por dilución de 2 veces y se añadió a los pocillos (100 µl por pocillo). Por incubación con 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas, se añadieron diferentes concentraciones de virus (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵). Después del tratamiento con virus durante 48-72 horas, se examinó el CPE (CPE menos de 25% se determinó como +, 26-50% como ++, 51-75% como +++, 76-100% como +++++, célula normal como -). Las células se dividieron en el grupo normal, el grupo de control del medicamento, y la dilución diferente del grupo de control de virus, 4 pocillos por grupo. CPE se examinó diariamente. Hasta que el efecto citopático fue obviamente expuesto en el grupo de control de virus, se evaluó la actividad anti-virus del interferón. Se repitió el experimento. IC₅₀ del medicamento se calculó por el método de Reed-Muench.

4. Resultados

10 0176 **Toxicidad del virus:** TCID₅₀ del virus fue 10⁻⁸.

0177 **Citotoxicidad del medicamento:** la concentración de interferón compuesto recombinante que no presenta citotoxicidad fue 18µg/ml, la forma de las células fue similar con el grupo de control, y no se mostró efecto citopático alguno.

0178 **El efecto anti-virus del medicamento:** Se muestra en la Tabla 9-A.1 y Tabla 9-A.2

15

Tabla 9-A.1, el efecto antiviral del nuevo tipo de compuesto interferón recombinante (primer experimento)

Concentración de IFN (µg/ml)	CPE a diferente concentración del virus		
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
18	-	-	-
9	-	-	-
4.5	++	-	-
2.25	+++	++	-
1.125	++++	++++	++
Grupo de control de virus	++++	++++	+++
Grupo normal	-	-	-
Grupo de control de medicamento	-	-	-

Tabla 9-A.2, el efecto antiviral del nuevo tipo de compuesto interferón recombinante (segundo experimento)

Concentración de IFN (µg/ml)	CPE a diferente concentración del virus		
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
18	-	-	-
9	-	-	-
4.5	+	-	-
2.25	+++	++	-
1.125	++++	++++	++
Grupo de control de virus	++++	++++	+++
Grupo normal	-	-	-
Grupo de control de medicamento	-	-	-

5. Conclusión

0179 La concentración del nuevo tipo de compuesto interferón recombinante que no presenta citotoxicidad a 18 µg/ml. Sus IC₅₀ fueron 1.27, 2.25, y 4.04µg/ml respectivamente según la concentración de 10⁻⁵(1000TCID₅₀), 10⁻⁴ (1000TCID₅₀), 10⁻³ (100000TCID₅₀) de coronavirus asociado al SARS (Tabla 9-A.3).

5

Tabla 9-A.3, IC₅₀ de IFN a diferente concentración de virus

Dilución del virus	IC ₅₀ de IFN(µg/ml)
10 ⁻³	4.04
10 ⁻⁴	2.25
10 ⁻⁵	1.27

Director: Jin-yan Wang

Auxiliar de laboratorio: Yan-hong Zhao Xiao-Guang Ji, Xiao Yu Li.

10 **Datos originales:** Conservado en los archivos del Departamento de Biología Molecular, Instituto de microorganismo y epidemiología, Academia de Ciencias Médicas Militares

Fecha: Del 12 al 30 de mayo 2003

EJEMPLO 9-B

Efecto in vitro de un nuevo tipo de interferón compuesto recombinante y, inyección de interferón recombinante -α-2b en coronavirus asociado al SARS

15 0180

Muestra suministrada por: Huiyang Life Engineering Ltd., provincia de Sichuan

Experimentador: Departamento de Biología Molecular, Instituto microorganismo y epidemiología, Academia de Ciencias Médicas Militares

20 **Datos originales:** Conservados en sala de archivos del Departamento de Biología Molecular, Instituto microorganismo y epidemiología, Academia de Ciencias Médicas Militares

1. Materiales

0181

25 **Medicamento:** Nuevo tipo de interferón compuesto recombinante, 618 µg/ml, suministrado por Huiyang Life Engineering Ltd., provincia de Sichuan; Anfulong (inyección de interferón recombinante -α-2b), suministrado por Hua-li-da Biology Engineering Ltd. Company, ciudad de Tianjin, 30ug/vial (300, 0000IU/vial), Número de Lote: 20030105.

Células: Vero E₆, suministradas por el Departamento de Biología Molecular, Instituto microorganismo y epidemiología, Academia de Ciencias Médicas Militares

30 **Virus:** Coronavirus asociado al SARS, BJ-01, suministrado por Departamento de Biología Molecular, Instituto microorganismo y epidemiología, Academia de Ciencias Médicas Militares

Condición: El virus se midió en laboratorio de bioseguridad de 3º grado

2. Método

35 0182 **Se midió DICT₅₀ con ensayo CPE:** Se inocularon células Vero E₆ en placas de 96 pocillos a 2X10⁴ células (100 µl) por pocillo. Después de una incubación de 24-hr a 37°C, se trataron las monocapas Vero E₆ con 9 niveles de dilución de 10 veces de coronavirus asociado al SARS decreciendo, cada dilución por cada 4 pozos. Las células se incubaron a 37°C y dióxido de carbono al 5%. Se examinó CPE diariamente por microscopía de contraste de fase. CPE menor de 25% se determinó como +, 26-50% como ++, 51-75% como +++, 76-100% como +++++. Se registró CPE. Luego se calculó TCID₅₀ por el método de Reed-Muench.

40 0183 **Se midieron TC₅₀ de IFNs mediante ensayo MTT:** Se inocularon células Vero E₆ en placas de 96 pocillos a 2X10⁴ células por pocillo (100 µl). Después de incubar 24 horas a 37°C, se eliminó el líquido sobrenadante cuando

las células crecieron hasta monocapa, luego se trató Vero E₆ con diferente concentración de IFNs, cada dilución por cada 4 pocillos. Se estableció el grupo normal. Tras 5 días de observación, se mezclaron las células con MTT durante 4 horas. Después de eso, se elimina el líquido, y luego a partir de entonces se añadió DMSO a las células durante 0.5 horas. Se midió OD_{570nm} por lector de microplacas. Finalmente, se calculó TC₅₀ mediante el método de Reed-Muench.

0184 La actividad de los INFs contra el coronavirus asociado al SARS, fue medido con ensayo MTT: 100 ml de células Vero E₆ se inocularon en placas de 96 pocillos a 2X10⁴ células por pocillo. Después de incubar 24 horas a 37°C, las células se hicieron monocapas. La dilución del medicamento a la concentración que no presenta citotoxicidad fue 5 veces decreciendo y hubo 5 niveles de dilución. Luego se añadió cada dilución a 4 pocillos, 100 ul por pocillo. Después de incubar 24 horas a 37°C y 5% de CO₂, se eliminó la solución de IFN, luego se añadieron diferentes concentraciones de dilución de virus (10000, 1000, 100 DICT₅₀) en placas, 4 pocillos por dilución. Las células se dividieron en el grupo normal, el grupo de control de medicamento, y la dilución diferente del grupo de control de virus (10000, 1000, 100 DICT₅₀). Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 48-72h, hasta que se exhibió el efecto citopático en el grupo de control de virus, se registró CPE (CPE menor de 25% se determinó como +, 26-50% como ++, 51-75% como +++, 76-100% como +++++, célula normal como -). La capacidad de crecimiento de las células se midió con el ensayo MTT, y luego se evaluó el efecto de antiviral de los INFs. El experimento se repitió 3 veces. Se calculó IC₅₀ del medicamento por el método de Reed-Muench.

3. Resultados

0185

20 **TCID₅₀ del virus:** TCID₅₀ del virus fue 10⁻⁷.

TC₅₀ de IFNs: La concentración del nuevo tipo de interferón compuesto recombinante que no presenta citotoxicidad fue 100µg/ml, y la del IFN-α-2b recombinante fue 12.5µg/ml, la forma de las células fue idéntica que el grupo normal a esa concentración. TC₅₀ del nuevo tipo de interferón compuesto recombinante fue 139.18µg/ml, la del IFN-α-2b recombinante fue 17.18µg/ml.

25

Tabla 9-B.1 TC₅₀ de IFNs

IFN	TC ₅₀ µg/ml			Valor medio (X±SD, n=3)
	1 ^{er} experimento	2 ^{do} experimento	3 ^{er} experimento	
Nuevo tipo de interferón compuesto recombinante	141.42	125.96	150.08	139.18±12.22
IFN-α-2b	17.68	15.75	18.10	17.18±1.25

El efecto anti-virus del medicamento: se observaron los efectos anti-virus de dos IFNs in vitro. Los resultados de los experimentos se muestran en la Tabla 9-B.2, y los resultados de TI se muestran en la Tabla 9-B.3.

30

Tabla 9-B.2, La actividad anti-virus de IFNs

IFNs	Concentración de virus (TCID ₅₀)	IC ₅₀ (µg/ml)			
		1 ^{er} experimento	2 ^{do} experimento	3 ^{er} experimento	Valor medio (X±DE, n=3)
Nuevo tipo de compuesto interferón recombinante	10000	0.79	1.04	0.93	0.92±0.12
IFN-α-2b		5.04	4.56	4.56	
Nuevo tipo de compuesto interferón recombinante	1000	0.19	0.18	0.18	0.18±0.01
IFN-α-2b		1.18	1.19	1.12	

Nuevo tipo de compuesto interferón recombinante	100	0.08	0.10	0.11	0.10±0.02
IFN-α-2b		0.33	0.21	0.30	0.28±0.06

Tabla 9-B.3, La actividad anti-virus de IFNs

IFNs	Concentración del virus (TCID ₅₀)	TC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	TI (TC ₅₀ /IC ₅₀)
Nuevo tipo de compuesto interferón recombinante	10000	139.18	0.92	151.28
IFN-α-2b		17.18	4.75	3.62
Nuevo tipo de compuesto interferón recombinante	1000	139.18	0.18	773.22
IFN-α-2b		17.18	1.16	14.78
Nuevo tipo de compuesto interferón recombinante	100	139.18	0.10	1391.80
IFN-α-2b		17.18	0.28	61.36

4. Conclusión

- 5 0186 Se observó el efecto de protección del nuevo tipo de compuesto interferón recombinante e IFN-α-2b en Vero E₆ *in vitro*, y se manifestó la capacidad anti-virus de los IFNs. IC₅₀ del nuevo tipo de compuesto interferón recombinante sobre coronavirus asociado al SARS a la concentración de 10000, 1000, 100 fue 0.92, 0.18 y 0.10µg/ml en tres experimentos, TI de ellos fueron 151.28, 773.32 y 1.391.80 respectivamente. IC₅₀ de IFN-α-2b fue 4.75, 1.16, y 0.28µg/ml, TI (índice de tratamiento) de ellos fueron 3.62, 14.78, 61.36 respectivamente.
- 10 0187 Lo más importante, los dos ensayos (ver los ejemplos anteriores 9A y 9B) del efecto *in vitro* del virus anti-SARS de rSIFNco testificaron que aunque la dosis efectiva de rSIFN-co para inhibir el virus del SARS es de 1/5 de la del interferón α-2b que se utiliza clínicamente en China en la actualidad, el Índice de Tratamiento (TI) de rSIFN-co es casi 50 veces el de interferón α-2b. (VER: Efecto *in vitro* de un nuevo tipo de compuesto interferón recombinante e inyección de interferón recombinante-α2b en coronavirus asociado al SARS. Por el Instituto de Microbiología y Epidemiología, Academia de Ciencias Médicas Militares)

15 0188 Treinta mil pulverizaciones de rSIFN-co se habían utilizado entre enfermeras de primera línea y médicos, y personas de alto riesgo en la provincia de Sichuan. El resultado muestra que ni las enfermeras y ni los médicos infectaron el SARS en la provincia de Sichuan.

Director: Jin-yan Wang

- 20 **Auxiliar de laboratorio:** Yan-hong Zhao, Xiao-guang Ji, Min Zhang, Jing-hua, Zhao.

Fecha: de 1 a 30 de julio 2003

Ejemplo 10:

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS INHIBITORIOS DE DIFERENTES INTERFERONES SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN VHB

- 25 0189 El ADN del virus de la hepatitis B (VHB) contiene elementos de consenso para transactivar proteínas cuya actividad ligante se rige por interferones. El tratamiento de hepatocitos infectados por VHB con interferones conduce

a inhibición de la expresión de genes del VHB. El objetivo del presente estudio fue caracterizar los efectos de diferentes interferones sobre la transcripción regulada de VHB. Usando transfección transitoria de células de hepatoma humano con plásmidos indicadores que contienen el gen de luciferasa de luciérnaga bajo el control del Reforzador del VHB (Enh) I, Enh II y núcleo promotor, el Solicitante estudió las actividades biológicas de tres diferentes interferones en la transcripción.

Materiales y Métodos

0190

1. Interferones: IFN-con1 (Infergen®), IFN-Hui-Yang (γSIFN-co) e IFN-beta 1b
2. Plásmido indicador: Los fragmentos de ADN que contienen Reforzador del VHB (Enh) I, Enh II y promotor de núcleo se prepararon usando PCR y extremo romo clonado en el sitio Smal I del plásmido indicador promotor y potenciador menor de luciferasa de luciérnaga pGL3-Basic (Promega, WI, EE.UU.). El plásmido indicador resultante se denominó como pGL3-HBV-Luc.
3. Cultivo de células y transfección de ADN: las células HepG2 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de FBS y 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin. Las células se mantuvieron en 30°C, incubadora 5%CO₂. Las células fueron transfectadas con plásmido indicador pGL3-VHB-Luc usando kit de transfección de Lipofectina de Boehringer. Tras 18 horas, se eliminó el medio que contiene los reactivos de transfección y se añadió medio fresco con o sin interferones. Las células se mantuvieron en cultivo durante otras 48 horas.
4. Ensayo de luciferasa: Cuarenta y ocho horas después de la adición del interferón, se cosecharon las células y se preparó la lisis celular. La concentración de proteína de lisados celulares se midió usando el kit de Ensayo de Proteínas de Bio-Rad. La actividad de luciferasa se midió usando Sistemas de Ensayo de Indicador de Luciferasa de Promega según las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS

La Expresión de la Actividad de Luciferasa en Diferentes Lisados Celulares Tratados con Interferón

0191

Sin tratamiento	IFN-con1	IFN-Hui-Yang	IFN-beta 1b
100	48+8	29+6	64+10

0192 Este resultado muestra que γSIFN-CO inhibe más eficazmente sobre la expresión de la expresión de genes del VHB.

Ejemplo 11:

EFFECTOS SECUNDARIOS Y CAMBIOS EN LA TEMPERATURA DEL CUERPO CUANDO SE UTILIZA γSIFN-co

0193 En general hay más efectos secundarios al uso de interferón. Los efectos secundarios incluyen: náusea, dolor muscular, pérdida de apetito, pérdida de pelo, hipoleucocitosis (hipoleukmia; hipoleucocitosis; hipoleukia), y disminución de plaquetas en sangre, etc.

MÉTODO

0194 Se dividen muestras de pacientes en dos grupos. 11 pacientes en el grupo A se inyectaron con 9 µg Infergen®. A 10 pacientes en el Grupo B se inyectaron 9 µg γSIFN-co. Ambos grupos fueron controlados durante 48 horas tras las inyecciones. El primer control se registró 1 hora tras la inyección. Después de eso, se realizaron registros cada 2 horas.

0195 Tabla 11.1 es la comparación de efectos secundarios entre pacientes inyectados con 9µg de Infergen® y 9µg de γSIFN-co.

Tabla 11.1 Efectos Secundarios

		γSIFN-co 9μg	Infergen® 9μg
		Persona: n=10	Persona: n=11
Sistemas corporales	Reacciones	Recuento	Recuento
En general	Débil	3	3
	Calor plantar	1	
	frigor lábil	3	4
	Pierna sin fuerzas		3
	Lumbago leve	2	1
	Dolor corporal	4	5
Sistema Nervioso Central/ Sistema Nervioso Periférico	Dolor de cabeza	3	6
	Mareos	2	11
	Somnolencia		3
Gastroenterostomía	Apoclesis	1	
	Celiodinia	1	
	Diarrea	1	
Sistema musculoesquelético	Mialgia	1	2
	Artralgia	2	
Sistema respiratorio	nariz congestionada	1	
Paropsia	Ojos inflamados		1

RESULTADOS

5 0196 Para los pacientes inyectados con γSIFN-co, los efectos secundarios fueron menores. Tenían algunos síntomas comunes similares a la gripe, tales como: dolor de cabeza, debilidad, frigidabilidad, dolor muscular, hidrosis, artralgia (artrodinia; artronalgia). Los efectos secundarios de los pacientes inyectados con Infergen® fueron peores que los inyectados con γSIFN-co.

10 0197 De las figuras 9A-1, 9A-2, 9B-1, y 9B-2, era obvio que las temperaturas corporales de los pacientes de la muestra en el grupo A eran más altas que las de los pacientes del grupo B. También reflejó que la resistencia de γSIFN-co fue mucho mejor que la de infergen®.

Ejemplo 12:

CRECIMIENTO DE CRISTALES de γSIFN-co Y ENSAYO DE PARÁMETRO DE CRISTALOGRAFÍA

0198 Cristal de γSIFN-co. Se encontraron dos tipos de cristales después de ensayar y experimentar sistemáticamente. (Ver Figuras 10-12)

15 1. Crecimiento de cristal

0199 Disolver la proteína γSIFN-co con agua pura (H₂O) a 3mg/ml en densidad. Buscar la cristalización usando Hampton Research Crystal Screen I y II que fue hecha por Hampton Company. Usando el Método de Difusión de Gotas en Suspensión, 500 μl de líquido, gota de proteína 1 μl + 1 μl de líquido, a temperatura 293 K. Se encontraron los primeros 2 tipos diferentes de pequeños cristales como se listan en la Tabla 12.1.

Tabla 12.1 Cribado de γ SIFN-co Cristalino

Condición	I	II
Diluyente	0.1M Tris-HCl PH=8.75	0.1M HEPES PH=7.13
Precipitante	17.5%(p/v) PEG550 MME	10%(p/v)PEG6K
Aditivos	0.1M NaCl	3%(v/v)MPD
Temperatura	293K	293K
Tamaño de Cristal (mm)	0.2x0.2x0.1	0.6x0.02x0.02
Cristalograma	Figura 10	Figura 11

2. Recogida de Datos y Procesamiento

5 0200 Se utilizó el Cristal I para recopilar datos de difracción de rayos X y análisis preliminar de cristalografía. Se ensayaron también los parámetros. Los datos de difracción se recogieron a temperatura ambiente. Se insertó Cristal I (Condición I) en un tubo de pared delgada siliconada. Usando detector BrukerAXS Smart CCD, la fuente de luz es CuK α ($\lambda=1.5418\text{\AA}$) generada por generador de rayos X Nonius FR591. Energía luminosa 2000 KW (40 kv x 50mA), longitud de onda 1.00 \AA , bajo explosión 60 segundos, $\Delta\phi=2^\circ$, la distancia entre cristal y detector fue 50 mm. Los datos fueron procesados usando Proteum Procedure Package de Bruker Company. Ver Figura 12 para el patrón de difracción de cristal (parcialmente). Ver Tabla 12.2 para el resultado del proceso.

Tabla 12.2 Resultados de Parámetros de Cristalografía

Parámetros	
a (\AA)	82.67
b (\AA)	108.04
15 c (\AA)	135.01
α ($^\circ$)	90.00
β ($^\circ$)	90.00
γ ($^\circ$)	98.35

20 Grupo Espacial P2 o P2₁

Nitidez de separación 5 \AA

Molécula asimétrica # 10

Disolución 57.6%

25 0201 Además, no hubo crecimiento de cristales de γ SIFN-co basado en publicaciones anteriores. El resultado más cercano al γ SIFN-co fue h₁FN-a2b pero el análisis era muy complicado. Después de sembrar 3 veces, el cristal creció hasta 0.5x0.5x0.3mm, la nitidez de separación fue 2.9 \AA , el grupo espacial fue P2₁. Los cristales también eran grandes, el número de molécula asimétrica fue 6, y la disolución fue aproximadamente 60%.

30

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que tiene la secuencia mostrada en la Figura 1.
2. Un interferón recombinante obtenible mediante un proceso que comprende introducir en E. coli la secuencia de polinucleótidos mostrada en la Figura. 1.
- 5 3. Una composición que comprende el interferón recombinante de la reivindicación 2.
4. Una composición farmacéutica que comprende el interferón recombinante de la reivindicación 2 y un portador farmacéuticamente aceptable.
5. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1.
6. Una célula huésped aislada que comprende el vector de la reivindicación 5.
- 10 7. El interferón recombinante de la reivindicación 2 para uso médico.
8. El interferón recombinante de la reivindicación 2 para uso como un medicamento para evitar o tratar el Síndrome Respiratorio Agudo Severo.
9. El interferón recombinante para uso de la reivindicación 7, en el que el interferón se administra por vía oral, a través de inyección en vena, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal o mucosal, o por inhalación vía un inspirador.
- 15 10. El interferón recombinante para uso de la reivindicación 7, en el que el interferón es suministrado por un dispositivo de pulverización.
11. El interferón recombinante para uso de la reivindicación 7, en el que el interferón está liofilizado.
12. Un proceso para la preparación del interferón recombinante de la reivindicación 2 que comprende:
 - introducir en un huésped E. coli la secuencia de polinucleótidos mostrada en la Fig. 1;
 - cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión del interferón recombinante; y
 - cosechar el interferón recombinante.
- 20 13. Uso del interferón recombinante de la reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento.

Figura 1

```

5'          11          21          31          41          51
+1 M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A
      1 ATGTGGCAGC TGCCGCAGAC CCACTCCCTG GGTAAACCGTC GTGCTCTGAT CCTGCTGGCT
        TACACGCTGG ACGGCCGTCTG GGTGAGGGAC CCATTGGCAG CACGAGACTA GGACGACCGA

5'          71          81          91          101          111
+1 Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P
      61 CAGATGCGTC GTATCTCCCC GTTCTCCTGC CTGAAAGACC GTCACGACTT CCGTTTCCCG
        GTCTACGCAG CATAGAGGGG CAAGAGGACG GACTTTCTGG CAGTGGTGAA GCCAAAGGGC

5'          131          141          151          161          171
+1 Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E
      121 CAGGAAGAAT TCGACGGTAA CCAGTTCCAG AAAGCTCAGG CTATCTCCGT TCTGCACGAA
        GTCCTTCTTA AGTGCCATT GGTCAAGGTC TTTGAGTCC GATAGAGGCA AGAGGTGCTT

5'          191          201          211          221          231
+1 M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E
      181 ATGATCCAGC AGACCTTCAA CCTGTTCTCC ACCAAAGACT CCTCCGCTGC TTGGGACGAA
        TACTAGGTCC TCTGGAAGTT GGACAAGAGG TGGTTTCTGA GGAGGCGACG AACCGTGCTT

5'          251          261          271          281          291
+1 S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C
      241 TCCCTGCTGG AAAAATTCTA CACCGAACTG TACCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCTTGC
        AGGGACGACC TTTTAAAGAT GTGGCTTGAC ATGGTCGTGC ACTTGCTGGA CCTTCAAGC

5'          311          321          331          341          351
+1 V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A
      301 GTTATCCAGG AAGTTGTTGT TGAAGAAAACC CCGCTGATGA ACGTTGACTC GATCCTGGCT
        CAATAGGTCC TTCAACCACA ACTTCTTTGG GCGGACTACT TGCAACTGAG GTAGGACCGA

5'          371          381          391          401          411
+1 V K K Y F Q R I T L Y L T E K K Y S P C
      361 GTTAAAAAAT ACTTCCAGCG TATCACCCCTG TACCTGACCG AAAAAAATA CTCCCCTGTC
        CAATTTTTTA TGAAGGTGGC ATAGTGGGAC ATGGACTGGC TTTTTTTTAT GAGGGGCACG

5'          431          441          451          461          471
+1 A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q
      421 GCTTGGGAAG TTGTTGCTGC TGAATCATG CGTTCCTTCT CCCTGTCCAC CAACCTGCAG
        CGAACCCCTC AACAAGCAGC ACTTTAGTAC GCAAGGAAGA GGGACAGGTG GTTGGACGTC

5'          491          501
+1 E R L R R K E #
      481 GAACGTCTGC GTCGTAAGA ATAA
        CTTGCAGACG CAGCATTCT TATT
    
```

Figura 2

```

5'           11           21           31           41           51
+1 M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A
1 ATGTGTGATT TACCTGAAAC TCATTCTCTT GGTAACCGTC GCGCTCTGAT TCTGCTGGCA
  TAGACACTAA ATGGAGTTTG AGTAAGAGAA CCATTGGCAG CGCGAGACTA AGACGACCGT

5'           71           81           91           1           11
+1 Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P
61 CAGATGGGTC GTATTTCCCC GTTTAGCTGC CTGAAAGACC GTCACGACTT CGGCTTTCCG
  GTCTACGCAG CATAAAGGGG CAAATCGACG GACTTTCTGG CAGTGTCTGAA GCGAAAGGG

5'           31           41           51           61           71
+1 Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E
121 CAAGAAGAGT TCGATGGCAA CCAATTCCAG AAAGCTCAGG CAATCTCTGT ACTGCACGAA
  GTTCTTCTCA AGCTACCGTT GGTTAAGGTC TTTGAGTCC GTTAGAGACA TGACGTGCTT

5'           91           1           11           21           31
+1 M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E
181 ATGATCCAAC AGACCTTCAA CCTGTTTCC ACTAAAGACA GCTCTGCTGC TTGGGACGAA
  TACTAGGTTG TCTGGAAGTT GGACAAAAGG TGATTTCTGT CGAGACGAGG AACCTGCTT

5'           51           61           71           81           91
+1 S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C
241 AGCTTGCTGG AGAAGTTCTA CACTGAACTG TATCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCATGC
  TCGAACGACC TCTCAAGAT GTGACTTGAC ATAGTCGTCG ACTTGCTGGA CCTTCGTAGC

5'           11           21           31           41           51
+1 V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A
301 GTAATCCAGG AAGTTGGTGT AGAAGAGACT CCGCTGATGA ACGTCGACTC TATTCTGGCA
  CATTAGGTCC TTCAACCACA TCTTCTCTGA GCGACTACT TGCAGCTGAG ATAAGACCGT
    
```

Figura 3

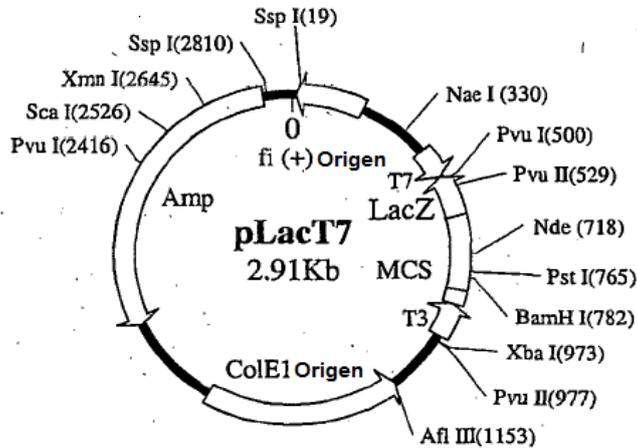


Figura 4

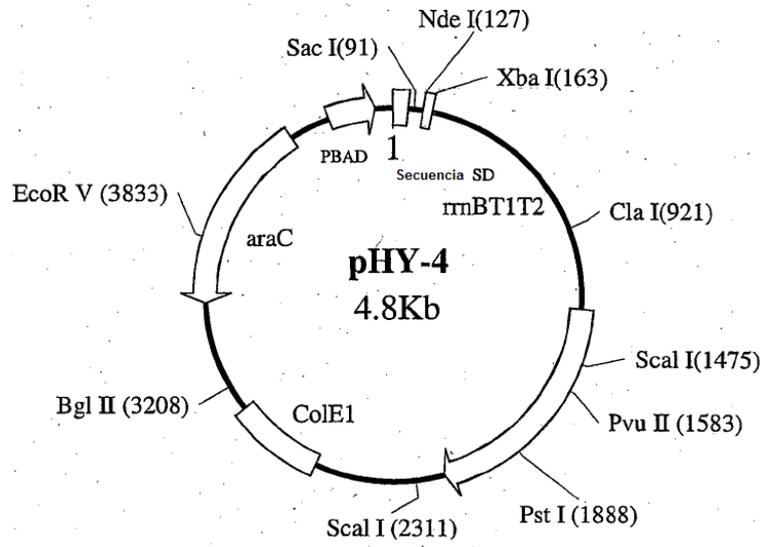


Figura 5

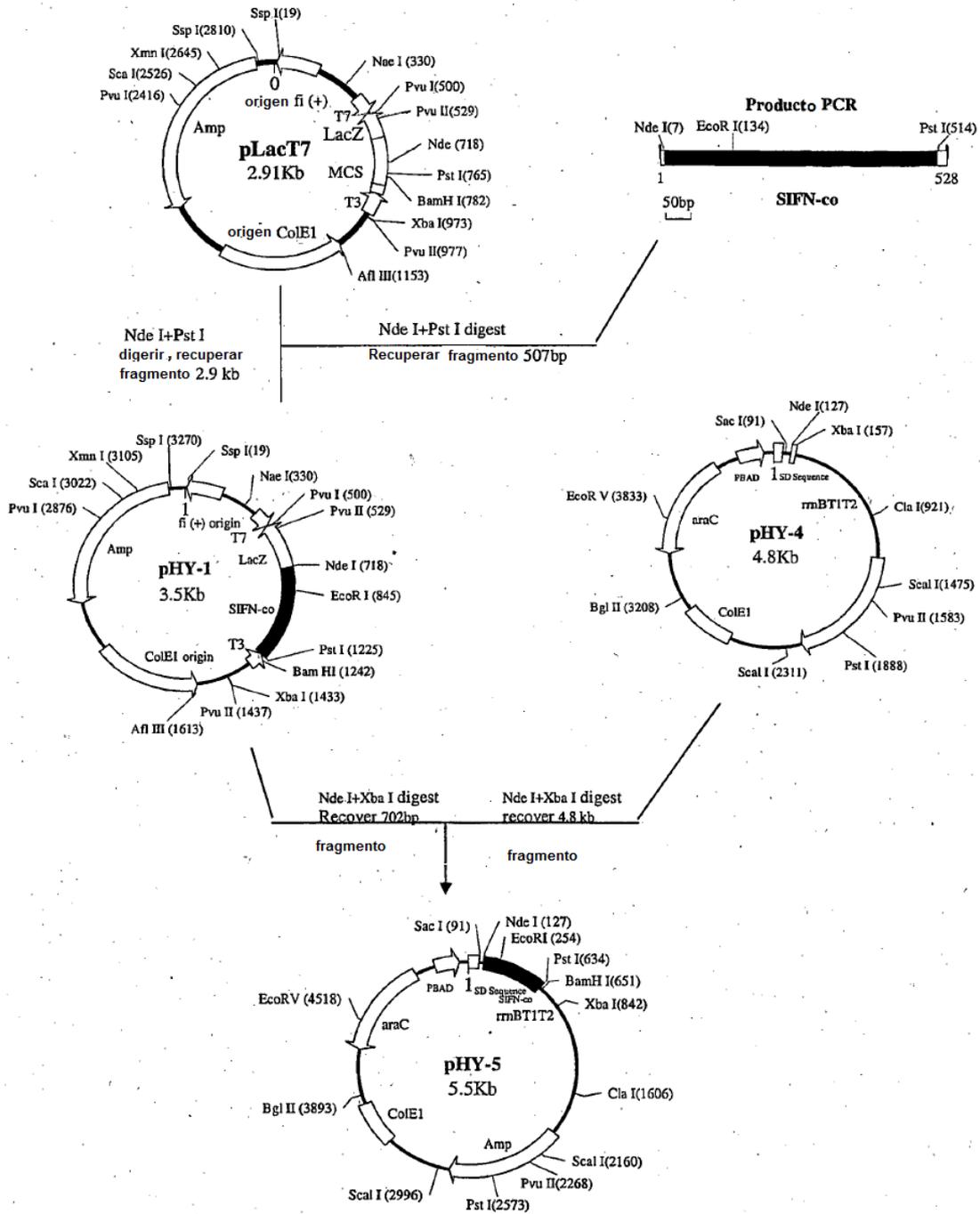


Figura 6-A

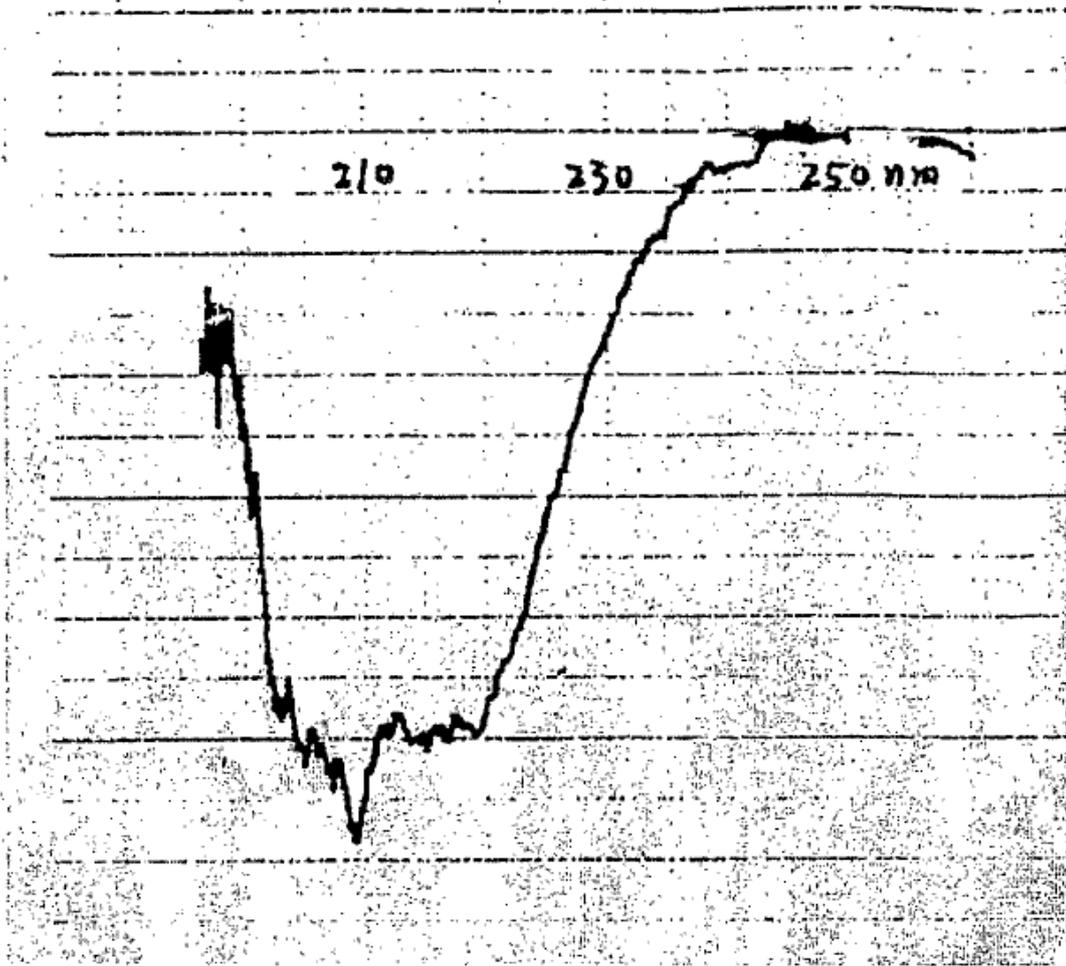


Figura 6-B

INF CONSENSO DE ESPECIES ALFA HUMANO

495

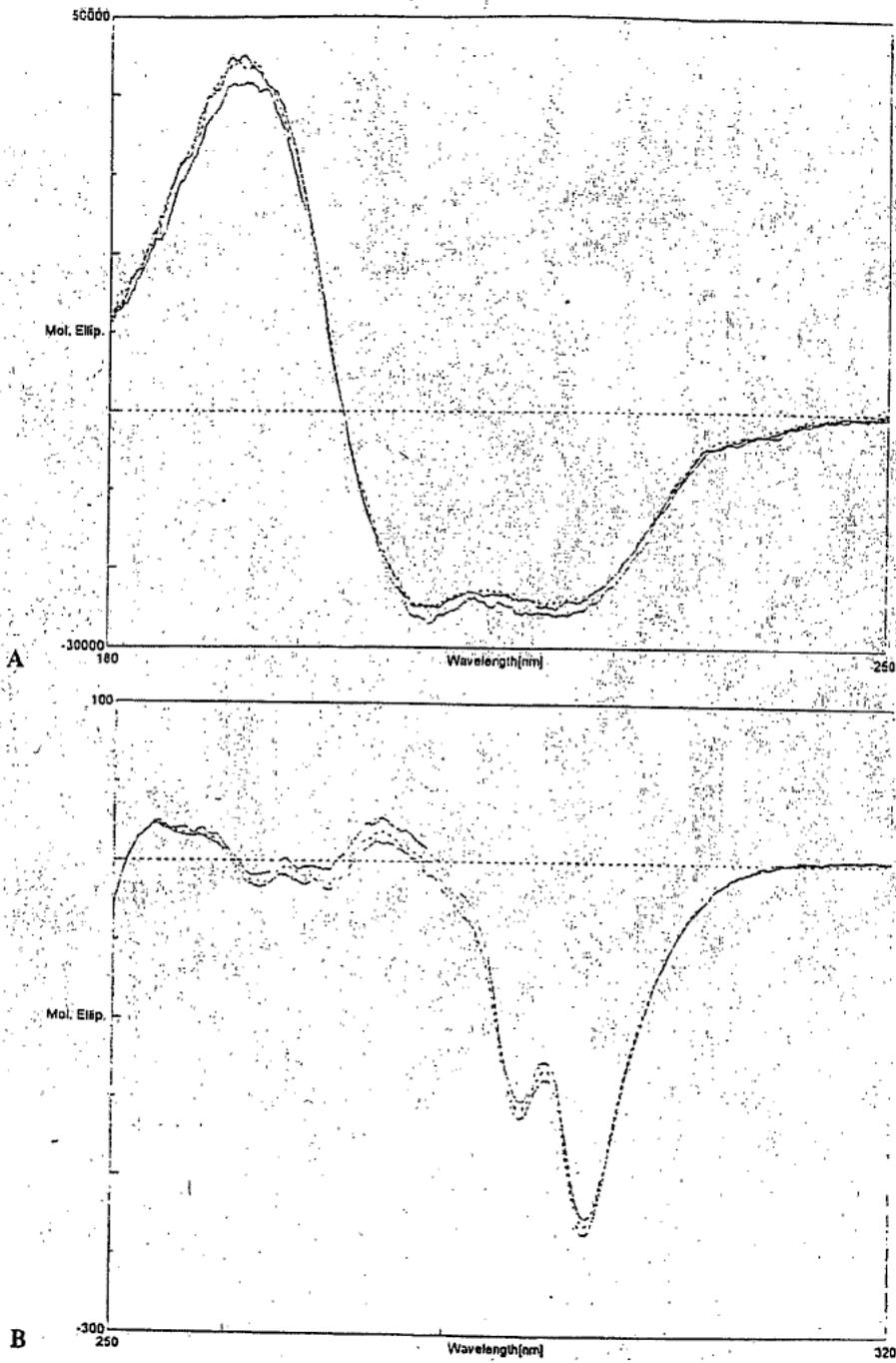


Figura 6-C

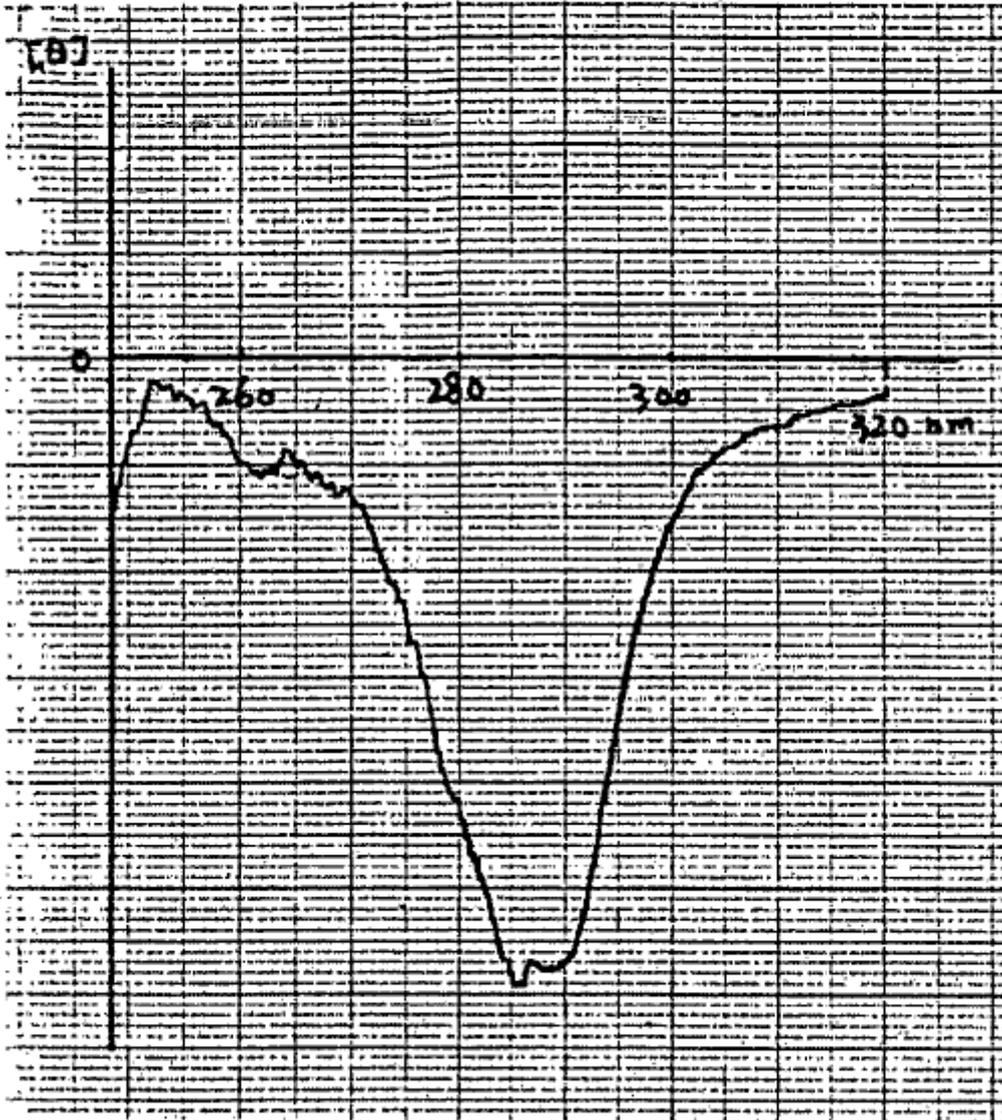


Figura 6-D

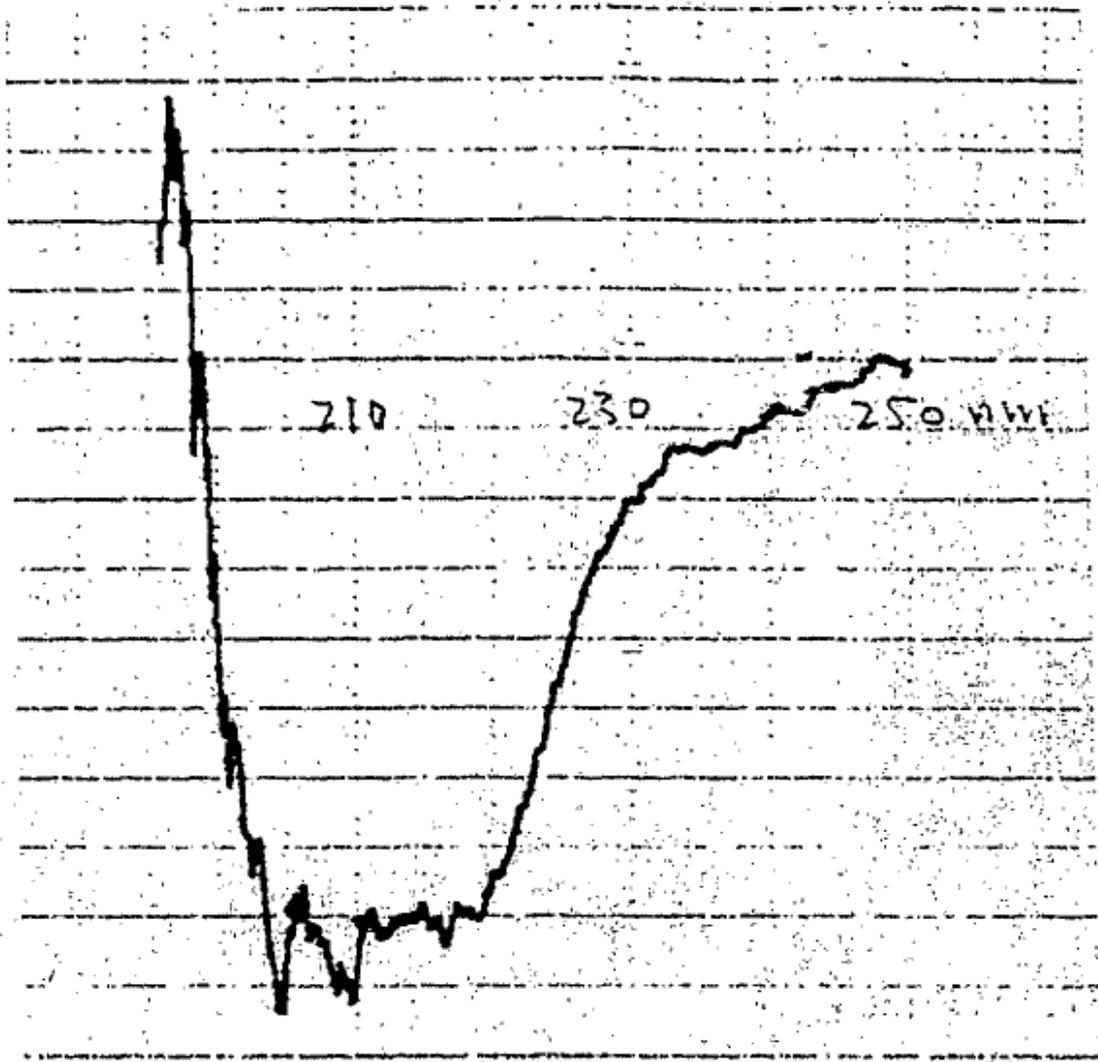


Figura 7A

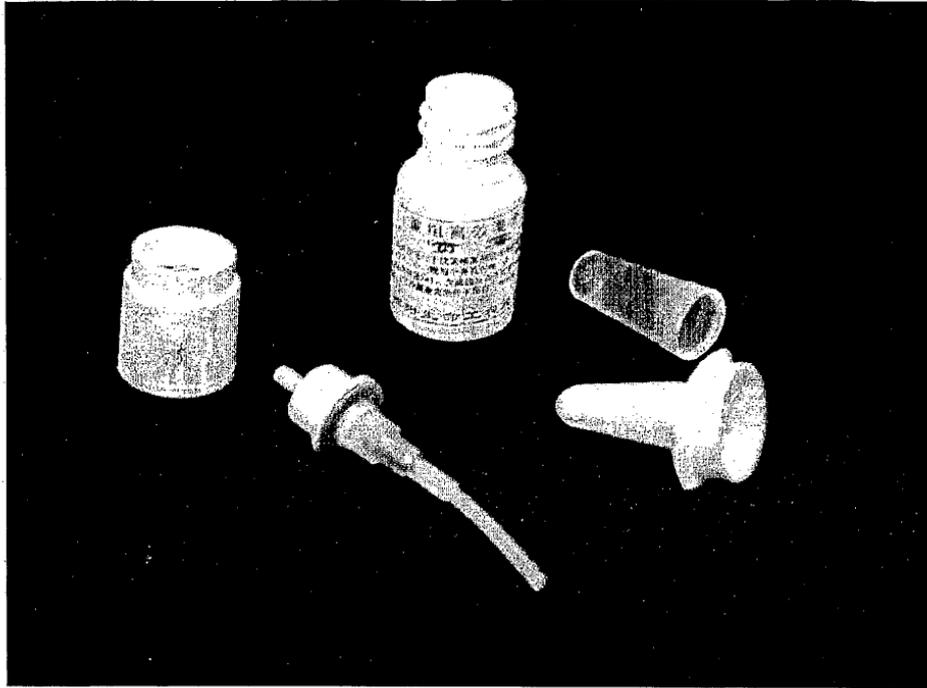


Figura 7B

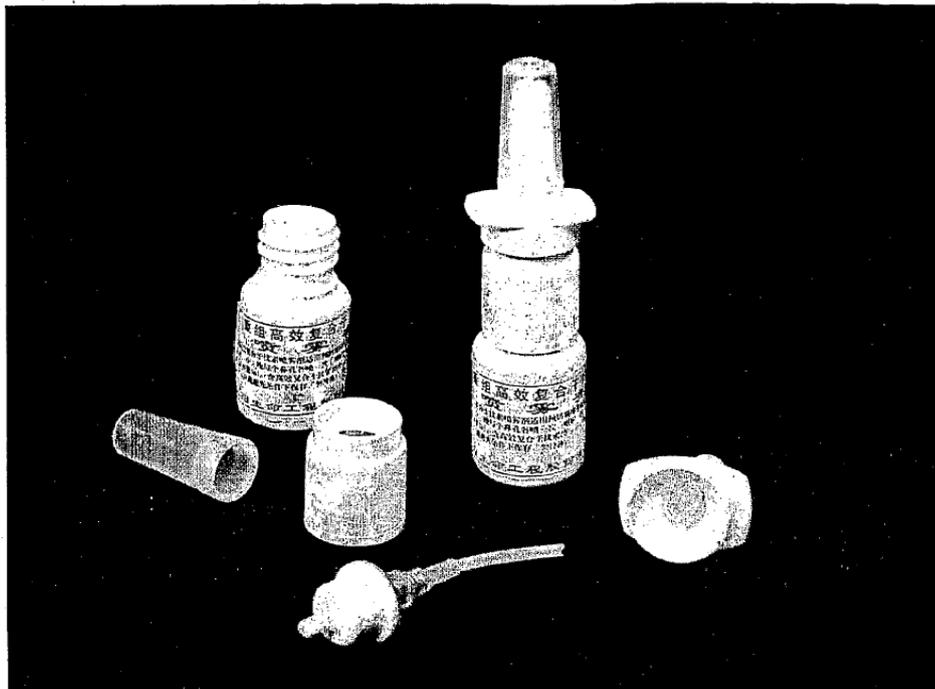


Figura 7C



Figure 7D

1. Pre-pulverización

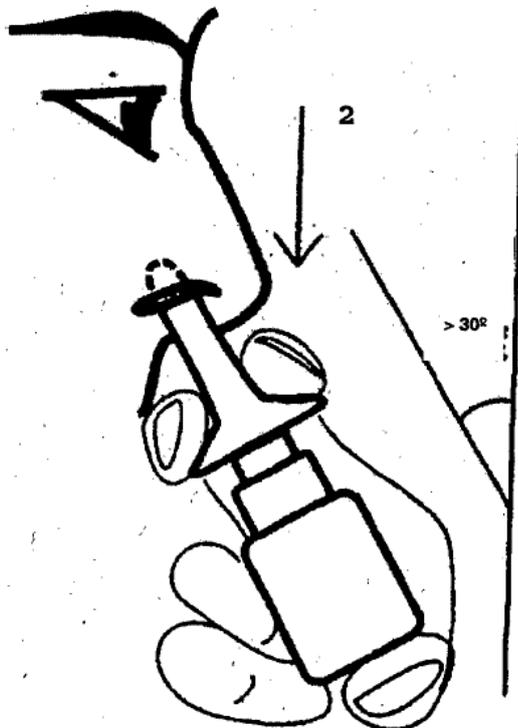
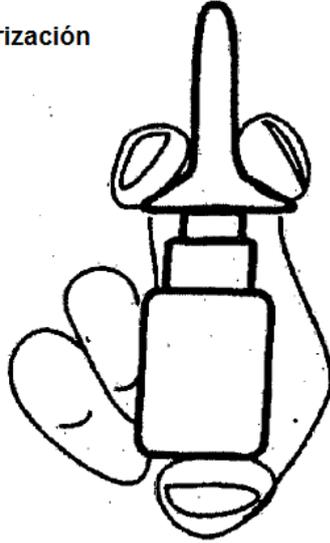


Figura 8

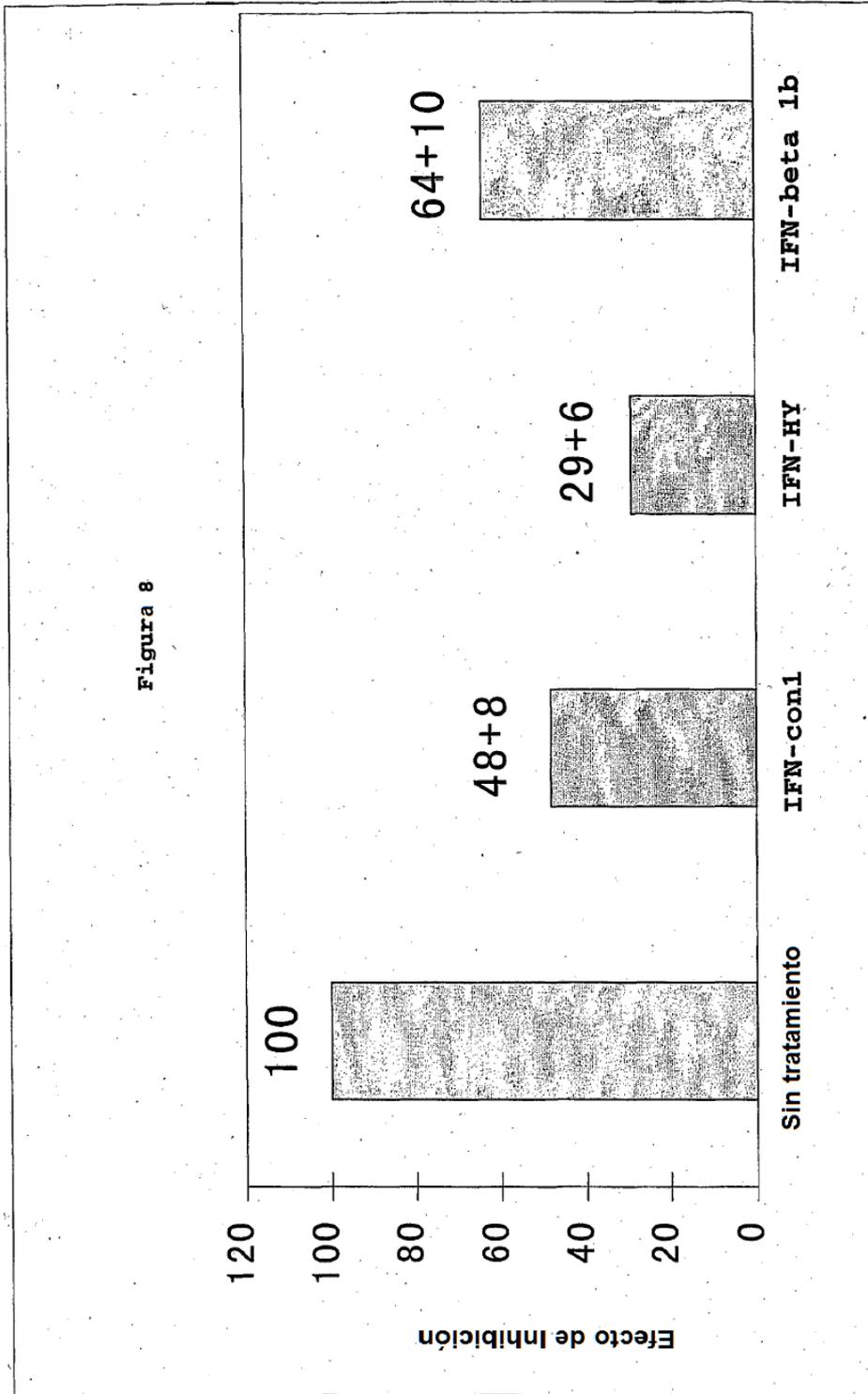


Figura 9A-1

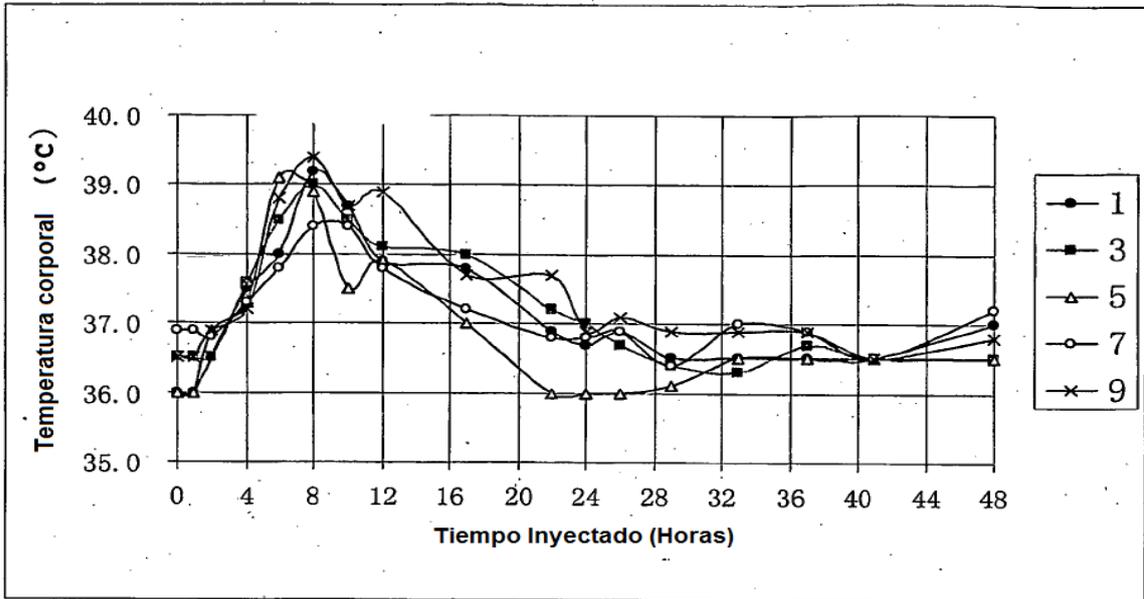


Figura 9A-2

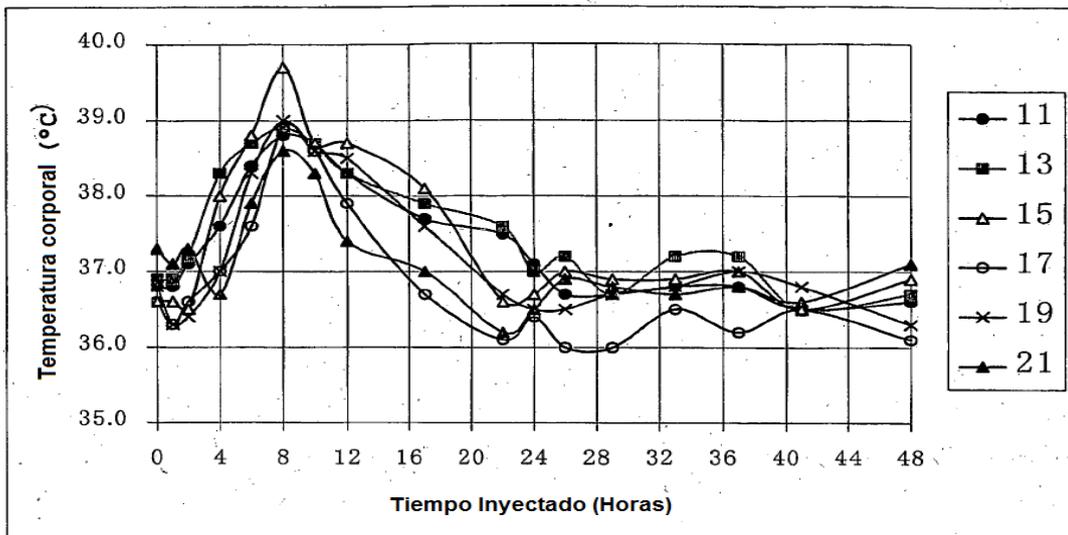


Figura 9B-1

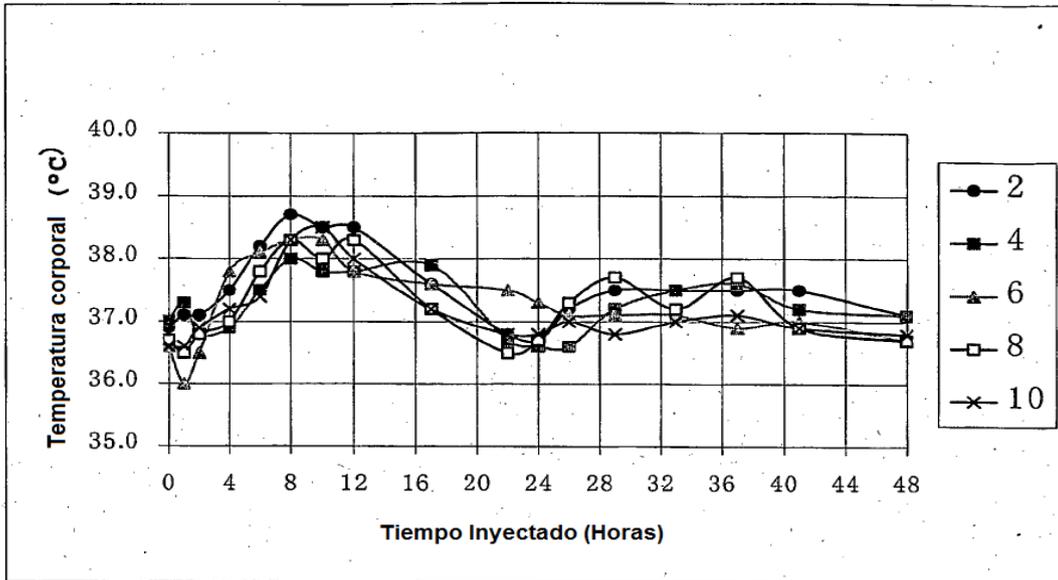


Figura 9B-2

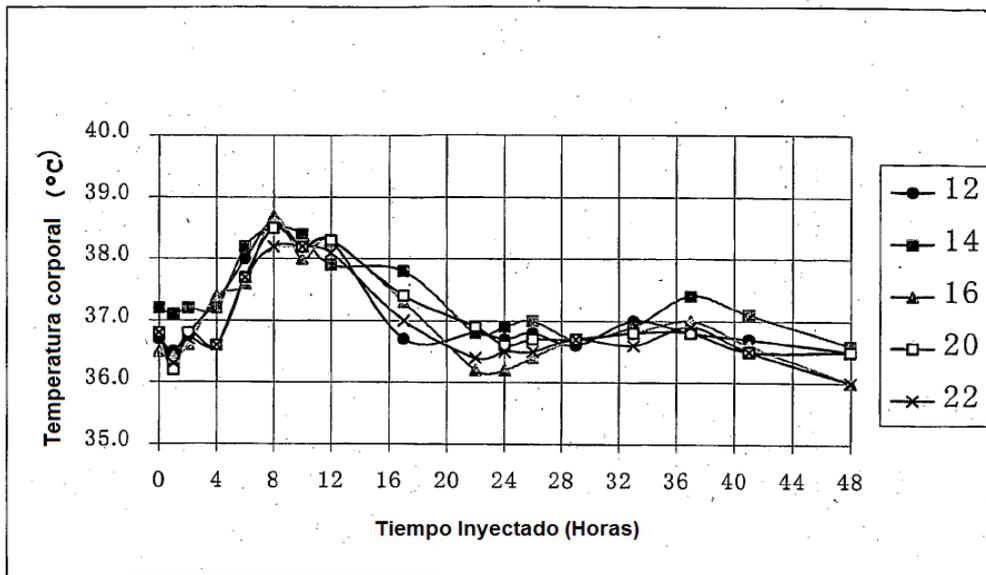


Figura 10

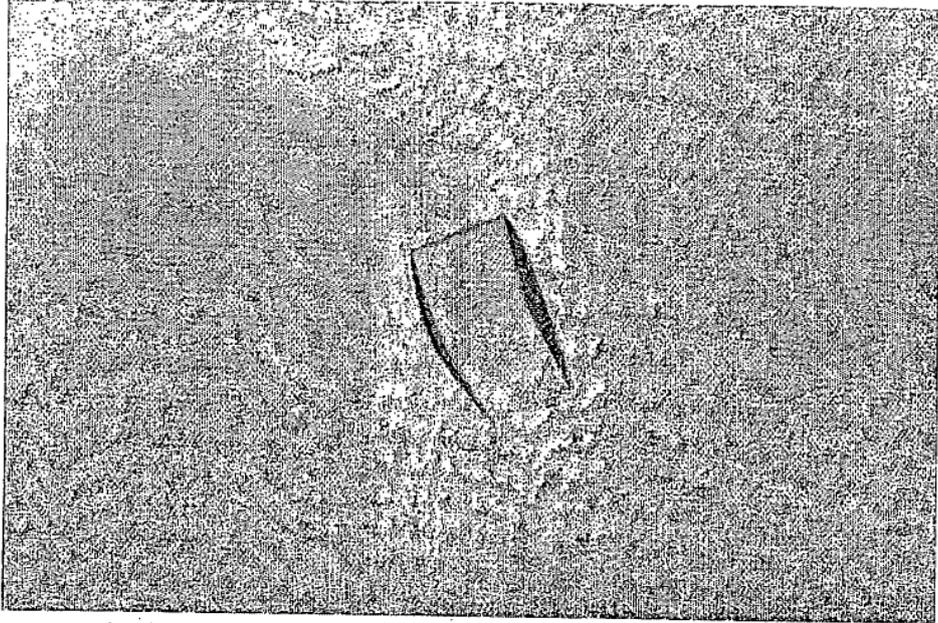


Figura 11

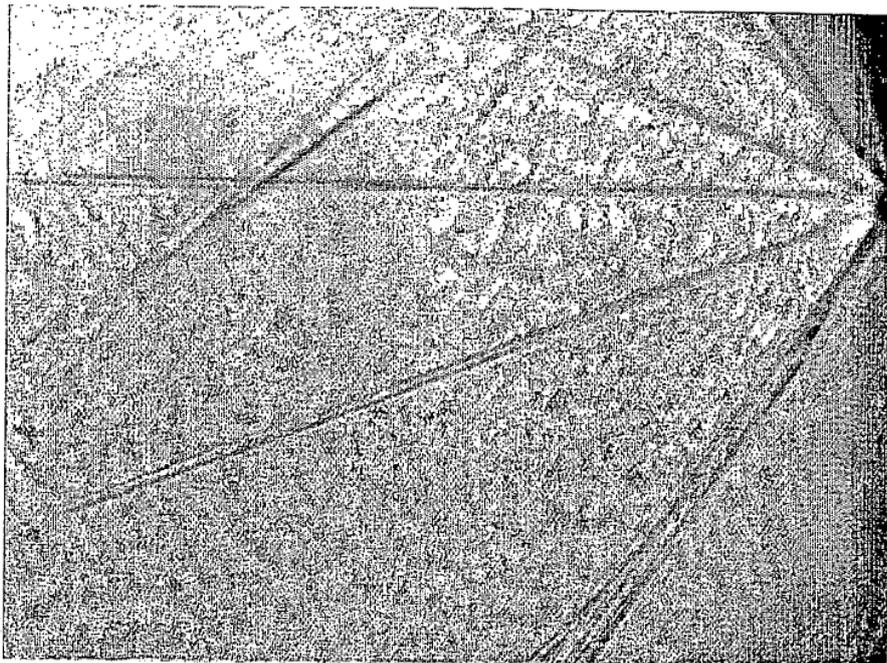


Figura 12

