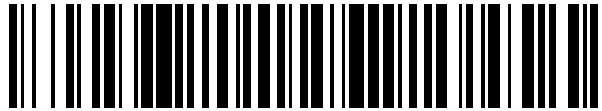


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 218**

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 10193126 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2325202**

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

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2015

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:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 528 218 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 modificada

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un supercompuesto de interferón recombinante (rSIFN-co) que puede obtenerse mediante un proceso que comprende introducir en *E. coli* la secuencia polinucleotídica como se muestra en la Fig. 1, con configuración espacial cambiada. Una característica del rSIFN-co en esta invención es que este no solo puede inhibir la duplicación del ADN (ácido desoxirribonucleico) del virus de la hepatitis B sino también la secreción del HBsAg y del HBeAg.

Antecedentes de la invención

15 El rSIFN-co es una nueva molécula de interferón construida con los aminoácidos conservativos más comunes encontrados en los subtipos del α -IFN humano natural usando métodos de modificación por ingeniería genética. Las Patentes de Estados Unidos Nos 4.695.623 y 4.897.471 lo han descrito. Se ha demostrado que el rSIFN-co tiene actividad IFN de amplio espectro y actividad inhibidora viral y tumoral y de células destructoras naturales. La Patente de Estados Unidos N° 5.372.808 de Amgen, Inc. aborda el tratamiento con rSIFN-co. La Patente China N° 97193506.8 de Amgen, Inc., aborda el re-tratamiento de rSIFN-co en la hepatitis C. La Patente China N° 98114663.5 de Shenzhen Jiusheng Bio-engineering Ltd. aborda el tratamiento con rSIFN-co para la hepatitis B y hepatitis C.

A finales de 1997, la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos autorizó a Amgen a producir rSIFN-co con *E. coli* para el tratamiento clínico de la hepatitis C.

25 Los pacientes con hepatitis B pueden identificarse cuando se detectan el HBsAg y el HBeAg. El α -IFN se usa normalmente en el entorno clínico para tratar la hepatitis B. El IFN se une a receptores de membrana celular superficiales, que inhiben la duplicación del ADN y ARN (ácido ribonucleico), incluyendo la inducción de algunas enzimas para impedir la duplicación de los virus en células infectadas por hepatitis. Todos los IFN pueden inhibir solo la duplicación del ADN de virus, no el antígeno e ni el s.

Esta divulgación describe un supercompuesto de interferón recombinante, un método para producirlo y sus usos.

35 Un brote de neumonía típica, denominado Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SRAG) e identificado por primera vez en la provincia de Guangdong, en China, se propagó a varios países. Se detectaron casos similares en pacientes en Hong Kong, Vietnam y Canadá a partir de febrero y marzo de 2003. La Organización Mundial de la Salud (OMS) decretó una alerta global para la enfermedad. A mitades de marzo de 2003, el SRAG se identificó en personal sanitario y en familiares que habían cuidado a pacientes con enfermedad respiratoria grave en el Extremo Oriente. Muchos de estos casos pudieron rastrearse a través de cadenas de transmisión múltiple hasta un sanitario de la provincia de Guangdong que visitó Hong Kong, donde estuvo hospitalizado con neumonía y falleció. A últimos de abril de 2003, la OMS describió miles de casos SRAG y cientos de muertes relacionadas con SRAG de más de 40 25 países en todo el mundo. La mayoría de estos casos se produjeron después de estar expuesto a pacientes con SRAG en entornos familiares y sanitarios. Esta divulgación proporciona un método para prevenir y/o tratar el SRAG.

45 Otra amenaza epidémica actual en Asia es el virus de la gripe aviar (H5N1). La gripe aviar es una enfermedad infecciosa en aves producida por las cepas de tipo A del virus de la gripe. Existen 15 subtipos del virus de la gripe aviar; el H5N1 preocupa particularmente porque muta rápidamente infectando no solo a animales, sino a seres humanos. El recuento de muertes humanas confirmadas por gripe aviar, desde el 4 de febrero de 2004, se situó en trece. Los laboratorios de la red de la gripe global de la OMS han estado trabajado para controlar el virus e impedir más muertes humanas. Sin embargo, para comprender completamente la magnitud del H5N1 y sus modos de distribución, se requieren ensayos más meticulosos. Además, los fármacos antivirales solo son eficaces en el tratamiento o prevención de cepas del virus de la gripe A contra aquellas que son de buena salud. Véase http://www.who.int/csr/don/2004_01_15/en, 15 de enero de 2004.

55 Los investigadores del St. Jude y de otros destacados laboratorios que investigan la gripe compiten para crear una vacuna humana prototipo contra el H5N1. Esperan que las vacunas prototipo puedan estar listas en tan solo tres semanas. No obstante, hasta que se cree una vacuna, a los científicos les preocupa que el H5N1 pueda convertirse en una supergripe humana. Véase [The Wall Street Journal, Scientists Rush to Create Vaccine for Bird Flu - Just in Case](#), 28 de enero de 2004.

60 Esta divulgación describe un supercompuesto de interferón recombinante **como se ha definido anteriormente**, un método para su producción y usos de los mismos. Particularmente, el supercompuesto de interferón desvelado en el presente documento es capaz de inhibir, prevenir y/o tratar los virus de la hepatitis, el virus del SRAG o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus y el virus de la gripe aviar.

65

Sumario de la invención

Esta invención proporciona un método para inhibir, prevenir o tratar enfermedades virales o tumores en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón **que puede obtenerse mediante un proceso que comprende introducir en *E. coli* la secuencia polinucleotídica como se muestra en la Fig. 1.**

Esta invención proporciona el método descrito anteriormente en el que el supercompuesto de interferón se administra por vía oral, por inyección venosa, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal o mucosa, o por inhalación mediante un inspirador.

Esta invención proporciona el método para prevenir o tratar enfermedades virales en el que la enfermedad viral es hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, otros tipos de hepatitis, infecciones de virus causadas por el virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus, herpesvirus simple, u otros tipos de herpesvirus, papovavirus, poxvirus, picornavirus, adenovirus, rinovirus, virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo I o virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo II, o virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo III.

La invención proporciona un método para actividades anti-hepatitis. Este puede inhibir la replicación del ADN del VHB y la producción del HBsAg y del HBeAg.

Esta invención proporciona un método para prevenir o tratar enfermedades infecciosas de las vías respiratorias superiores.

Esta invención proporciona un método para prevenir 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 tiroideo, cáncer rinofaríngeo, carcinoma sólido, cáncer de próstata, cáncer de estómago/abdominal, cáncer esofágico, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga superficial, hemangioma, carcinoma epidermoideo, cáncer de cuello uterino, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, glioma, leucocitemia, leucocitemia aguda y leucocitemia crónica, leucemia mielocítica crónica, tricoleucemia, linfadenoma, mieloma múltiple, policitemia vera o sarcoma de Kaposi.

Esta invención proporciona un método para prevenir o tratar en un sujeto el Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SRAG) o las enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón **como se ha definido anteriormente.**

El supercompuesto de interferón puede administrarse por vía oral, por inyección venosa, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal o mucosa, o por inhalación mediante un inspirador.

Esta invención proporciona un método para inhibir el agente causante del Síndrome Respiratorio Agudo Grave, o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus, que comprende poner en contacto el agente con una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón.

Esta invención también proporciona un método para inhibir el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave, las células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave, o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón con dicho virus o células. Este contacto sería directo o indirecto.

Esta invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón capaz de inhibir, prevenir o tratar el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave, las células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave o las enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus y un vehículo adecuado.

Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón recombinante **como se ha definido anteriormente** capaz de inhibir, prevenir o tratar en un sujeto el Síndrome Respiratorio Agudo Grave, las células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave o las enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Es un objetivo de la invención un método para prevenir o tratar en un sujeto el Síndrome Respiratorio Agudo Grave que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón recombinante **como se ha definido anteriormente** en el mismo.

Es un objeto de la invención un interferón recombinante que puede obtenerse mediante un proceso que comprende introducir en *E. coli* la secuencia polinucleotídica mostrada en la Figura 1, para su uso en un sujeto como un medicamento para el tratamiento de una enfermedad viral.

Es un objeto adicional de la invención una composición farmacéutica que comprende un interferón recombinante que puede obtenerse mediante un proceso que comprende introducir en *E. coli* la secuencia polinucleotídica mostrada en la Figura 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de una enfermedad viral.

Preferentemente la enfermedad viral es hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, otros tipos de hepatitis, o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus. Más preferentemente la enfermedad viral es una infección ocasionada por el virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus, herpesvirus simple, u otros tipos de herpesvirus, papovavirus, poxvirus, picornavirus, adenovirus, rinovirus, virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo I, virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo II, virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo III o virus de la gripe aviar.

Es un objeto adicional de la invención un interferón recombinante que puede obtenerse mediante un proceso que comprende introducir en *E. coli* la secuencia polinucleotídica mostrada en la Figura 1, para su uso como un medicamento para el tratamiento de un tumor en un sujeto.

Es un objeto adicional de la invención una composición farmacéutica que comprende un interferón recombinante que puede obtenerse mediante un proceso que comprende introducir en *E. coli* la secuencia polinucleotídica mostrada en la Figura 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de un tumor.

Preferentemente el tumor es cáncer de piel, carcinoma de células basales, melanoma maligno, cáncer de hígado, carcinoma de células renales, cáncer tiroideo, cáncer rinofaríngeo, carcinoma sólido, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer abdominal, cáncer esofágico, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga superficial, hemangioma, cáncer de cuello uterino, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, glioma, leucocitemia, leucocitemia aguda y leucocitemia crónica, leucemia mielocítica crónica, tricoleucemia, linfadenoma, mieloma múltiple, policitemia vera o sarcoma de Kaposi.

Preferentemente el interferón se administra por vía oral, por inyección venosa, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal, administración mucosa, o por inhalación.

Preferentemente incluso el interferón recombinante se formula como un comprimido, una cápsula, un líquido oral, una pasta, una inyección, una pulverización, un supositorio o una solución.

Preferentemente el interferón es α , β o ω . Preferentemente aún el interferón está liofilizado.

Preferentemente, el supercompuesto de interferón se administra por vía oral, por inyección venosa, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal o mucosa, o por inhalación mediante un inspirador.

Preferentemente incluso, el interferón se suministra mediante un dispositivo pulverizador.

Aun preferentemente, el dispositivo se describe en la Figura 7.

Es un objetivo adicional de la invención un método para inhibir el agente causante del Síndrome Respiratorio Agudo Grave que comprende poner en contacto, directa o indirectamente, el agente, con una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón como se ha definido anteriormente.

Preferentemente, el agente causante es un virus.

Es un aspecto adicional de la invención un método para inhibir el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave o las células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave que comprende, poner en contacto una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón con dicho virus o células.

Es un objeto adicional de la invención una composición que comprende una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón capaz de inhibir el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave o las células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave y un vehículo adecuado.

Es un objeto adicional de la invención una composición que comprende una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón capaz de prevenir o tratar el Síndrome Respiratorio Agudo Grave de un sujeto y un vehículo adecuado.

Es un objeto adicional de la invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón recombinante capaz de inhibir el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave o las células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Es un objeto adicional de la invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón recombinante capaz de prevenir o tratar el Síndrome Respiratorio Agudo Grave en un sujeto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Es un objeto adicional de la invención un dispositivo para suministrar la composición farmacéutica como se describe anteriormente.

Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

Es un objetivo adicional de la invención un método para prevenir el Síndrome Respiratorio Agudo Grave en seres humanos que comprende la aplicación del supercompuesto de interferón tres veces al día mediante un pulverizador que contiene veinte microgramos con diez millones de unidades de actividad en tres mililitros.

Descripción detallada de las Figuras

Figura 1. Secuencia de ADNc del rSIFN-co diseñada de acuerdo con el uso de codones de *E. coli* y secuencia de aminoácidos deducida del rSIFN-co.

Figura 2. Secuencia de otro supercompuesto de interferón.

Figura 3. Diagrama del plásmido del vector de clonación T7 pLac.

Figura 4. Diagrama del plásmido del vector de expresión pHY-4

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

Figura 6-A. Espectro de Dicroísmo Circular de Infergen®
(Ensayado por Analysis and Measurement Center of Sichuan University)

Intervalo del espectro: 250 nm - 190 nm

Sensibilidad: 2 m²/cm

Trayectoria óptica: 0,20 cm

Equipo: Dicroísmo Circular J-500C

Muestras: contienen 300 μg/ml de IFN-con1, 5,9 mg/ml de NaCl y 3,8 mg/ml de Na₂PO₄, pH 7,0.

Infergen® (interferón alfacon-1), fabricado por Amgen Inc., también conocido como interferón consenso, se comercializa para el tratamiento de adultos con infecciones del virus de la hepatitis C (VHC) crónica. Actualmente es el único interferón bio-optimizado, aprobado por la FDA, desarrollado a través del diseño racional de fármacos y el único interferón con datos en la etiqueta específicamente para pacientes no respondedores o refractarios. El departamento de ventas de InterMune impulsa el re-lanzamiento de Infergen® en enero de 2002 con una campaña activa para formar a los hepatólogos de Estados Unidos sobre la seguridad y uso apropiado de Infergen®, que representa una nueva esperanza para más del 50 por ciento de pacientes con el VHC que fracasan con otras terapias disponibles actualmente. Véase <http://www.intermune.com/wt/itmn/infergen>, 8/27/2003.

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 consenso. El interferón consenso se fraccionó usando una columna de intercambio aniónico. Las muestras se dializaron en fosfato sódico 10 mM, pH 7,4. Se realizaron las mediciones en el espectropolarímetro Jasco J-170, en un termostato celular a 15 °C (—), forma acilada; (—) forma cis terminal; (...), forma met terminal. A. Espectro UV Lejano. B. Espectro UV Cercano.

Figura 6-C. Espectro de dicroísmo circular de rSIFN-co

Intervalo de espectro: 320 nm-250 nm

Sensibilidad: 2 m²/cm

Trayectoria óptica: 2 cm

Equipo: Dicroísmo Circular J-500C

Muestras: contienen 0,5 mg/ml de rSIFN-co, 5,9 mg/ml de NaCl y 3,8 mg/ml de Na₂PO₄, pH 7,0.

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

Intervalo de Espectro: 250 nm – 190 nm

Sensibilidad: 2 m²/cm

Trayectoria óptica: 0,20 cm

Equipo: Dicroísmo Circular J-500C

Muestras: contienen 30 pg/ml de rSIFN-co, 5,9 mg/ml de NaCl y 3,8 mg/ml de Na₂PO₄, pH 7,0.

Claramente, queda de manifiesto, a partir de los espectros anteriores, que la estructura secundaria, o incluso terciaria, de rSIFN-co es diferente de la del Infergen®.

Figura 7A-C. Pulverizador del Supercompuesto de Interferón Recombinante

Altura: 90 mm

Anchura: 25 mm (base), 6 mm (parte superior)

Peso: 9 g

Descarga volumétrica: 0,1 ml.

Figura 7D. Pulverizador del Supercompuesto de Interferón Recombinante.

Cuando se usa el pulverizador por primera vez, quitar la tapa y descargar en el aire varias veces hasta que salga un chorrito de líquido. En usos posteriores no es necesario probar el pulverizador. Para su uso, siga las ilustraciones mostradas en la figura, es decir: (1) Pre-pulverizar y (2) Presionar hacia abajo la boquilla para liberar la medicación.

Figura 8. Comparación de los Efectos Inhibidores de los Diferentes Interferones sobre la Expresión del Gen del VHB

5 **Figura 9A-1.** Curvas de Cambios de Temperatura Corporal en el Grupo A (5 pacientes)
Esta figura es el registro de los cambios de temperatura corporal de 5 pacientes del Grupo A.

Figura 9A-2. Curvas de Cambios de Temperatura Corporal en el Grupo A (6 pacientes)
Esta figura es el registro de los cambios de temperatura corporal de los 6 pacientes restantes del Grupo A.

10 **Figura 9B-1.** Curvas de Cambios de Temperatura Corporal en el Grupo B (5 pacientes)
Esta figura es el registro de los cambios de temperatura corporal de 5 pacientes del Grupo B.

Figura 9B-2. Curvas de Cambios de Temperatura Corporal en el Grupo B (5 pacientes)
Esta figura es el registro de los cambios de temperatura corporal de los 5 pacientes restantes del Grupo A.

15 **Figura 10.** Cristal I de rsIFN-co

Figura 11. Cristal II de rsIFN-co

20 **Figura 12.** Difracción de rayos X del Cristal rsIFN-co

Descripción detallada de la invención

25 Esta invención proporciona un método para producir un supercompuesto de interferón recombinante con configuración espacial cambiada y actividad antiviral potenciada que comprende las etapas de:

- (a) introducir la molécula de ácido nucleico **como se muestra en la Fig. 1** que codifica dicho interferón con codones preferidos para la expresión en un hospedador de *E. coli*; y
- (b) poner el hospedador introducido en condiciones que permitan la expresión de dicho interferón.

30 Esta invención proporciona un método para producir interferón, que adicionalmente comprende recuperar el interferón expresado.

Esta invención proporciona un supercompuesto interferón recombinante como se describe anteriormente con configuración espacial cambiada.

35 Esta invención revela que proteínas con la misma secuencia primaria podrían tener diferentes actividades biológicas. Como se ilustra en el siguiente ejemplo, está invención desvela dos proteínas con idénticas secuencias de aminoácidos pero con diferentes actividades. La eficacia de esta actividad puede algunas veces mejorarse y, algunas veces, la proteína con configuración espacial cambiada revelaría una nueva función.

40 También se desvelan equivalentes o miméticos del interferón recombinante como se describe anteriormente.

Un equivalente es una molécula que es similar en cuanto a función al compuesto interferón. Un equivalente sería una mutante de delección, sustitución o reemplazo de la secuencia original.

45 Los miméticos podrían ser un péptido, polipéptido o una entidad química pequeña.

El interferón descrito en el presente documento incluye, pero sin limitación, interferón α , β o ω . En una realización, éste es IFN-1a, IFN-2b u otros mutantes.

50 En una realización, el supercompuesto de interferón desvelado tiene mayor eficacia que el interferón descrito en las Patentes de Estados Unidos Nos 4.695.623 o 4.897.471. Se piensa que este supercompuesto de interferón tiene una estructura secundaria o terciaria exclusiva (véase, por ejemplo, la Figura 6).

55 El supercompuesto de interferón descrito en el presente documento tiene uno o más cambios de estructura espacial resultantes de los cambios de su proceso de producción.

60 El supercompuesto de interferón descrito anteriormente puede producirse mediante un sistema de expresión muy eficaz que usa un promotor especial. En una realización, el promotor es P_{BAD} . Como podrá apreciar fácilmente un experto habitual en la técnica en esta invención pueden usarse otros promotores inducibles, tales como promotores de choque térmico o promotores inducibles por metales pesados.

65 El supercompuesto de interferón también puede producirse con su gen como ADNc sintetizado artificialmente con ajustes de su secuencia de tipo silvestre de acuerdo con la preferencia de codones de *E. coli*. Un análisis amplio de dicho uso de codones (preferencia) puede encontrarse en la Patente de Estados Unidos N° 4.695.623. Véase, por ejemplo, la columna 6, línea 41 - columna 7, línea 35.

El supercompuesto de interferón descrito anteriormente posee actividad antiviral o antitumoral y; por lo tanto, es útil inhibiendo, previniendo y tratando enfermedades virales, tumores o cánceres.

5 Como se usa en el presente documento, las enfermedades virales incluyen, pero sin limitación, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, otros tipos de hepatitis, infecciones causadas por el virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus, herpesvirus simple, otros tipos de herpesvirus, papovavirus, poxvirus, picornavirus, adenovirus, rinovirus, virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo I, virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo II, virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo III.

10 El resfriado es un nombre alternativo a la infección de las vías respiratorias superiores. Se trata de una infección viral contagiosa del tracto respiratorio superior caracterizado por inflamación de las membranas mucosas, estornudos y dolor de garganta. Normalmente está producido por más de 200 virus diferentes, conocidos como rinovirus. Los resfriados no se producen por los mismos virus responsables de la gripe. Los resfriados se contagian a través de gotitas procedentes de toses o estornudos de otras personas resfriadas o por contacto a través de las manos con objetos contaminados por alguna persona resfriada. La frecuencia de los resfriados es mayor entre niños y disminuye con la edad debido a la inmunidad que se produce después de la enfermedad contra el virus causante del resfriado. Gradualmente, en adultos se desarrolla inmunidad contra una amplia variedad de virus causantes de resfriados. Los niños pueden tener 10 resfriados al año, y los adultos pueden tener 3 resfriados al año.

20 El U.S. Centers for Disease Control and Prevention ha estimado que la frecuencia anual promedio de las infecciones del tracto respiratorio superior (IRS) en los Estados Unidos es de 429 millones de episodios, dando como resultado un coste sanitario, directo e indirecto, de más de 2,5 mil millones de dólares.

25 En la mayoría de los casos, el resfriado común lo produce uno de los diversos cientos de rinovirus (52 %), aunque también pueden conducir a la infección los coronavirus (8 %) o el virus sincitial respiratorio (7 %). Otros virus, tales como el virus gripal (6 %), paragripal y adenovirus, pueden producir síntomas respiratorios, pero a menudo éstos están asociados con neumonía, fiebre o enfriamientos.

30 Los resfriados se producen según un patrón estacional que normalmente comienza a mediados de septiembre y finaliza a últimos de abril principios de mayo. El resfriado común es muy contagioso y puede transmitirse por contacto de una persona a otra o a través de gotitas transportadas por el aire. Los síntomas de las vías respiratorias superiores normalmente comienzan 1 o 2 días después de la exposición y generalmente duran de 1 a 2 semanas, aunque la propagación y el contagio del virus pueden continuar durante 2 a 3 semanas más. Los síntomas pueden persistir con la aparición de complicaciones tales como sinusitis o implicación de las vías respiratorias inferiores tales como bronquitis o neumonía.

40 El resfriado común tiene diversos síntomas aparentes, que incluyen malestar, congestión nasal, rinorrea, tos no productiva, dolor de garganta leve y, en algunos casos, fiebre de grado medio. Debido a la similitud de síntomas, un resfriado puede confundirse con rinitis alérgica perenne, aunque normalmente las alergias pueden descartarse debido a las diferencias en la cronicidad.

45 Si un paciente presenta una IRS viral, el espectro de remedios es amplio. Dado que la mayoría de estas infecciones son auto limitantes, los médicos normalmente recomiendan descanso y beber líquidos, aunque otros tratamientos incluyen terapias ambientales y nutricionales, productos mucolíticos y antihistamínicos, con y sin receta, nuevas formulaciones nasales con antihistaminas y anticolinérgicos, y antibióticos. La Tabla 1 enumera medicaciones comúnmente usadas para la tos y el resfriado y sus efectos secundarios.

Tabla 1. Perfil de medicaciones para la tos y el resfriado común y sus efectos secundarios

| Medicación | Finalidad | Efectos secundarios y consideraciones especiales |
|---|--|---|
| Agonistas beta2 en aerosol (por ejemplo, albuterol) | Broncoespasmo postinflamatorio inverso | Elevan la frecuencia cardiaca y pueden producir temblores |
| Productos líquidos en combinación basados en alcohol | Tratar síntomas múltiples | Posibles problemas de somnolencia y coordinación |
| Agonistas de receptores alfa (oral) (por ejemplo, pseudodefdrina, fenilpropanolamina) | Descongestión | Pueden producir taquicardia, nerviosismo, estimulación transitoria, mareos, somnolencia, aumento de la presión arterial |
| Compuestos anticolinérgicos: Bromuro de Ipratropio (tópico) | Antisecretor | Pueden producir sequedad nasal y epixtasis ocasional |
| Otros anticolinérgicos (por ejemplo, metoscopolamina, atropina, hiosciamina) | Antisecretor | Pueden producir ortostasia, disfunción de la regulación cardiaca, sequedad de boca, estreñimiento |
| Antihistaminas (oral) (por ejemplo, clorfeniramina, difenhidramina) | Antisecretor | Somnolencia, sequedad de boca, hipertensión ortostática |

| | | |
|--|---|---|
| Cápsulas de benzonatato | Suprimir la tos, anestesia local | El masticado puede entumecer la boca; puede producir sedación, mareos |
| Codeína, hidrocodona | Suprimir la tos | Somnolencia, estreñimiento, náuseas |
| Dextrometorfán | Suprimir la tos | Posible somnolencia, aunque con efectos secundarios poco habituales |
| Guaifenesina | Promover la expectoración (mucólisis) | Sin efectos secundarios; debe tomarse con grandes cantidades de agua para mejorar su eficacia |
| Descongestivos tópicos (por ejemplo, oximetazolina, fenilefrina) | Descongestión | Quemazón local; el uso prolongado puede producir dependencia. |
| Pastillas para chupar de cinc y vitamina C | Posible reducción de la gravedad y duración de los síntomas | Posible alteración del gusto, aumento de piedras de oxalato en caso de ser susceptible |
| Extraído de http://www.physsportsmed.com/issues/1998/02feb/swain.htm | | |

Utilización del SUPERcompuesto de Interferon para Prevenir o Tratar IRS

5 Aproximadamente el 70~80 % de las IRS se producen por virus tales como el virus Sincitial respiratorio, adenovirus, rinovirus, coxsackievirus, coronavirus y su variante, virus de la gripe A y su variante, virus de la gripe B y su variante; virus paragripal y su variante, o enterovirus y su variante. Una causa principal de IRS en adultos se debe a los rinovirus. En niños, el virus sincitial respiratorio y el virus paragripal son dos causas que conducen a IRS.

10 El supercompuesto de interferón desempeña un papel importante en la lucha contra virus que producen IRS. El supercompuesto interferón obtiene sus efectos antivirales principalmente mediante dos mecanismos:

1. Se adhieren a la superficie de células sensibles y las induce a producir proteína antiviral, bloqueando después la duplicación y reproducción de virus *in vivo*.
- 15 2. El supercompuesto de interferón puede regular respuestas inmunitarias, incluyendo respuestas inmunitarias de linfocitos T, actividad de células NK, la función de fagocitosis del monocarión e incluso la formación de algunos anticuerpos *in vivo*.

20 En el tratamiento para IRS, el supercompuesto de interferón puede aplicarse directamente a la zona afectada mediante una inspiración pulverizadora. Este método de tratamiento permite al interferón alcanzar directamente las células diana. Por consiguiente, la comercialización del suministro como un pulverizador, en lugar de mediante inyección o vía oral, sería más segura y más eficaz para la administración del interferón.

Utilización del SUPERcompuesto de Interferón para Prevenir o Tratar el SRAG

25 Con la autorización del grupo de trabajo de Sichuan sobre la prevención y control del SRAG, la distribución del supercompuesto de interferón comenzó en mayo de 2003. La pulverización del supercompuesto de interferón se asignó a médicos y a personal sanitario de hospitales, áreas pobladas con riesgo elevado de SRAG, y al grupo de investigación nacional sobre la prevención y control del SRAG. Entre los 3.000 usuarios desde el 19 de diciembre de 2003, no hubo informes de ningún efecto secundario en relación con el uso del pulverizador. Además, ningún 30 médico, personal sanitario, personal de la provincia de Sichuan u otras organizaciones que habían usado el pulverizador del supercompuesto de interferón estaban infectados por SRAG.

35 Por lo tanto, esta invención proporciona un método para inhibir, prevenir o tratar la replicación de virus o células infectadas por virus poniendo en contacto dicho virus o células infectadas con una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón **como se ha definido anteriormente**.

Este supercompuesto de interferón es útil en la inhibición, prevención o tratamiento de los siguientes cánceres o tumores:

| | | | |
|-----------------------|---|--|--|
| Cáncer | Cáncer de piel | Carcinoma de células basales Melanoma maligno | |
| | Carcinoma de células renales | | |
| | Cáncer de hígado | | |
| | Cáncer tiroideo | | |
| | Cáncer rinofaríngeo | | |
| | Carcinoma sólido | Cáncer de próstata | |
| | | Cáncer de estómago/abdominal | |
| | | Cáncer esofágico | |
| | | Cáncer rectal | |
| | | Cáncer pancreático | |
| | Cáncer de mama | | |
| | Cáncer de ovario y cáncer de vejiga superficial | | |
| | Hemangioma | | |
| Carcinoma epidermoide | Cáncer de cuello uterino | | |
| | Cáncer pulmonar no microcítico | | |
| | Cáncer pulmonar microcítico | | |
| | Glioma | | |
| Maligno | Leucocitemia | Leucocitemia aguda Leucocitemia crónica | |
| Enfermedad Sanguínea | Leucemia mielocítica crónica | | |
| | Tricoleucemia | | |
| | Linfadenoma | | |
| | Mieloma múltiple | | |
| | Policitemia Vera | | |
| Otros | Sarcoma de Kaposi | | |

5 **Paciente nº 1.** Una paciente con cáncer de ovario comenzó recibiendo inyecciones. Dicha paciente recibió inyecciones de 15 µg el 14 de julio, 16 de julio, 18 de julio, 20 de julio y 22 de julio. El 14 de julio, se observaron 2000 ml de fluido peritoneal. La paciente se sometió a quimioterapia el 22 de julio. El 3 de agosto, se abrió el peritoneo de la paciente. Se esperaban encontrar 21 ml de fluido, pero solo se observaron 200 ml de fluido. Los ovarios izquierdo y derecho y los ganglios linfáticos tenían cáncer. Los órganos restantes estaban limpios.

10 **Paciente nº 2.** Un paciente con cáncer de riñón se trató de la siguiente manera. En un periodo quincenal, el paciente recibió 3 inyecciones de 9 µg de rSIFN-co y 3 inyecciones de 15 µg de rSIFN-co. En el mes completo después de estas inyecciones, recibió inyecciones de 9 µg y 15 µg de rSIFN-co cada dos días. Una biopsia de riñón mostró que no había metástasis después de este ciclo de tratamiento. El paciente mostró recuperación completa. Cada seis meses después de la recuperación, el paciente recibió inyecciones de 15 µg de rSIFN-co 15 veces durante un periodo mensual.

15 Por consiguiente, esta invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de tumores o de células cancerosas poniendo en contacto el supercompuesto de interferón como se ha definido anteriormente con dicho tumor o células cancerosas.

20 En una realización adicional, el supercompuesto de interferón inhibe la duplicación del ADN y la secreción de HBsAg y HBeAg del Virus de la Hepatitis B.

25 Esta invención también proporciona un gen artificial que codifica el supercompuesto de interferón. Se encuentra dentro la experiencia habitual el diseño de un gen artificial. Previamente se han descrito muchos métodos para generar secuencias de nucleótidos y otras técnicas de biología molecular. Véase, por ejemplo, Joseph Sambrook y David W. Russell, Molecular Cloning: A laboratory Manual, diciembre de 2000, publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press.

30 Esta invención proporciona un vector que comprende la secuencia polinucleotídica mostrada en la Fig. 1 que codifica el supercompuesto de interferón como se ha definido anteriormente.

Esta invención proporciona un sistema de expresión que comprende el vector como se ha definido anteriormente. Las células incluyen, pero sin limitación, células procariotas o eucariotas.

35 Esta invención también proporciona una célula hospedadora que comprende el vector como se ha definido anteriormente.

Esta invención proporciona un proceso para la producción del supercompuesto de interferón recombinante como se ha definido anteriormente que comprende introducir, en el hospedador *E. coli*, la secuencia polinucleotídica

mostrada en la Fig. 1 con preferencia de codones seleccionada, cultivando dicho hospedador introducido en una condición apropiada para la expresión de dicho compuesto de interferón y recoger el compuesto de interferón expresado.

- 5 El proceso puede comprender la extracción del supercompuesto de interferón del caldo de fermentación, la recogida de cuerpos de inclusión, la desnaturalización y la renaturalización de la proteína recogida.

El proceso puede conservar la alta eficacia incluso cuando el supercompuesto de interferón se usa con un agente y en una concentración particular. El proceso también comprende la separación y purificación del supercompuesto de interferón. El proceso comprende adicionalmente la liofilización del supercompuesto de interferón purificado. El proceso comprende la producción de inyecciones líquidas del supercompuesto de interferón.

Esta invención también proporciona el supercompuesto interferón producido por los procesos anteriores.

Esta invención proporciona una composición que comprende el supercompuesto de interferón recombinante **como se ha definido anteriormente** y un vehículo adecuado.

- 15 Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el supercompuesto de interferón recombinante **como se ha definido anteriormente** y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Esta invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención de enfermedades virales o tumores en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón **como se ha definido anteriormente**.

- 20 Esta invención proporciona el método descrito anteriormente en el que las enfermedades virales incluyen, sin limitación, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, otros tipos de hepatitis, infecciones de virus causadas por el virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus, herpesvirus simple, u otros tipos de herpesvirus, papovavirus, poxvirus, picornavirus, adenovirus, rinovirus, virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo I, virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo II, virus de la leucemia humana de linfocitos T de tipo III.

- 25 Esta invención proporciona el método descrito anteriormente en el que el supercompuesto de interferón se administró por vía oral, por inyección venosa, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal o mucosa, o por inhalación mediante un inspirador.

- 30 Esta invención proporciona el método descrito anteriormente en el que el supercompuesto de interferón se administró siguiendo el protocolo de inyecciones de 9 µg o 15 µg cada dos días, 3 veces a la semana, durante 24 semanas.

Sorprendentemente se descubrió que el rSIFN-co, cuya estructura espacial se había cambiado, no es solo una preparación que inhibe la duplicación del ADN del virus de la hepatitis B, sino que inhibe la secreción de HBsAg y HBeAg en células 2.2.15.

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

En una realización, el rSIFN-co se produjo con técnicas recombinantes. Con la condición de fijar la secuencia de aminoácidos, el ADN del IFN se rediseñó de acuerdo con el uso de codones de *E. coli* y después el gen de rSIFN-co se sintetizó artificialmente. El ADNc de rSIFN-co se clonó en el vector de alta expresión de *E. coli* mediante técnicas de ADN recombinante y se obtuvo una alta expresión de rSIFN-co usando el mecanismo de inducción/activación de L-arabinosa para activar la transcripción del promotor P_{BAD}.

- 40 En comparación con la termoinducción habitual, los sistemas de modificación por ingeniería genética de inducción de pH y de IPTG, el sistema de inducción/activación de arabinosa tiene algunas ventajas: (1) los sistemas habituales suprimen la función del promotor creando un patrón de "depresión". Después, los promotores inducen la expresión génica aguas abajo. El cambio de temperatura y de pH y la adición de IPTG no puede activar directamente a los promotores.

- 45 En el sistema desvelado en el presente documento, la L-arabinosa no solo desactiva y reprime sino que 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 la dosificación de genes exógenos y de L-arabinosa es lineal. Esto significa que la concentración de arabinosa puede cambiarse para ajustar el nivel de expresión de los genes exógenos. Por lo tanto, es más fácil controlar el nivel de expresión de genes exógenos en *E. Coli* por la arabinosa que cambiar la temperatura y el valor del pH. Esta característica es significativa para la formación de cuerpos de inclusión. (3) L-arabinosa es recursiva, asequible e inocua, que, por el contrario, son las desventajas de otros inductores tales como IPTG. Mediante modificación por ingeniería genética esta realización crea una cepa de *E. coli* eficaz y resistente que expresa rSIFN-co con un sistema de inducción/activación de L-arabinosa. La cepa se cultiva y fermenta en condiciones adecuadas para recoger los cuerpos bacterianos. Los cuerpos de inclusión se purifican después de destruir las bacterias y lavar repetidamente. El resultado final, masa de proteína rSIFN-co, muy pura, con configuración espacial cambiada, para esta invención y para el tratamiento clínico, se obtuvo a partir de la desnaturalización y renaturalización de cuerpos de inclusión y de una serie de etapas de purificación.

- 50 A continuación se indican algunas preparaciones de rSIFN-co: comprimidos, cápsulas, líquidos para consumo oral, pastas, inyecciones, pulverizaciones, supositorios y soluciones. Se recomienda las inyecciones. Es habitual inyectar la medicina por vía subcutánea o venosa. El vehículo medicinal puede ser cualquier vehículo medicinal aceptable, incluyendo hidratos de carbono, celulosa, adhesivos, agentes de plegamiento, emolientes, cargas, adyuvantes de disolución, tampones, conservantes, agentes espesantes, equilibradores, etc. Esta invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la composición anterior y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 65

Para los fines de esta invención, "vehículos farmacéuticamente aceptables" significa cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales. En la técnica se conocen bien ejemplos de vehículos adecuados y pueden incluir, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como solución salina tamponada con fosfato y diversos agentes humectantes. Otros vehículos pueden incluir aditivos usados en comprimidos, gránulos, cápsulas, etc. Normalmente dichos vehículos contienen excipientes tales como almidón, leche, azúcar, determinados tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sus sales, estearato de magnesio o de calcio, talco, grasas o aceites vegetales, goma, glicoles u otros excipientes conocidos. Dichos vehículos también pueden incluir aditivos saporíferos y colorantes u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos.

Esta invención proporciona un método para prevenir o tratar en un sujeto el Síndrome Respiratorio Agudo Grave, o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón recombinante **como se ha definido anteriormente**.

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

El supercompuesto de interferón **como se ha definido anteriormente** puede administrarse por vía oral, por inyección venosa, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal o mucosa, o por inhalación mediante un inspirador.

En una realización, el interferón se suministra mediante un dispositivo pulverizador.

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

En una de las realizaciones, el interferón está liofilizado. Esta invención proporciona un método para inhibir el agente causante del Síndrome Respiratorio Agudo Grave, o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus, que comprende poner en contacto el agente con una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón **como se ha definido anteriormente**.

Se determina que el agente causante del SRAG es un virus. Véase, por ejemplo, Rota *et al.* (2003), Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. Science 1085952 www.sciencexpress.org y Marra, *et al.* (2003), The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus. Science 1085853 www.sciencexpress.org. Esta invención también proporciona un método para inhibir el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave o células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave, o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus, o células infectadas con virus capaces de inducir enfermedades de las vías respiratorias superiores, que comprende poner en contacto una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón **como se ha definido anteriormente** con dichos virus o células. Este contacto sería directo o indirecto.

Esta invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón **como se ha definido anteriormente** capaz de inhibir el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave o células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave, o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus, o células infectadas con virus capaces de inducir enfermedades de las vías respiratorias superiores, y un vehículo adecuado.

Esta invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón **como se ha definido anteriormente** capaz de prevenir o tratar en un sujeto el Síndrome Respiratorio Grave,

o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus, y un vehículo adecuado. Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del súper compuesto de interferón recombinante **como se ha definido anteriormente** capaz de inhibir el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave o células infectadas por el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del supercompuesto de interferón recombinante **como se ha definido anteriormente** capaz de prevenir o tratar en un sujeto el Síndrome Respiratorio Agudo Grave, o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Esta invención proporciona un dispositivo para suministrar la composición farmacéutica descrita anteriormente. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. Como puede apreciarse fácilmente, el supercompuesto de interferón **como se ha definido anteriormente** puede usarse en otros animales o mamíferos.

Esta invención proporciona un método para prevenir en seres humanos el Síndrome Respiratorio Agudo Grave o enfermedades de las vías respiratorias superiores inducidas por virus, que comprende la aplicación del supercompuesto de interferón **como se ha definido anteriormente** tres veces al día mediante un pulverizador que contiene veinte microgramos de interferón, que equivale a diez millones de unidades de actividad en tres mililitros. Esta invención se entenderá mejor a partir de los ejemplos que se indican a continuación. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los métodos específicos y los resultados analizados son meramente ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que se indican más adelante en el presente documento.

Detalles experimentales**EJEMPLO 1**

5 El rSIFN-co es una nueva molécula de interferón construida de acuerdo con los aminoácidos conservativos en el subtipo de IFN- α humano usando métodos de modificación por ingeniería genética. Se ha demostrado que el rSIFN-co tiene actividad IFN de amplio espectro, tal como alta actividad inhibidora tumoral y antiviral, especialmente para el tratamiento eficaz de la hepatitis C.

10 Para rediseñar el ADNc del rSIFN-co se usó el codón de *E. coli* y después se sintetizó artificialmente el ADNc del rSIFN-co a partir de secuencias de ADN del rSIFN-co publicadas y de secuencias de aminoácidos deducidas (Figura 1).

15 Para obtener una proteína de rSIFN-co pura, el ADNc del rSIFN-co se clonó en *E. coli*. Para inducir la alta expresión del gen de rSIFN-co se usó un vector de alta expresión y L-arabinosa, que puede activar el fuerte promotor P_{BAD} en vectores.

Síntesis de la secuencia de ADNc en *E. coli***20 Rediseño de la secuencia de ADNc del rSIFN-co**

El 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 de aminoácidos deducida de la secuencia de ADNc del rSIFN-co rediseñada coincide completamente con la secuencia de aminoácidos nativa del rSIFN-co publicada (Figura 1).

25

Síntesis de la secuencia de ADNc del rSIFN-co**Síntesis semi-molecular del extremo 5' y 3' del ADNc del rSIFN-co**

30 Mediante PCR pueden sintetizarse directamente dos semi-moléculas: el extremo 5' de 280 pb (fragmento I) y el extremo 3' de 268 pb (fragmento II) del ADNc del rSIFN-co. Entre el fragmento I y el fragmento II hay 41 pb que se solapan.

35 (1) Síntesis química de fragmentos oligodesoxinucleotídicos:

Oligómero A: SEC ID N° 5

5 ' ATGTGCGACCTGCCGCAGACCCACTCCCTGGGTAACCGTCGTGCTCTGATCCTGCTGGCTCA
GATGCGTCGTATCTCCCCGTTCTCCTGCCTGAAAGACCGTCACGAC3 '

40 Oligómero B: SEC ID N° 7

5 ' CTGAAAGACCGTCACGACTTCGGTTTCCCGCAGGAGAGGTTTCGACGGTAACCAGTTCCAGA
AGCTCAGGCTATCTCCGTTCTGCACGAAATGATCCAGCAGACCTTC3 '

45 Oligómero C: SEC ID N° 8

5 ' GCTGCTGGTACAGTTCGGTGTAGAATTTTTCCAGCAGGGATTTCGTCCCAAGCAGCGGAGGAG
TCTTTGGTGGAGAACAGGTTGAAGGTCTGCTGGATCATTTTC3 '

Oligómero D: SEC ID N° 9

5 ' ATCCCTGCTGGAAAAATTCTACACCGAACTGTACCAGCAGCTGAACGACCTGGAAGCTTGCG
50 TTATCCAGGAAGTTGGTGTGAAGAAACCCCGCTGATGAAC3 '

Oligómero E: SEC ID N° 10

5 ' GAAGAAACCCCGCTGATGAACGTTGACTCCATCCTGGCTGTAAAAAATACTTCCAGCGTAT
55 CACCCTGTACCTGACCGAAAAAATACTCCCCGTGCGCTTGGG3 '

Oligómero F: SEC ID N° 11

5 ' TTATTCTTTACGACGCAGACGTTTCCTGCAGGTTGGTGGACAGGGAGAAGGAACGCATGATTT
CAGCACGAACAACCTCCCAAGCGCACGGGGAGTATTTTTTTTTTCGGTCAGG3 '

- 5 PCR I para el Fragmento I: el Fragmento I de 280 pb se sintetizó, usando como molde el oligodesoxinucleótido B, y como cebadores el oligodesoxinucleótido A y C.
Mezcla de la PCR I (unidades: μ l)

| | |
|--|------------|
| Agua destilada esterilizada | 39 |
| Tampón 10xPfu (Stratagen American Ltd.) | 5 |
| Mezcla de dNTP (concentración de dNTP 2,5 mmol/l) | 2 |
| Cebador oligómero A (25 μ mol/l) | 1 |
| Cebador oligómero C (25 μ mol/l) | 1 |
| Molde oligómero B (1 μ mol/l) | 1 |
| Pfu ADN polimerasa (Stratagen American Ltd.) (25 U/ μ l) | 1 |
| Volumen total | 50 μ l |
| Ciclo PCR: 95 l | |

- 10 PCR II para el Fragmento II: el Fragmento II de 268 pb se sintetizó, usando como molde el oligodesoxinucleótido E, y como cebadores el oligodesoxinucleótido D y F

| Mezcla de la PCR II | (unidades: μ l) |
|--|---------------------|
| Agua destilada esterilizada | 39 |
| Tampón 10xPfu (Stratagen American Ltd.) | 5 |
| Mezcla de dNTP (concentración de dNTP 2,5 mmol/l) | 2 |
| Cebador oligómero D (25 μ mol/l) | 1 |
| Cebador oligómero F (25 μ mol/l) | 1 |
| Molde oligómero E (1 μ mol/l) | 1 |
| Pfu ADN polimerasa (Stratagen American Ltd.) (25 U/ μ l) | 1 |
| Volumen total | 50 μ l |
| Ciclo PCR: el mismo que para la PCR I | |

15 **Ensamblaje del ADNc del rSIFN-co**

Los fragmentos I y II se ensamblaron entre sí para constituir la secuencia molecular completa de ADNc del rSIFN-co usando el método de solapamiento y extensión por PCR. Las enzimas de restricción Nde I y Pst I se introdujeron para clonar la secuencia de ADNc del rSIFN-co en el plásmido.

- 20 (1) Cebadores para la síntesis química

Oligómero G: 5'ATCGGCCATATGTGCGACCTGCCGCAGACCC3' SEC ID N° 12

- 25 Oligómero H: 5'ACTGCCAGGCTGCAGTTATTCTTTACGACGCAGACGTTCC3' SEC ID N° 13

- (2) Solapamiento y extensión por PCR

| Mezcla de la PCR | (unidades: μ l) |
|---|---------------------|
| Agua destilada esterilizada | 38 |
| Tampón 10xPfu (Stratagen American Ltd.) | 5 |
| Mezcla de dNTP (concentración de dNTP 2,5 mmol/l) | 2 |
| Cebador G (25 μ mol/l) | 1 |
| Cebador H (25 μ mol/l) | 1 |
| *producción del fragmento I (1 μ mol/l) | 1 |
| *producción del fragmento II (1 μ mol/l) | 1 |
| Pfu ADN polimerasa (Stratagen American Ltd.) (2,5 U/ μ l) | 1 |
| Volumen total | 50 μ l |

*Separar y purificar la producción de la PCR con el kit de purificación de PCR StrataPrep producido por Stratagen American Ltd. y disolver en agua destilada esterilizada.
Ciclo PCR: el mismo que para la PCR I

Clonación génica de rSIFN-co y análisis de secuencia

Como vector de clonación se usó el plásmido pLac T7. El plásmido pLac T7 se reconstruyó con el plásmido pBluescript II KS(+) producido por Stratagen (Figura 3).

La producción de la PCR purificada del ADNc de rSIFN-co se realizó con el kit de purificación de PCR de StrataPrep. La digestión del ADNc y del plásmido pLac T7 se realizó con NdeI y PstI. Se procesó con electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se separaron estos fragmentos de ADN doblemente digeridos. Se recuperó el fragmento de ADN del rSIFN-co de 507 pb de longitud y el fragmento de ADN del plásmido de 2,9 kb. Se ligaron estos fragmentos mediante la ADN ligasa de T4 para formar un plásmido recombinante. Se transformaron células competentes DH_{5α} (Gibco) con el plásmido recombinante, se cultivaron a 37 °C durante una noche. Se identificaron las colonias recombinantes positivas y se denominaron PHY-1.

La secuenciación del ADN se procesó con el Kit de Secuenciación por Ciclos SequiTherm™ producido por American Epicentre Technologies Ltd usando L1-COR Modelo 4000L. Los cebadores son el cebador de secuencias T7 y T3 comunes, el resultado de la secuenciación del ADN coincide con el diseño teórico.

Purificar el rSIFN-co, la secuencia de aminoácidos del extremo N coincide con la secuencia de aminoácidos del extremo N del diseño experimental que es la siguiente:

N-Cys-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser-Leu-Gly-Asn-Arg-Arg-Ala-Ley (SEC ID N°: 14)

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

Construcción y transformación del vector de expresión

Digerir el vector de expresión pHY-4 de *E. coli* (véase la Figura 3) con Nde I para linealizar y posteriormente digerir con Xba I. Procesar con electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y purificar el fragmento de digestión con Nde I-Xba I de pHY-4 de 4,8 kb con el kit QIAEX II producido por QIAGEN Alemania Ltd.

Al mismo tiempo, el plásmido pHY-4 se digiere doblemente con Nde I-Xba I. Procesar con electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y purificar el fragmento de 715 pb. Ligar los fragmentos rSIFN-co y pHY-4 con la ADN ligasa de T4 para construir el plásmido recombinante (Véase la Figura 4). Transformar células competentes DH_{5α} con el plásmido recombinante. Dispersar las células transformadas sobre una placa con LB con Amp, cultivar a 37 °C durante una noche.

Exploración de cepas de clonación positivas

Seleccionar al azar colonias de *E. coli* de la placa anterior con LB, explorar las cepas positivas que contienen el vector recombinante mediante digestión con endonucleasas y análisis PCR. Denominar uno de los plásmidos recombinantes positivos como pHY-5, y denominar la cepa que contiene el plásmido pHY5 como PVIII. Amplificar y conservar la cepa positiva con glicerol a -80 °C.

Alta expresión del gen de rSIFN-co en *E. coli*

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

Sumario

El RSIFN-CO es una nueva molécula de interferón construida artificialmente de acuerdo con los aminoácidos conservativos de los interferones α humanos. Se ha confirmado como un fármaco eficaz contra la hepatitis. Para obtener suficiente proteína rSIFN-co pura, se construyó una cepa de *E. coli* recombinante estable que expresaba altamente la proteína rSIFN-co.

En primer lugar, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de rSIFN-co publicada, se usó el codón de *E. coli* para sintetizar todo el ADNc del rSIFN-co. Este fragmento de ADN se secuenció, confirmando que la secuencia de codones de 501 pb y la secuencia del codon de terminación TAA son válidas e idénticas a las del diseño teocrático. Un análisis posterior reveló que tanto la secuencia de aminoácidos del extremo N como los aminoácidos compuestos de rSIFN-co producidos por la cepa recombinante eran idénticas a la predicción.

El ADNc de rSIFN-co se clonó en el plásmido pHY-4 vector de alta expresión de *E. coli* para construir el plásmido recombinante pHY-5. La cepa LMG194 de *E. coli* se transformó posteriormente con el plásmido pHY-4 para obtener un transformante de alta expresión de rSIFN-co estable. Este transformante se cultivó durante 30 generaciones. La herencia del plásmido recombinante pHY-5 en la cepa LMG194 de *E. coli* fue normal y estable, y la expresión de rSIFN-co fue alta y estable.

La cepa LMG194 de *E. coli*, que contiene el plásmido pHY-5 recombinante, es realmente una cepa ideal modificada por ingeniería genética de alta expresión.

10 Referencias

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.
- 15 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*. 2^a 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 supl. 9):S9-63--S9-69.
- 20 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.
6. Klein ML, Bartley TD, Lai PH, *et al.* Structural characterization of recombinant consensus interferon-alpha. *Journal of Chromatography*, 1988; 454: 205-215.
- 25 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
9. All molecular cloning techniques used are from: Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2^a ed. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. 1989.
- 30 10. Guzman, L. M *et al.* Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 1995, 177: 4121~4130.

35 SECUENCIA DE ADNc de rSIFN-co DISEÑADA DE ACUERDO CON EL USO DE CODONES DE *E. COLI* Y SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA DE rSIFN-co

```

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 CCAGTTCAG AAAGCTCAGG CTATCTCCGT TCTGCACGAA
GTCCTTCTTA AGCTGCCATT GGTCAAGGTC TTTCGAGTCC 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

```

ES 2 528 218 T3

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 AAAAATTCTA 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 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 TATCACCTG TACCTGACCG AAAAAAATA CTCCCCGTGC
CAATTTTTTA TGAAGGTCGC 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 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

La secuencia de nucleótidos es la SEC ID N° 1 y la secuencia de aminoácidos es la SEC ID N° 2

5 EJEMPLO 2

Separación y purificación de rSIFN-co

1. Fermentación

10

Inocular la cepa recombinante en medio LB, agitar (200 rpm) a 37 °C durante una noche (aproximadamente 18 h), después añadir glicerol al 30 % al caldo de fermentación para obtener una concentración final de 15 %, distribuir a un tubo de 1 ml y conservar a -20 °C como semilla de producción.

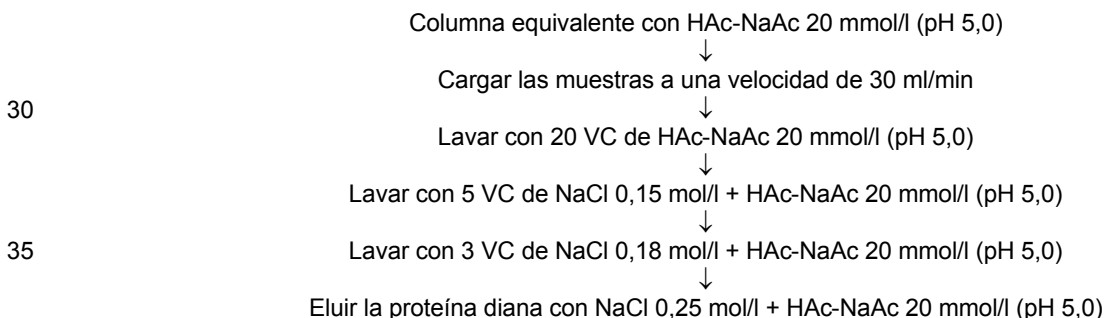
- 5 Añadir 1 % de la semilla al medio LB, agitar (200 rpm) a 37 °C durante una noche para aumentar la escala de la semilla, después añadir al medio RM con una proporción de 10 %, cultivar a 37 °C. Añadir arabinosa (solución al 20 %) al 0,02 % como un inductor cuando la DO600 alcanza aproximadamente 2,0. Cuatro horas después de esto, detener el proceso de cultivo, recoger las bacterias por centrifugación, resuspender el sedimento con tampón A, y conservar a -20 °C durante una noche. Descongelar y romper las bacterias mediante un homogeneizador, y después
- 10 centrifugar. Lavar el sedimento con tampón B, tampón C y agua destilada para obtener un cuerpo de inclusión relativamente puro.

2. Desnaturalización y renaturalización

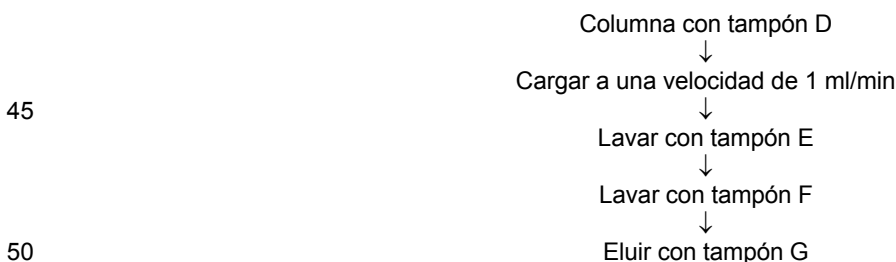
- 15 Disolver el cuerpo de inclusión en Guanidina-HCl (o urea) de 6 mol/l. La solución estará un poco turbia. Centrifugar a una velocidad de 10000 rpm. Determinar la concentración de proteína del sobrenadante. Este sobrenadante se denomina "solución de desnaturalización". Añadir la solución de desnaturalización al tampón de renaturalización, y mantener la concentración de proteína final a 0,3 mg/ml. Es mejor añadir la solución totalmente desnaturalizada en tres etapas en lugar de en una etapa. Mantener la solución durante una noche a 4 °C. Después de esto, dializar con
- 20 10 mol/l, 5 mol/l en tampón B y agua destilada, después ajustar su pH mediante HAc-NaAc 2 mol/l. Dejar reposar y después filtrar.

3. Purificación

- 25 Cromatografía de intercambio aniónico HS/M POROS



- 40 Sepharose™ de flujo rápido quelante: Añadir tampón PB de 0,2 mol/l (pH 6,6) y NaCl de 4 mol/l en la solución de HS para ajustar el pH de la solución a pH 6,0 y la concentración de NaCl a 1 mol/l.



Condensar la solución eluida mediante HS/M POROS. Algunas veces puede añadirse una etapa de purificación por sephacryl S-100 para cumplir con los requisitos de pureza más estrictos.

Observación:

- 55 Tampón A: Tris-HCl 100 mmol/l, pH 7,5-EDTA 10 mmol/l-NaCl 100mmol/l
 Tampón B: Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7,5-Urea 1 mol/l-EDTA 10 mmol/l-Triton X-100 al 0,5 %
 Tampón C: Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7,5-Urea 2 mol/l-EDTA 10 mmol/l-Triton X-100 al 0,5 %
 Tampón D: NaCl 1 mol/l --- Na₂HPO₄ 50 mmol/l (pH 5,5)
 60 Tampón E: NaCl 1 mol/l --- Na₂HPO₄ 50 mmol/l (pH 4,0)
 Tampón G: NaCl 1 mol/l --- Na₂HPO₄ 50 mmol/l (pH 3,6)

Tampón de renaturalización: Arginina 0,5 mol/l-Tris-HCl 150 mmol/l, pH 7,5-EDTA 0,2 mmol/l

65

| | |
|----------------------------------|--------------------|
| Medio LB: | 1 l |
| Triptona | 10 g |
| Extractos de levadura | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| Medio RM: | 1 l |
| Caseína | 20 g |
| MgCl | 1 mmol/l (0,203 g) |
| Na ₂ HPO ₄ | 4 g; |
| KH ₂ PO ₄ | 3 g, |
| NaCl | 0,5 g |
| NH ₄ Cl | 1 g |

5 Después de la purificación, el tampón se cambió a PBS (pH 7,0) junto con la etapa de condensación por HS/M POROS. Ésta se denomina “Solución Madre de Proteína”. Ésta puede usarse directamente en la preparación de inyecciones o pulverizaciones, o conservarse a 2-8 °C.

Fórmulas para inyección:

| | | |
|----------------------|------------|-------------------|
| | Solución | Polvo liofilizado |
| Solución de rSIFN-co | 34,5 mg/ml | 34,5 mg/ml |
| PB (pH 7,0) | 25 mmol/l | 10 mmol/l |
| Glicina | --- ---- | 0,4 mol/l |
| NaCl | 0.1 mol/l | ---- --- |

| | |
|---------------------|-----------|
| Para pulverización: | |
| EDTA | 0,01 % |
| Tween 80 | 0,05 % |
| Citrato trisódico | 10 mmol/l |
| Glicerol | 1,26 % |
| Cloruro de sodio | 0,03 % |
| Fenilmetanol | 0,5 % |
| HSA | 0,1 % |
| rSIFN-co | 10 µg/ml |

10 PROCESO DE CONTROL DE CALIDAD

Durante la purificación, se realizan ensayos con respecto al contenido de proteínas, pureza de proteínas, actividad específica y pirógenos después de cada etapa. Cuando se obtiene la solución madre, todos los ensayos enumerados en la tabla se realizan uno después del otro.

15

La calidad del producto se controla de acuerdo con los “Requisitos Chinos para Productos Biológicos”.

1. Solución proteica original

20

Lowry

| Artículo de Ensayo | Método |
|--|--|
| Solución Madre de Proteínas: | |
| Ensayo con respecto a Contenido de Proteínas | Lowry |
| Ensayo con respecto a Pureza de Proteínas | Análisis de HPLC de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico) no reductor |
| Ensayo con respecto a Pesos Moleculares | SDS-PAGE Reductor |
| Ensayo con respecto a Actividad Específica | De acuerdo con el Método en “Ensayo de Actividad Específica de Interferón” |
| Ensayo con respecto a ADN Exogenético Residual | Usando Kit de Marcaje y Detección de ADN |
| Ensayo con respecto a Actividad de Antibióticos Residuales | De acuerdo con el Método en “Métodos de Ensayo Químicos y Otros para Productos Biológicos” |
| Ensayo con respecto a Endotoxina Bacteriana | De acuerdo con el Método en “Requisitos para el Ensayo de Endotoxina Bacteriana de Productos Biológicos” |

| | |
|--|--|
| Ensayo con respecto a Punto Isoeléctrico | Electroforesis de Isoelectroenfoque |
| Ensayo para Identificar Características de la Proteína | Espectro de UV (intervalo de longitud de onda: 190-380 nm) |
| | Mapeo Peptídico (hidrolizado por enzima pancreática, analizado por columna de C-18) |
| | Ensayo de Secuencia N terminal |
| | Ensayo de Secuencia C terminal |
| | Dicroísmo Circular |
| | Análisis de Aminoácidos |
| Producto semi-finalizado | |
| Ensayo con respecto a Endotoxina Bacteriana | De acuerdo con el Método en "Requisitos para el Ensayo de Endotoxina Bacteriana de Productos Biológicos" |
| Producto | |
| Comprobación de Apariencia | |
| Producto Químico | De acuerdo con el Método en "Métodos de Ensayo Químicos y Otros para Productos Biológicos" |
| Ensayo con respecto a Actividad Específica | De acuerdo con el Método en "Ensayo de Actividad Específica de Interferón" |
| Ensayo de Esterilidad | De acuerdo con el Método en "c" |
| Ensayo de Toxicidad Anómala | Ensayo en Ratón |
| Ensayo de Pirógenos | De acuerdo con el Método en "Requisitos para el Ensayo de Pirógenos de Productos Biológicos" |
| Ensayo para Estabilidad del Producto | |
| Nota: "Métodos de Ensayo Químico y Otros para Productos Biológicos", "Requisitos para el Ensayo de Pirógenos de Productos Biológicos" y "Requisitos para el Ensayo de Endotoxinas Bacterianas de Productos Biológicos" pueden encontrarse todos en los "Requisitos Chinos para Productos Biológicos". "Requisitos Chinos para Productos Biológicos", PAN Zhengan, ZHANG Xinhui, DUAN Zhibing, <i>et al.</i> Comité para la Normalización de Productos Biológicos Chinos. Publicado por Chemical Industry Publishing Company, 2000. | |

EJEMPLO 3**Estabilidad de polvo liofilizado de inyección de supercompuesto de interferón Recombinante**

5 Los experimentos de estabilidad se llevaron a cabo con muestras de polvo liofilizado de supercompuesto de interferón recombinante (rSIFN-co) en dos especificaciones y tres lotes. Los experimentos comenzaron en abril de 2000.

10 1. Fuente de las muestras

Las muestras se proporcionaron por Sichuan Huiyang Life-engineering Ltd., Provincia de Sichuan. Lote: 990101-03, 990101-05, 990102-03, 990102-05, 990103-03, 990103-05

15 2. Especificaciones de las muestras

Cada muestra en este experimento debería cumplir los requisitos de la siguiente tabla.

Tabla 1 Patrón de Muestras en el Experimento

| Artículos | Patrones |
|-------------------------|--|
| 1. Apariencia | polvo blanco suelto |
| 2. Tiempo de Disolución | disolver rápidamente en agua para inyección (en un periodo de 2 minutos) a temperatura ambiente |
| 3. Claridad | líquido incoloro o con algo de brillo parecido a la leche; no debería ser turbio, con impurezas o con depósito imperceptible |
| 4. valor del pH | 6,5-7,5 |
| 5. Potencia (UI/dosis) | 80 %-150 % de la cantidad indicada (9 µg: 4,5 x 10 ⁶ UI, 15 µg: 7,5 x 10 ⁶ UI) |
| 6. Humedad | no más del 3,0 % (P/P) |

3. Contenido experimental

5 Muestras de ensayo a 2-8 °C: las muestras de ensayo se pusieron en un frigorífico a 2-8 °C, después los artículos anteriores de estas muestras se ensayaron respectivamente en el 1^{er}, 3^{er}, 6^o, 9^o, 12^o, 18^o, 24^o, 30^o, 36^o mes. Los resultados se registraron.

10 Muestras de ensayo a 25 °C: las muestras de ensayo se pusieron en un termostato a 25 °C, después los artículos anteriores de estas muestras se ensayaron respectivamente en el 1^{er}, 3^{er}, 6^o, 9^o, 12^o, 18^o, 24^o, 30^o mes. Los resultados se registraron.

15 Muestras de ensayo a 37 °C: las muestras de ensayo se pusieron en un termostato a 37 °C, después los artículos anteriores de estas muestras se ensayaron respectivamente en el 1^{er}, 3^{er}, 6^o, 9^o, 12^o, 18^o, 24^o mes. Los resultados se registraron.

4. Resultados y conclusión

20 1) A 37 °C, de acuerdo con los datos recogidos en los puntos designados durante el ensayo y comparados con los datos antes del ensayo, la potencia comenzó a descender desde el 6^o mes y los cambios en los tres lotes fueron similares. La apariencia de otros artículos no tuvo cambios.

25 2) A 25 °C, de acuerdo con los datos recogidos en puntos designados durante el ensayo y comparados con los datos antes del ensayo, la potencia tuvo solamente un cambio pequeño, y los cambios en los tres lotes fueron similares. La apariencia de otros artículos no tuvo cambios.

30 3) A 2-8 °C, de acuerdo con los datos recogidos en puntos designados durante el ensayo y comparados con los datos antes del ensayo, la potencia de los tres lotes fueron todas estables. La apariencia de otros artículos tampoco tuvo ningún cambio.

En conclusión, se sugiere que el polvo liofilizado de supercompuesto de interferón recombinante para inyección debería almacenarse mejor y transportarse a temperaturas bajas. Sin dichas condiciones, el producto también puede almacenarse durante periodos cortos (es decir, 3 meses) a temperatura ambiente.

35 EJEMPLO 3.5

Diagrama de flujo de producción de rSIFN-co

40 1. Producción

1.1 Fermentación

45 Mezcla de uso de LB+M9 como medio de cultivo. La cantidad de inóculos será del 1,5 %. Agitar a DO600=0,4 (aproximadamente 3,5 horas) a 32 °C, después elevar la temperatura a 42 °C. Continuar la agitación durante otras 6 horas, la expresión de rSIFN-CO alcanzará el nivel máximo. El examen con exploración del gel resultante de SDS-PAGE muestra que el nivel de expresión es hasta el 57 %, que es el mayor patrón en China.

1.2 Purificación

50 Centrifugar la solución de bacterias para recoger el sedimento bacteriano

↓

Lavado de solución salina fisiológica dos veces (2)

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

5 ↓ Precipitar la solución de tampón y lavar varias veces hasta que el color se vuelva blanco puro

↓ Usar Guanidina HCl 7 M para desnaturalizar

↓ Diluir la Guanidina HCl para renaturalizar, mantener durante una noche

10 ↓ Usar Sephadex G25 para desalinizar

↓ Usar NaCl 0,1 M para aplicar CM-Sepharose

15 ↓ Realizar elución por etapas para recoger el pico activo

↓ Después de desalinizarse el pico activo, aplicar a columna con carga positiva de HPLC

20 ↓ Usar NaCl 0,1 M para realizar elución por etapas, recoger el pico activo que es el producto de rSIFN-co

↓ Añadir vehículo de protección y agente de liofilización. Separar los materiales liofilizados (rSIFN-co)

25 Se muestra que la pureza del producto (rSIFN-co) de este procedimiento de producción es del 95 % con el ensayo de SDS-PAGE en el que el peso molecular es de 14,5 Kda. La HPLC de fase inversa muestra un único pico y la pureza es de hasta el 97 %. Su actividad específica es de hasta 1×10^9 UI/mg de proteína.

1.3 Envasado e inspección

30 Después de la purificación de HPLC, se añade albúmina de suero humano 2 %, sacarosa 1 % y glucosa 1 % al rSIFN-co. Se separa después y se liofiliza en muestra para inyección. Cuando se ensayó con el sistema de inspección Wish-VVS, el resultado fue de $4,5 \times 10^8$ UI. Cuando se ensayó con inspección aséptica e inspección de pirógenos con el requisito convencional de China, los resultados fueron negativos. Este resultado cumple los requisitos para inyección IV.

35 2. Control de calidad

2.1 Características biológicas

40 (1) Cuando se usa LB+M9 para cultivar bacterias, las características deberían coincidir con las características típicas de bacterias *E. coli*. No se detectaron otras bacterias.

(2) Cuando se extiende para tinción de Gram y se inspecciona bajo un microscopio, es negativo para bacterias.

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

45 (4) La inspección con microscopio electrónico muestra características típicas de bacterias *E. coli*. No se detectó ningún micoplasma, espora de virus u otros contaminantes microscópicos.

(5) El ensayo de reacción bioquímica muestra características de bacterias *E. coli*.

2.2 Control de calidad de la expresión de interferón

50 (1) La expresión de interferón (cultivado en una plataforma con agitación) coincide con la cantidad de expresión en las bacterias del aporte original.

(2) Cuando se ensaya con suero antiinterferón, se muestra una reacción.

(3) Inspección de plásmidos: el producto de digestión de restricción coincidió con el plásmido original.

2.3 Producto de cepa bacteriana

55 El producto de cepa bacteriana indica la muestra de ensayo de la cepa bacteriana original que se produjo a partir de los procedimientos mostrados en 1.2.

60 El producto de cepa bacteriana debería inspeccionarse de la siguiente manera para asegurarse de que no haya derivación: usar LB para sembrar 2-3 trozos 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. Usar solamente el que muestre el mayor porcentaje para que sea el producto de cepa bacteriana.

2.4 Inóculo

5 El inóculo indica el producto de cepa bacteriana elegido después de la fermentación. La cantidad, el tiempo de cultivo y el valor de DO más apropiado del inóculo pueden decidirse según la cepa bacteriana. Debería aplicarse un procedimiento antibacterias contaminantes para cualquier inóculo que se produzca.

2.5 Cultivo de cepa bacteriana

10 El cultivo de la cepa bacteriana debería realizarse en un ambiente de habitación sin bacterias en el que no se cultiva más de una bacteria en la misma habitación. Se usará el mismo medio de cultivo tanto para la cepa bacteriana como para el inóculo. El usado en rSIFN-co es LB.

2.6 Fermentación

- 15 (1) La fermentación tiene lugar solamente en una habitación de fermentación limpia con un único ambiente 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. Después, el recipiente debería congelarse para alcanzar la temperatura apropiada para el inóculo.
 20 (3) Evitar usar antibióticos que podrían afectar al crecimiento celular en el medio de cultivo.
 (4) Los parámetros de fermentación como temperatura, valor de pH, oxígeno disuelto y tiempo requerido podrían variarse de acuerdo con diferentes tipos de cepas bacterianas.

2.7 Colección de bacterias

- 25 (1) Centrifugar la solución de bacterias para recoger bacterias o usar otro método. Todos los aparatos deberían limpiarse antes y después del funcionamiento. La solución residual debería secarse después del procedimiento de limpieza.
 30 (2) Las bacterias deberían mantenerse a 4-8 °C si se van a dividir en un periodo de 24 horas. En caso contrario, deberían mantenerse a -30 °C. Las que se mantienen en dichas condiciones pueden usarse en un periodo de 6 meses.

2.8 Lisis de células bacterianas

- 35 (1) Usar una solución de tampón apropiada para equilibrar la cepa bacteriana. Puede realizarse lisis celular por métodos físicos, químicos o biológicos. Usar la centrifuga para precipitar las bacterias y aplicar soluciones de limpieza.
 40 (2) Si se usa el método químico para dividir células, no deberían usarse soluciones perjudiciales para seres humanos.

2.9 Purificación

- 45 (1) La purificación eliminará la mayoría de los contenidos distintos de interferón. En el proceso de purificación, no deberían encontrarse materiales tóxicos si se añaden elementos extra.
 (2) Si se usa cromatografía de afinidad de anticuerpos para purificación, debería haber una indicación de la fuente y el grado de pureza. Además, debería realizarse una inspección de IgG de baja calidad.
 (3) Durante el proceso de purificación, la eliminación del pirógeno es crítica. Todos los aparatos deberían comprobarse para eliminar esta interferencia.
 50 (4) El interferón altamente concentrado se conoce como "producto intermedio". Después de la inspección y los ensayos, añadir albúmina para elevar la concentración al 2 % que se conoce ahora como "producto intermedio de albúmina". Después del examen y los ensayos, debería mantenerse a -30 °C y nunca descongelarse antes de su uso. Este producto debería usarse en un periodo de 6 meses.
 55 (5) La albúmina que se usa en este proceso debería también cumplir los ensayos y requisitos tales como: negatividad en inspección de RBSAG y una indicación de la relación entre monómero, dímero y polímero.

2.10 Producción en producto de tubo

- 60 (1) Filtración: usar una membrana de 0,22 µm para filtrar las bacterias. El producto debería manipularse con técnicas asépticas. Las muestras deberían tomarse para ensayar el valor del interferón.
 (2) Dilución: diluir el producto intermedio de albúmina con diluyente al 2 %. No debería añadirse conservante. El producto puede liofilizarse después de la inspección aséptica y la inspección de pirógenos.

2.11 Liofilización

65 La liofilización no debería afectar a la actividad del interferón, y se mantendrá el contenido de agua de dicho producto de liofilización.

2.12 Inspección

Se realizan dos tipos de rSIFN-co. Uno es para inyección y el otro para uso tópico. Las especificaciones para 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 sin bacterias. El producto final del tipo de inyección mostrará solamente producto liofilizado. El producto intermedio en el tipo tópico muestra solamente interferón purificado. El producto final del tipo tópico muestra solamente productos liofilizados formados en líquido envasados por separado.

10 2.13 Envasado

Hay diferente envasado para el tipo de inyección y el tipo tópico.

15 2.14 Almacenamiento

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

2.15 Caducidad

20 El periodo de caducidad es de dos (2) años después del procedimiento de liofilización para productos liofilizados. El periodo de caducidad es de 6 meses después del envasado individual para productos líquidos.

EJEMPLO 425 **El rSIFN-co inhibe la duplicación de ADN del VHB y la secreción de HBsAg y HBeAg.***Materiales*

30 Disolvente y Método de Distribución: añadir 1 ml de solución salina a cada frasco, disolver y mezclar con medio de cultivo MEM a concentraciones diferentes. Mezclar al momento.

Fármacos de control: IFN- α 2b (Intrón A) como polvo liofilizado, obtenido de Schering Plough. 3×10^6 U de cada uno, mezclar con 3×10^6 UI/ml con medio de cultivo; Infergen[®] (solución líquida), obtenido de Amgen, 9 μ g, 0,3 ml cada uno, igual a 9×10^6 UI y mezclar con 9×10^6 UI/ml de medio de cultivo conservado a 4 °C; célula 2.2.15: línea celular 2.2.15 de hepatoma (Hep G2) clonada y transfectada por ADN del VHB, construida por el Centro Médico Mount Sinai.

35 Reactivo: polvo de MEM, suero de sangre fetal de vaca Gibco American Ltd., G-418 de HycloneLab American Ltd. (Geneticina); distribución de MEM, Gibco American Ltd.; L-Glutamilo, importado y envasado por JING KE Chemical Ltd.; caja de radioinmunoensayo de fase sólida de HBsAg y HBeAg, Northward Reagent Institute of Chinese Isotope Ltd.; Biograncetina, Northern China Medicine; y Lipofectina, Gibco American Ltd.

40 Productos y equipamiento experimentales: frasco de cultivo, Tunclon[™] de Dinamarca; placa de cultivo de 24 pocillos y 96 pocillos, Corning American Ltd.; caja de cultivo de Dióxido de Carbono, Shel-Lab American Ltd.; medio de cultivo MEM 100 ml: suero de sangre fetal de vaca 10 %, 3 % de Glutamilo 1 %, G418 380 μ g/ml, biograncetina 50 U/ml.

Método:

50 Cultivo de células 2.2.15: añadir enzima pancreática 0,25 % a la caja de cultivo llena de células 2.2.15, digerir a 37 °C durante 3 minutos y añadir medio de cultivo para detener la digestión y agitarlo para dispersar las células, reproducir con relación de 1:3. Alcanzarán crecimiento completo en 10 días.

55 Ensayo de toxicidad: establecer grupos de diferentes concentraciones y un grupo de control en el que no se aplica medicina a las células. Digerir células, y distribuir a una solución de 100.000 células/ml. Inocular en una placa de cultivo de 96 pocillos, 200 μ l cada pocillo, cultivar a 37 °C durante 24 h con CO₂ al 5 %. Ensayar cuando crece una monocapa celular.

60 Distribuir rSIFN-co a una solución $1,8 \times 10^7$ UI/ml, después preparar una serie de soluciones diluidas en gradientes dobles. Añadir a la placa de cultivo de 96 pocillos, 3 pocillos por concentración. Cambiar la solución cada 4 días. Ensayar el efecto citopático por microscopio después de 8 días. Destrucción completa como 4, 75 % como 3, 50 % como 2, 25 % como 1, cero como 0. Calcular el promedio de lesión celular y tasa de inhibición de diferentes concentraciones. Calcular la CT50 y CT0 de acuerdo con el método de Reed Muench.

$$CT50 = \text{Antilog} \left(B + \frac{50 - B}{A - B} \times C \right)$$

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

5
10
15
Ensayo de inhibición para HBeAg y HBsAg: separar en grupos de contraste de HBeAg y HBsAg positivos y negativos, grupos de contraste celular y grupos de concentración de medicina. Inocular 700.000 células/ml de células 2.2.15 en una placa de cultivo de 6 pocillos, 3 ml cada pocillo, cultivar a 37 °C durante 24 h con CO₂ al 5 %, después preparar 5 soluciones diluidas en gradiente siendo el grado triple (preparar 5 soluciones, cada una con una concentración de proteínas 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 x 10⁶ UI/ml, 1,5 x 10⁶ UI/ml, 0,5 x 10⁶ UI/ml, 0,17 x 10⁶ UI/ml y 0,056 x 10⁶ UI/ml, 1 pocillo por concentración, cultivar a 37 °C durante 24 h con CO₂ al 5 %. Cambiar las soluciones cada 4 días usando la misma solución. Recoger todo el medio de cultivo el 8º día. Conservar a -20 °C. Repetir el ensayo 3 veces para estimar HBsAg y HBeAg con caja de radioinmunoensayo de fase sólida (Northward Reagent Institute of Chinese Isotope Ltd.). Estimar el valor de cpm de cada pocillo con una máquina de recuento γ .

20
Cálculo de los efectos: calcular el valor medio de cpm de los grupos de contraste y grupos de concentración diferente y su desviación típica, valor P/N tal como tasa de inhibición, CI50 y SI.

1)

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

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

2) Contar la concentración de media eficacia de la medicina

$$CI50 \text{ de inhibición del antígeno} = \text{Antilog} \left(B + \frac{50 - B}{A - B} \times C \right)$$

30
A=log >50 % de concentración de medicina, B=log <50 % de concentración de medicina, C=log de concentración de dilución

3) SI del efecto de rSIFN-co con cambio de conformación de espacio intermedio en HBsAg y HBeAg en el cultivo de células 2.2.15:

$$SI = \frac{CT50}{CI50}$$

35
4) Estimar las diferencias en cpm de cada grado de dilución del grupo de control usando ensayo de t de student

40
45
Transferencia de Southern: (1) extracto de ADN del VHB en células 2.2.15: cultivar las células 8 días. Medio de cultivo de extracción (Separar células del medio de cultivo por medio de drenaje del medio de cultivo). Añadir tampón de lisis para romper las células, después extraer dos veces con una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (1:1:1), centrifugar a 10.000 g. Recoger el sobrenadante añadiendo alcohol anhídrido para depositar el ácido nucleico. Extraer al vacío, redissolver en 20 μ l de tampón TE. (2) Electroforesis: añadir tampón de carga de ADN 6X, electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, IV/cm, a presión fija durante 14-18 h. (3) Desnaturalización e hibridación: sumergir respectivamente gel en HCl, tampón de desnaturalización y tampón de neutralización. (4) Transmembrana: realizar una transferencia ordenada de ADN a una membrana Hybond-N. Cocer, hibridar y exponer con hibridación de transferencia puntual. Explorar y analizar la densidad relativa con software gel-pro. Calcular la tasa de inhibición y CI50.

Resultados

50
55
Los resultados de las Tablas 4.1, 4.2 y 4.3 muestran: después de cultivar con exposición a máxima concentración inocua durante 8 días con células 2.2.15, el máximo es de 9,0 \pm 0 x 10⁶ UI/ml, la tasa de inhibición media de concentración inocua máxima de rSIFN-co para HBeAg es de 46,0 \pm 5,25 % (P<0,001), la CI50 es de 4,54 \pm 1,32 X 10⁶ UI/ml, SI es de 3,96; la tasa para HBsAg es de 44,8 \pm 6,6 %, la CI50 es de 6,49 \pm 0,42 x 10⁶ UI/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 e Infergen® no pueden. También se ha demostrado en la clínica que el rSIFN-co puede reducir HBeAg y HBsAg o devolverlos a niveles normales.

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

| Primer lote: (rSIFN-co) | | | | | | | | | | | |
|--|----------------|-----------------|----------------|--------------------|-----------------|----------------|--------------------------|-------------|---------------|------------------------------|--|
| Efecto de inhibición para HBeAg | | | | | | | | | | | |
| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | Tasa de inhibición acumulada | |
| | | | | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | | | | | |
| 900 | 9026 | 8976 | 10476 | 0,436227 | 0,43935 | 0,345659 | 0,407079 | 0,945909 | 0,592921 | 0,614693546 | |
| 300 | 9616 | 12082 | 10098 | 0,3993754 | 0,245347 | 0,369269 | 0,337997 | 0,5388299 | 1,254924 | 0,300392321 | |
| 100 | 9822 | 16002 | 12800 | 0,386508 | 0,0005 | 0,2005 | 0,195836 | 0,200833 | 2,059088 | 0,08867188 | |
| 33,33333 | 15770 | 19306 | 16824 | 0,014991 | 0 | 0 | 0,004997 | 0,0049969 | 3,054091 | 0,001633453 | |
| 11,11111 | 19172 | 22270 | 18934 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,054091 | 0 | |
| Control | Células | 16010 | | Blanco | 0 | | Dilución | 3 | Cl50 | 602,74446016 | |
| Efecto de la inhibición para HBsAg | | | | | | | | | | | |
| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | Tasa de inhibición acumulada | |
| | | | | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | | | | | |
| 900 | 7706 | 7240 | 7114 | 0,342155 | 0,381936 | 0,392693 | 0,372261 | 0,922258 | 0,627739 | 0,595006426 | |
| 300 | 8856 | 7778 | 9476 | 0,2439816 | 0,336008 | 0,191053 | 0,257014 | 0,5499972 | 1,370724 | 0,286349225 | |
| 100 | 10818 | 10720 | 10330 | 0,07649 | 0,084856 | 0,118149 | 0,093165 | 0,292983 | 2,27756 | 0,113977019 | |
| 33,33333 | 10744 | 11114 | 10570 | 0,082807 | 0,051221 | 0,097661 | 0,07723 | 0,1998179 | 3,20033 | 0,058767408 | |
| 11,11111 | 10672 | 9352 | 10810 | 0,088953 | 0,201639 | 0,077173 | 0,122588 | 0,122588 | 4,077742 | 0,02918541 | |
| Control | Células | 11714 | | Blanco | 0 | | Dilución | 3 | Cl50 | 641,7736749 | |
| Segundo lote: (rSIFN-co) | | | | | | | | | | | |
| Efecto de la inhibición para HBeAg | | | | | | | | | | | |

| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | Tasa de inhibición acumulada |
|--|----------------|-----------------|----------------|--------------------|-----------------|----------------|--------------------------|-------------|---------------|------------------------------|
| | | | | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | | | | |
| 900 | 7818 | 8516 | 9350 | 0,554378 | 0,514592 | 0,467054 | 0,512008 | 1,371181 | 0,487992 | 0,737521972 |
| 300 | 10344 | 10628 | 9160 | 0,4103967 | 0,394209 | 0,477884 | 0,427497 | 0,8591731 | 1,060996 | 0,447563245 |
| 100 | 12296 | 14228 | 13262 | 0,299134 | 0,18901 | 0,244072 | 0,244072 | 0,4316522 | 1,816423 | 0,19201839 |
| 33,33333 | 15364 | 17414 | 16188 | 0,124259 | 0,00741 | 0,77291 | 0,069653 | 0,1876045 | 2,74677 | 0,063933386 |
| 11,11111 | 17386 | 13632 | 15406 | 0,009006 | 0,222982 | 0,121865 | 0,117951 | 0,117951 | 3,628819 | 0,03148073 |
| Control | Células | 16962 | | Blanco | 0 | | Dilución | 3 | C150 | 365,9357846 |
| Efecto de la inhibición para HBsAg | | | | | | | | | | |
| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | 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 | 1,207967 | 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 | Células | Blanco | 0 | Dilución | 0 | Dilución | 3 | C150 | 611,0919568 | |
| Tercer lote: (rSIFN-co) | | | | | | | | | | |
| Efecto de la inhibición para HBeAg | | | | | | | | | | |
| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | 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 | 0,172691621 |
| 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 | 0,07275 1 | 0,0055615 | 0,055615 | 3,683017 | 0,014875633 |
| Control | Células | 17544 | Blanco | 0 | 0 | Dilución | 3 | IC50 | | 382,0496935 |
| Efecto de la inhibición para HBsAg | | | | | | | | | | |
| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Tasa de inhibición | | | Tercer pocillo | Tasa de inhibición media | | | Acumulación | 1-Acumulación | Tasa de inhibición acumulada |
| | Primer pocillo | Segundo pocillo | Primer pocillo | | Segundo pocillo | Tercer pocillo | | | | |
| 900 | 5616 | 6228 | 5346 | 0,496864 | 0,442035 | 0,52105 4 | 0,486651 | 0,763125 | 0,513349 | 0,597838293 |
| 300 | 8542 | 8590 | 7096 | 0,234725 | 0,230425 | 0,36427 2 | 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 | 0 | 0 |
| 11,11111 | 13142 | 12336 | 13342 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,236875 | 0 |
| Control | Células | 11528 | Blanco | 0 | 0 | Dilución | 3 | IC50 | | 694,7027149 |
| HBeAg: CI50 media: 450,2434, DT: 132,315479 HBsAg: CI50 media: 649,1894, DT: 42,29580 | | | | | | | | | | |

Tabla 4.2 Resultados de la tasa de inhibición del intrón A (IN- α 2b) para HBsAg y HBeAg
Efecto de la inhibición para HBeAg

| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | Tasa de inhibición acumulada |
|--|----------------|-----------------|----------------|--------------------|-----------------|----------------|--------------------------|-------------|---------------|------------------------------|
| | | | | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | | | | |
| 300 | 14918 | 11724 | 9950 | 0 | 0,029711 | 0,176529 | 0,068747 | 0,068747 | 0,931253 | 0,068746724 |
| 100 | 14868 | 16890 | 15182 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,931253 | 0 |
| 33,33333 | 16760 | 21716 | 16400 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,931253 | 0 |
| 11,11111 | 20854 | 15042 | 16168 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3,931253 | 0 |
| 3,703704 | 12083 | 12083 | 12083 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,931253 | 0 |
| Control | Células | 17544 | | Blanco | 0 | | Dilución | 3 | CI50 | FALSO |
| Efecto de la inhibición para HBsAg | | | | | | | | | | |
| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | Tasa de inhibición acumulada |
| | | | | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | | | | |
| 300 | 9226 | 8196 | 9658 | 0,152489 | 0,247106 | 0,521054 | 0,1708 | 0,189295 | 0,8292 | 0,185857736 |
| 100 | 10946 | 10340 | 10828 | 0 | 0,050156 | 0,364272 | 0,018495 | 0,0184947 | 1,810705 | 0,010110817 |
| 33,33333 | 12250 | 12980 | 13934 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,810705 | 0 |
| 11,11111 | 12634 | 12342 | 12000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3,810705 | 0 |
| 3,703704 | 10886 | 10886 | 10886 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,810705 | 0 |
| Control | Células | 10886 | | Blanco | 0 | | Dilución | 3 | CI50 | FALSO |

Tabla 4.3 Resultados de la tasa de inhibición de Inergen® para HBsAg y HBeAg

| Primer lote: (Inergen®) | | | | | | | | | | | |
|--|----------------|-----------------|----------------|--------------------|-----------------|----------------|--------------------------|-------------|---------------|------------------------------|--|
| Efecto de la inhibición para HBeAg | | | | | | | | | | | |
| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | Tasa de inhibición acumulada | |
| | | | | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | | | | | |
| 900 | 14172 | 12156 | 17306 | 0,091655 | 0,220869 | 0 | 0,104175 | 0,306157 | 0,895825 | 0,254710274 | |
| 300 | 13390 | 12288 | 16252 | 0,1417767 | 0,212409 | 0 | 0,118062 | 0,2019827 | 1,777764 | 0,102024519 | |
| 100 | 14364 | 18834 | 14194 | 0,079349 | 0 | 0,090245 | 0,056531 | 0,083921 | 2,721232 | 0,029916678 | |
| 33,33333 | 15722 | 16034 | 16340 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0273897 | 3,721232 | 0,007306592 | |
| 11,11111 | 17504 | 17652 | 14320 | 0 | 0 | 0,082169 | 0,02739 | 0,02739 | 4,693843 | 0,005801377 | |
| Control | Células | 15602 | | Blanco | 0 | | Dilución | 3 | CI50 | FALSO | |
| Efecto de la inhibición para HBsAg | | | | | | | | | | | |
| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | Tasa de inhibición acumulada | |
| | | | | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | | | | | |
| 900 | 12080 | 11692 | 12234 | 0 | 0,01275 | 0 | 0,00425 | 0,025163 | 0,99575 | 0,029697111 | |
| 300 | 12840 | 11484 | 12350 | 0 | 0,030313 | 0 | 0,010104 | 0,0209125 | 1,985646 | 0,010422073 | |
| 100 | 12894 | 14696 | 15086 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,010808 | 2,985646 | 0,003606955 | |
| 33,33333 | 15032 | 12928 | 13020 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0108081 | 3,985646 | 0,002704416 | |
| 11,11111 | 11794 | 11984 | 11508 | 0,004137 | 0 | 0,028287 | 0,010808 | 0,010808 | 4,974837 | 0,002167838 | |
| Control | Células | 11843 | | Blanco | 0 | | Dilución | 3 | CI50 | FALSO | |
| Segundo lote: (Inergen®) | | | | | | | | | | | |
| Efecto de la inhibición para HBeAg | | | | | | | | | | | |

| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | Tasa de inhibición acumulada |
|--|----------------|-----------------|----------------|--------------------|-----------------|----------------|--------------------------|-------------|---------------|------------------------------|
| | | | | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | | | | |
| 900 | 6278 | 6376 | 6408 | 0,200051 | 0,187564 | 0,183486 | 0,190367 | 0,274635 | 0,809633 | 0,253290505 |
| 300 | 7692 | 9092 | 6394 | 0,0198777 | 0 | 0,18527 | 0,068383 | 0,0942678 | 1,74125 | 0,046161005 |
| 100 | 8960 | 7474 | 8190 | 0 | 0,047655 | 0 | 0,015885 | 0,015885 | 2,725365 | 0,005794856 |
| 33,33333 | 8530 | 8144 | 9682 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3,725365 | 0 |
| 11,11111 | 7848 | 7848 | 7848 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,725365 | 0 |
| Control | Células | 7848 | | Blanco | 0 | | Dilución | 3 | C150 | FALSO |
| Efecto de la inhibición para HBsAg | | | | | | | | | | |
| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | 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 | Células | 12828 | | Blanco | 0 | | Dilución | 3 | C150 | FALSO |
| Tercer lote: (Infergen®) | | | | | | | | | | |

| Efecto de la inhibición para HBeAg | | | | | | | | | | |
|--|----------------|-----------------|----------------|--------------------|-----------------|----------------|--------------------------|-------------|---------------|------------------------------|
| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | 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 | 0,0050818 | 3,782601 | 0,001341671 |
| 11,11111 | 7740 | 7740 | 7740 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4,782601 | 0 |
| Control | Células | 7740 | | Blanco | 0 | | Dilución | 3 | CI50 | FALSO |
| Efecto de la inhibición para HBsAg | | | | | | | | | | |
| Concentración (x10 ⁴ UI/ml) | Primer pocillo | Segundo pocillo | Tercer pocillo | Tasa de inhibición | | | Tasa de inhibición media | Acumulación | 1-Acumulación | 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 | Células | 11602 | | Blanco | 0 | | Dilución | 3 | CI50 | FALSO |
| HBeAg: CI50 media: 0 DT: 0 | | | | | | | | | | |
| HBsAg: CI50 media: 0 DT: 0 | | | | | | | | | | |

EJEMPLO 5**Preparación de rSIFN-co**

5 Preparación de inyección liofilizada

| | Solución Madre de rSIFN-co | Polvo liofilizado |
|--|----------------------------|-------------------|
| | PB (pH 7,0) | 34,5 µg/ml |
| | Glicina | 10 mmol/l |
| | | 0,4 mol/l |

10 Técnica de preparación: pesar materiales según la receta. Disolver con agua estéril y sin pirógenos. Filtrar a través de una membrana de 0,22 µm para desbacterializar, conservar a 6-10 °C. Rellenar frascos después de confirmar que son estériles y sin pirógenos, 0,3 ml/frasco o 0,5 ml/frasco, y liofilizar en un liofilizador.

Preparación de inyección líquida

| | Solución Madre de rSIFN-co | Solución |
|--|----------------------------|------------|
| | PB (pH 7,0) | 34,5 µg/ml |
| | NaCl | 25 mmol/l |
| | | 0,1 mol/l |

15 Preparación: pesar materiales según la receta. Añadir hasta el nivel deseado agua estéril y sin pirógenos. Filtrar a través de una membrana de 0,22 µm para desbacterializar, conservar a 6-10 °C. Llenar un frasco hermético después de confirmar que es estéril y sin pirógenos a 0,3 ml/frasco o 0,5 ml/frasco. Almacenar a 2-10 °C, y proteger de la luz.

EJEMPLO 6

20

Toxicidad aguda de rSIFN-co

25 Tratar ratones con una dosis grande (150 µg/kg, igual a 1000 veces la dosis normal por kilogramo usada en el tratamiento de pacientes adultos) de rSIFN-co una vez por inyección intramuscular. Después observar y registrar sus muertes y reacciones tóxicas. Los resultados muestran que: veinticuatro horas después de la inyección, no se han registrado reacciones anómalas. Los órganos de los animales que se habían seleccionado para destruir tampoco mostraron señales de cambios anómalos. Los ratones restantes se mantuvieron todos vivos y eran normales después de dos semanas. Los pesos de todos los ratones en el grupo experimental y el grupo de control aumentaron, y la relación de aumento no mostró ninguna diferencia evidente entre los dos grupos (P>0,05) de acuerdo con sus pesos el decimocuarto día. No se vieron cambios anómalos de los órganos principales de los ratones después de dos semanas.

30 1. Material experimental

35 1.1 Animales

40 ratones adultos sanos que pesaban 18-22 g, la mitad macho y la mitad hembra, clasificados por el centro de control de animales experimentales de Sichuan.

40 1.2 Medicinas

Se administró una solución esterilizada de rSIFN-co (Proporcionada por Sichuan Huiyang Life-engineering Ltd.), 0,15 mg/ml, Lote: 981201 i.m. en solución salina.

45 2. Método

50 Separar los 40 ratones en dos grupos aleatoriamente, uno para medicina experimental, otro para control. Inyectar medicinas o solución salina a la misma relación (0,1 ml/10 g) a través del músculo a cada ratón de acuerdo con el grupo al que pertenezcan. (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 ratones. Matar a la mitad de los ratones (la mitad machos y la mitad hembras) para comprobar si había algún cambio patológico anómalo en sus órganos principales, tales como corazón, bazo, hígado, pulmón, riñón, glándula adrenal, estómago, duodeno, etc. después de 24 horas. Los que permanecen se mantiene y se observan hasta el decimocuarto día. Pesar a todos los ratones, matarlos y después observar la apariencia de los órganos enumerados anteriormente para ver si hay alguna anomalía. Tomar tejido patológico y examinarlo, usando el examen para evaluar la diferencia en los aumentos de peso en los dos grupos.

55

3. Resultados

Los resultados muestran que no se ve ninguna toxicidad aguda después de tratarse a todos los ratones con rSIFN-co i.m. con 150 µg/kg una vez, igual a 1000 veces la dosis normal por kilogramo usada en tratamiento de pacientes adultos. En los 14 días después de la inyección, todos los ratones vivieron bien. Comían, bebían, secretaban y excretaban con normalidad y mostraron condiciones de pelo normales. No murió ninguno de ellos. La observación de los órganos principales de los ratones seleccionados aleatoriamente no muestra ningún cambio anómalo 24 horas después de la inyección. 14 días después de la inyección, se mató a todos los ratones restantes. Las necropsias tampoco mostraron ningún cambio. Los pesos de todos los ratones en los dos grupos aumentaron, pero no se mostró ninguna diferencia evidente cuando se accedió con métodos estadísticos ($p > 0,05$). Véase Tabla 6.1:

Tabla 6.1 Influencia en los pesos de los ratones después de inyección de rSIFN-co

| Grupo | Dosis | Animal | Pesos antes de la inyección (g) | Pesos después de la inyección (g) | Aumento del valor de los 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

En las condiciones de este experimento, no hubo ninguna reacción tóxica en todos los ratones después de la inyección de rSIFN-co con 150 µg/kg. Puede llegarse a la conclusión de que la dosis tolerable máxima de i.m. en ratones es de 150 µg/kg, que es igual a 1000 veces la dosis normal por kilogramo usada en el tratamiento de pacientes adultos.

EJEMPLO 7

Los efectos clínicos del supercompuesto de interferón recombinante (rSIFN-co)

El supercompuesto de interferón recombinante (rSIFN-co) es una invención para terapia de enfermedad viral, especialmente para hepatitis. Al mismo tiempo puede inhibir la actividad de virus EB, VSV, virus del Herpes simple, coronavirus, virus de sarampión, y otros. Usando células Wish /sistema de VSV como el ensayo para la actividad antiviral, los resultados mostraron que: el otro rIFN era de $0,9 \times 10^8$ UI/mg, el Intrón A era de $2,0 \times 10^8$ UI/mg y rSIFN-co era de 9×10^8 UI/mg. La actividad antiviral de rSIFN-co es mucho más alta que la de los dos anteriores.

Con el permiso de la Administración de Fármacos y Alimentos Estatal (SFDA), República Popular China, los ensayos clínicos han tenido lugar en el Hospital de China Occidental, Universidad de Sichuan, el Segundo Hospital de la Universidad Médica de Chongqing, el Primer Hospital de la Escuela de Medicina, Universidad de Zhejiang desde febrero de 2003. El tratamiento clínico que se centra en la hepatitis B se realiza bajo las directrices del ensayo aleatorio, de doble ciego, multicentro. Se usó IFN-α1b como control, y los resultados primarios mostraron lo siguiente:

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

1. Patrón de selección de pacientes:

Los patrones 1-4 son eficaces tanto para el tratamiento con rSIFN-co (9 µg) como con IFN-α1b (5 MU, 50 µg) y los Patrones 1-5 son para el tratamiento con rSIFN-co (15 µg).

- 1). Edad: 18-65
- 2). Positivo para ensayo de HBsAg durante los últimos seis meses, positivo para el ensayo de HBeAg, ensayo de PCR, copias de ADN del VHB \geq de 10^5 /ml
- 3). ALT \geq dos veces el valor normal
- 4). No ha recibido nunca tratamiento de IFN; o ha recibido tratamiento de Lamivudine pero este ha fracasado o ha recaído
- 5) Ha recibido una vez otro tratamiento de IFN (3 MU o 5 MU) hace seis meses siguiendo el patrón de la SFDA, pero este ha fracasado o ha recaído.

2. Evaluación de los efectos:

En referencia a las recomendaciones del Décimo Comité Nacional de China de la Hepatitis y Hepatopatía Viral, los efectos se dividieron en tres grados de acuerdo con el nivel de ALT, ADN del VHB y ensayos de HBeAg.

Respuesta: nivel normal de ALT, negativo para ADN del VHB, negativo para HBeAg

Respuesta parcial: nivel normal de ALT, negativo para ADN del VHB o HBeAg

Sin respuesta: ALT, ADN del VHB y HBeAg sin cambios

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

3. Resultados del ensayo clínico:

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

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

| Periodo | grupo | Medicina | casos | Tasa de Eficacia | Transferencia de HBsAg a tasa negativa | Transferencia de HBeAg a tasa negativa | Transferencia de ADN del VHB a tasa negativa | Tasa de recuperación de la función hepática |
|---------------|-------|-----------------------|-------|------------------|--|--|--|---|
| 8-12 semanas | A | rSIFN-co (9 µg) | 32 | 46,88 (15) | 9,38 (3) | 28,12 (9) | 37,50 (12) | 84,38 (27) |
| | B | IFN-α1b (5 MU, 50 µg) | 32 | 21,88 (7) | 0,00 (0) | 9,38 (3) | 15,62 (5) | 56,25 (18) |
| 16-24 semanas | A | rSIFN-co (9 µg) | 64 | 54,69 (35) | 7,81 (5) | 25,00 (16) | 34,38 (22) | 90,62 (58) |
| | B | IFN-α1b (5 MU, 50 µg) | 64 | 25,00 (16) | 0,00 (0) | 9,38 (6) | 18,75 (12) | 78,13 (50) |

En el Grupo C, los casos fueron de tratamiento previo de hepatitis B activa crónica con otros IFN (3 MU o 5 MU) que fracasaron o recayeron y después se trataron 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 %) transfirieron HBeAg a negativo; 7 de 13 (53,85 %) transfirieron ADN del VHB a negativo; 11 de 13 (84,62 %) recuperaron las funciones hepáticas a la normalidad.

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

Los efectos secundarios del IFN incluyen fiebre, náuseas, mialgia, anorexia, alopecia, leucopenia y trombocitopenia, etc. La dosis máxima de IFN-α1b es 5 MUI cada vez; la dosis habitual es de 3 MUI. Cuando se toma la dosis habitual, el 90 % de los pacientes tienen efectos secundarios de grado I-II (patrón de la OMS). Tuvieron fiebre menor de 38 °C, náuseas, mialgia, anorexia, etc. Cuando se tomaron a dosis máxima, la tasa de efectos secundarios no aumentó claramente, pero eran más graves. La dosis máxima de rSIFN-co es de 24 µg, inyección subcutánea, cada día durante 3 meses. La dosis habitual es de 9 µg. Cuando se usaron dosis habituales, menos del 50 % de los pacientes tuvieron efectos secundarios de grado I-II (patrón de la OMS), incluyendo fiebre por debajo de 38 °C, náuseas, mialgia, anorexia, leucopenia y trombocitopenia ligera. Con dosificación máxima, aproximadamente el 50 % de los pacientes padecieron leucopenia y trombocitopenia después de usar **rSIFN-co** un mes, pero esos efectos secundarios desaparecieron después de detener el tratamiento durante un semana. Es seguro para su uso continuado.

Las observaciones de tratamiento de la hepatitis C con rSIFN-co

1. Patrón de selección de pacientes:

- 1). edad: 18-65
- 2). Positivo para anticuerpos del VHC
- 3). ALT ≥ 1,5 veces el valor normal, durante más de 6 meses

2. Evaluación de los efectos:

En referencia al patrón de Infergen® para el tratamiento de la hepatitis C y de acuerdo con el nivel de ALT y ensayo de ARN del VHC, los efectos se dividieron en tres grados:

- 5 Respuesta: nivel normal de ALT, negativo para ARN del VHC
 Respuesta parcial: nivel normal de ALT, ARN del VHC sin cambios
 Sin respuesta: ALT y ARN del VHC sin cambios

3. Efectos del ensayo clínico

10 El ensayo clínico se realizó al mismo tiempo con tratamiento para 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 %) tuvieron efectos evidentes, 12 de 46 (26,08 %) transfirieron el ARN del VHC a negativo, 26 de 46 (56,52 %) recuperaron las funciones hepáticas a la normalidad.

EJEMPLO 8**Pulverización del supercompuesto de interferón recombinante**

20 **Componente principal:** Supercompuesto de Interferón Recombinante **Característica:** Líquido, sin material insoluble

25 **Farmacología:** el Supercompuesto de Interferón Recombinante tiene un amplio espectro de actividad antiviral. Sus efectos son 5-20 veces mayores que los de 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, e inducción de la expresión de la enzima 2'5'-A sintetasa, proteína quinasa R en la célula diana, inhibiendo de este modo la expresión de la proteína viral. El IFN puede inducir la expresión de diversas proteínas antivirales para inhibir la reproducción de proteínas virales, potenciar la función de linfocitos citotóxicos naturales (NK) y otras funciones reguladoras e inmunitarias, e inhibir la invasión de virus.

30 **Toxicidad aguda:** todos los ratones están vivos después de la inyección subcutánea de dosis máxima (1000 veces la dosis humana), no se observó DL 50.

Indicación: prevención del Síndrome Respiratorio Agudo Grave. **Dosificación y Administración:** pulverización tanto en la cavidad nasal como en la garganta, tres veces al día.

35 **Reacciones adversas:** no se indicó ninguna reacción adversa de la pulverización con rIFN. No indujo alergia. Si la estimulación es ocasional, la reacción gastrointestinal adversa es pequeña, y no se observó ninguna otra reacción adversa evidente durante el tratamiento, es seguro continuar el uso. Todas las reacciones se resolverán por sí solas.

Advertencia: pacientes alérgicos a αIFN y producciones de *E. Coli* no pueden usar este producto.

40 **Precauciones:** antes de usar por primera vez, pulverizar dos veces para expulsar el aire. Si hubiera cualquier material de precipitación turbio, si el producto está caducado o hay material en el frasco, no usarlo.

Uso Pediátrico: no está claro.

Uso Geriátrico: no está claro.

45 **Madres durante la lactancia y mujeres embarazadas:** prohibido

Interacciones farmacológicas: no está claro.

Sobredosis: exceso 150 µg ($7,5 \times 10^7$ UI) cada vez, fiebre, anorexia, mialgia, se producirán escalofríos más frecuentemente. No hay ninguna reacción adversa grave.

Suministro: 1 pulverizador/envase, 20 µg (1×10^7 UI)/3 ml

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

50 **Periodo eficaz:** aproximadamente un año

Fabricación: fabricado por Sichuan Huiyang life-engineering Ltd.

Dirección: 8 Yusa Road, Habitación 902, Edificio A

 Chengdu, 610017

 Sichuan, R.P. China

EJEMPLO 9-A**Efecto *in vitro* de un compuesto de interferón recombinante novedoso en coronavirus asociado con SRAG**

60 **Muestra proporcionada por:** Huiyang Life Engineering Lt Company, Provincia de SiChuan

Experimentador: Departamento de Biología Molecular, Instituto de microorganismos y epidemiología, Academia de Ciencia Médica Militar

65 **Datos originales:** conservados en el archivo del Departamento de Biología Molecular, Instituto de microorganismos y epidemiología, Academia de Ciencia Médica Militar

1. Materiales

Medicina: compuesto de interferón recombinante novedoso, 9 µg de cada uno, proporcionado por Huiyang Life Engineering Lt Company, Provincia de SiChuan, número de Lote: 20020501.

Células: Vero E₆, proporcionado por el Departamento de Biología Molecular del Instituto de microorganismos y epidemiología, Academia de Ciencia Médica Militar

Virus: coronavirus asociado con SRAG, BJ-01, proporcionado por el Departamento de Biología Molecular, Instituto de microorganismos y epidemiología, Academia de Ciencia Médica Militar.

Medio celular: DMEM complementado con FBS al 10 %.

2. Condición

El virus se midió en un laboratorio de bioseguridad de 3^{er} grado

3. Método

Ensayo de ECP (efecto citopático) de DICT₅₀: se sembraron 100 µl de células Vero E₆ en placas de 96 pocillos a 2 x 10⁴ células por pocillo. Después de 24 h de incubación a 37 °C, las células en monocapa Vero E₆ se trataron con 9 niveles de dilución de coronavirus asociado con SRAG por dilución 10 veces, 4 pocillos por dilución. Las células se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se examinó el ECP (efecto citopático) diariamente por microscopía. El ECP menor del 25 % se determinó como +, 26-50 % como ++, 51-75 % como +++, 76-100 % como +++++. Se registró el ECP. Después se calculó la DICT₅₀ por el método de Reed-Muench.

Citotoxicidad de la medicina: Se inocularon células Vero E₆ en placas de 96 pocillos a 2 x 10⁴ células (100 µl) por pocillo. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, las células crecieron hasta monocapa. La medicina se diluyó en 36, 18, 9, 4,5, 2,25 µg/ml (concentración final) y se añadió a pocillos cada una para 4 pocillos. Las células normales se establecieron como un grupo de control. Se observó diariamente el ECP del grupo de medicina durante un periodo de 5 días, y después se determinó la concentración de medicina que no mostraba toxicidad.

Ensayo de ECP de la actividad de la medicina contra coronavirus asociado con SRAG: se sembraron 100 µl de células Vero E₆ en placas de 96 pocillos a 2 x 10⁴ células por pocillo. Después de 24 h de incubación a 37 °C, las células crecieron hasta monocapa. La medicina a la máxima concentración que no mostraba ninguna citotoxicidad se diluyó en 5 niveles por dilución doble y se añadió a los pocillos (100 µl por pocillo). Mediante incubación con CO₂ al 5 % 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 ECP (el ECP menor del 25 % se determinó como +, 26-50 % como ++, 51-75 % como +++, 76-100 % como +++++, células normales como -). Las células se dividieron en el grupo normal, el grupo de control de medicina, y la dilución diferente del grupo de control de virus, 4 pocillos por grupo. El ECP se examinó diariamente. Hasta que el efecto citopático se mostró claramente en el grupo de control de virus, se evaluó la actividad anti viral del interferón. Se repitió el experimento. Se calculó la CI₅₀ de la medicina por el método de Reed-Muench.

4. Resultados

Toxicidad del virus: la DICT₅₀ del virus fue 10⁻⁸

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

El efecto antiviral de la medicina: Mostrado en la Tabla 9-A.1 y la Tabla 9-A.2

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

| Concentración de IFN (µg/ml) | ECP a diferentes concentraciones del virus | | |
|---------------------------------|--|------------------|------------------|
| | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ |
| 18 | - | - | - |
| 9 | - | - | - |
| 4,5 | ++ | - | - |
| 2,25 | +++ | ++ | - |
| 1,125 | ++++ | ++++ | ++ |
| Grupo de control del virus | ++++ | ++++ | +++ |
| Grupo normal | - | - | - |
| Grupo de control de la medicina | - | - | - |

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

| Concentración de IFN ($\mu\text{g/ml}$) | ECP a diferentes concentraciones del virus | | |
|--|--|-----------|-----------|
| | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} |
| 18 | - | - | - |
| 9 | - | - | - |
| 4,5 | + | - | - |
| 2,25 | +++ | ++ | - |
| 1,125 | ++++ | ++++ | ++ |
| Grupo de control del virus | ++++ | ++++ | ++++ |
| Grupo normal | - | - | - |
| Grupo de control de la medicina | - | - | - |

5. Conclusión

- 5 La concentración del compuesto de interferón recombinante novedoso que no muestra citotoxicidad es de 18 $\mu\text{g/ml}$. Sus CI_{50} fueron de 1,27, 2,25 y 4,04 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente de acuerdo con la concentración de 10^{-5} (1000DICT50), 10^{-4} (1000DICT50), 10^{-3} (10000DICT50) de coronavirus asociado con SRAG (Tabla A-9.3).

Tabla 9-A.3, CI_{50} de IFN a diferentes concentraciones del virus

| Dilución del virus | CI_{50} de IFN ($\mu\text{g/ml}$) |
|--------------------|--|
| 10^{-3} | 4,04 |
| 10^{-4} | 2,25 |
| 10^{-5} | 1,27 |

- 10 **Principal:** Jin-yan Wang
Asistente de laboratorio: Yan-hong Zhao, Xiao-guang Ji, Xiao-yu Li.
Datos originales: Conservados en los archivos del Departamento de Biología Molecular, Instituto de microorganismos y epidemiología, Academia de Ciencia Médica Militar
Fecha: Del 12 al 30 de mayo de 2003

EJEMPLO 9-B

- 20 **Efecto *in Vitro* de un compuesto de interferón recombinante novedoso e inyección de interferón $-\alpha$ -2b recombinante sobre coronavirus asociado con SRAG**

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

- 25 **Experimentador:** Departamento de Biología Molecular, Instituto de microorganismos y epidemiología, Academia de Ciencia Médica Militar.

Datos originales: Conservados en el archivo del Departamento de Biología Molecular, Instituto de microorganismos y epidemiología, Academia de Ciencia Médica Militar.

30 1. Materiales

- Medicina:** Compuesto de interferón recombinante novedoso, 618 $\mu\text{g/ml}$, proporcionado por Huiyang Life Engineering Ltd., provincia de Sichuan; Anfulong (inyección de interferón recombinante $-\alpha$ -2b recombinante), proporcionado por Biology Engineering Ltd. Company, Tianjin City, 30 $\mu\text{g/frasco}$ (3.000.000 de UI/frasco), Número de Lote: 20030105.

Células: Vero E₆ proporcionado por el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Microorganismos y Epidemiología, Academia de Ciencia Médica Militar.

Virus: coronavirus asociado con SRAG, BJ-01, proporcionado por el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Microorganismos y Epidemiología, Academia de Ciencia Médica Militar.

- 40 **Condición:** Los virus se midieron en 3^{er} grado de laboratorio de bioseguridad

2. Método

- 45 **La midió la DICT_{50} se midió con el ensayo de ECP:** Se inocularon células Vero E₆ en placas de 96 pocillos a 2×10^4 células (100 μl) por pocillo. Después de una incubación de 24 horas a 37 °C, se trataron las monocapas de Vero E6 con 9 niveles de dilución de coronavirus asociado con SRAG reduciendo 10 veces, cada dilución por

cada 4 pocillos. Las células se incubaron a 37 °C y dióxido de carbono al 5 %. El ECP se examinó diariamente por microscopía de contraste de fases. El ECP menor del 25 % se determinó como +, 26-50 % como ++, 51-75 % como +++, 76-100 % como +++. Se registró el ECP. Después se calculó la DICT₅₀ por el método de Reed-Muench.

5 **Las CT₅₀ de los IFN se midieron con el ensayo de MTT:** Se inocularon células Vero E₆ en placas de 96 pocillos a 2×10⁴ células (100 µl) por pocillo. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, el líquido del sobrenadante se retiró cuando las células crecieron hasta monocapa, después se trataron las Vero E₆ con diferentes concentraciones de IFN, cada dilución por cada 4 pocillos. Se estableció el grupo normal. Después de 10 5 días de observación, las células se mezclaron con MTT durante 4 horas. Después de eso, se retiró el líquido, y a continuación se añadió DMSO a células durante 0,5 horas. La DO_{570nm}, se midió por un lector de microplacas. Finalmente, se calculó la CT₅₀ por el método de Reed-Muench.

15 **La actividad de los IFN contra coronavirus asociados con SRAG se midió con el ensayo de MTT:** Se inocularon 100 µl de células Vero E₆ en placas de 96 pocillos a 2×10⁴ células por pocillo. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, las células se convirtieron en monocapa. La dilución de la medicina a la concentración que no muestra citotoxicidad se redujo 5 veces y hubo 5 niveles de dilución. Después se añadió cada dilución a 4 pocillos, 100 µl por pocillo. Después de 24 horas de incubación a 37 °C y CO₂ al 5 %, se retiró la solución de IFN, después se añadieron diferentes concentraciones de dilución del virus (DITC₅₀ 10000, 1000, 100) a las placas, 4 pocillos por dilución. Las células se dividieron en el grupo normal, el grupo de control de medicina, y la dilución diferente del grupo de control del virus (DITC₅₀ 10000, 1000, 100). Las células se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % 20 durante 48-72 horas, hasta que se mostró el efecto citopático en el grupo de control del virus, se registró ECP (ECP menor del 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 de MTT, y después se evaluó el efecto antiviral de los IFN. El experimento se repitió 3 veces. Se calculó la CI₅₀ de la medicina por el método de Reed-Muench.

25 **3. Resultados**

DICT₅₀ del virus: La DICT₅₀ del virus fue de 10⁻⁷.

30 **CT₅₀ de IFN:** La concentración del compuesto de interferón recombinante novedoso que no muestra citotoxicidad fue de 100 µg/ml, y la del IFN-α-2b recombinante fue de 12,5 µg/ml, la forma de las células fue idéntica al grupo normal a esa concentración. La CT₅₀ del compuesto de interferón recombinante novedoso fue de 139,18 µg/ml, la del IFN-α-2b recombinante fue de 17,18 µg/ml.

Tabla 9-B.1 CT₅₀ de IFN

| IFN | CT ₅₀ (µg/ml) | | | Valor medio (X±DT, n=3) |
|---|--------------------------|----------------|----------------|-------------------------|
| | 1° experimento | 2° experimento | 3° experimento | |
| compuesto de interferón recombinante novedoso | 141,42 | 125,96 | 150,08 | 139,18 ± 12,22 |
| IFN-α-2b | 17,68 | 15,75 | 18,10 | 17,18 ± 1,25 |

35 **El efecto antiviral de la medicina:** Se observaron los efectos antivirales de dos IFN *in vitro*. Se muestran los resultados de los experimentos en la Tabla 9-B.2, y los resultados de IT se muestran en la Tabla 9-B.3

Tabla 9-B.2, la actividad antiviral de los IFN

| IFN | Concentración del virus (DICT ₅₀) | CI ₅₀ (µg/ml) | | | Valor medio (X±DT, n=3) |
|---|---|--------------------------|----------------|----------------|-------------------------|
| | | 1° experimento | 2° experimento | 3° experimento | |
| compuesto de interferón recombinante novedoso | 10000 | 0,79 | 1,04 | 0,93 | 0,92 ± 0,12 |
| IFN-α-2b | | 5,04 | 4,56 | 4,65 | |
| compuesto de interferón recombinante novedoso | 1000 | 0,19 | 0,18 | 0,18 | 0,18 ± 0,01 |
| IFN-α-2b | | 1,18 | 1,19 | 1,12 | |
| compuesto de interferón recombinante novedoso | 100 | 0,08 | 0,10 | 0,11 | 1,16 ± 0,02 |
| IFN-α-2b | | 0,33 | 0,21 | 0,30 | |

Tabla 9-B.3, la actividad antiviral de los IFN

| IFN | Concentración del virus (DICT ₅₀) | CT ₅₀ (µg/ml) | CT ₅₀ (µg/ml) | IT (CT ₅₀ /CI ₅₀) |
|---|---|--------------------------|--------------------------|--|
| compuesto de interferón recombinante novedoso | 10000 | 139,18 | 0,92 | 151,28 |
| IFN-α-2b | | 17,18 | 4,75 | 3,62 |
| compuesto de interferón recombinante novedoso | 1000 | 139,18 | 0,18 | 773,22 |
| IFN-α-2b | | 17,18 | 1,16 | 14,78 |
| compuesto de interferón recombinante novedoso | 100 | 139,18 | 0,10 | 1391,80 |
| IFN-α-2b | | 17,18 | 0,28 | 61,36 |

4. Conclusión

5 Se observó el efecto protector del compuesto de interferón recombinante novedoso e IFN-α-2b en Vero E₆ *in vitro*, y se manifestó la capacidad antiviral de los IFN. La CI₅₀ del compuesto de interferón recombinante novedoso en coronavirus asociado con SRAG a la concentración de 10000, 1000, 100 fue de 0,92, 0,18 y 0,10 µg/ml en tres experimentos. El IT de este fue de 151,28, 773,32 y 1391,80, respectivamente. La CI₅₀ de IFN-α-2b fue de 4,75, 1,16 y 0,28 µg/ml, el IT (índice de tratamiento) de este fue de 3,62, 14,78, 61,36 respectivamente.

10 Es más importante que los dos ensayos (Véase los Ejemplos anteriores 9A y 9B) del efecto anti-virus de SRAG *in vitro* de rSIFN-co indicaron todos que incluso la dosis eficaz de rSIFN-co que inhibe el virus de SRAG es 1/5 de la del Interferón α-2b que se usa clínicamente en China en la actualidad, el Índice de Tratamiento (IT) de rSIFN-co es casi 50 veces el del Interferón α-2b. (VÉASE: *In vitro* effect of a new-type recombinant compound interferon and recombinant interferon-α2b injection on SRAG associated coronavirus. Por el Instituto de Microbiología y Epidemiología, Academia de Ciencia Médica Militar).

15 Se habían usado treinta mil pulverizaciones de rSIFN-co entre enfermeros y doctores de primera línea y personas de alto riesgo en la provincia de Sichuan. El resulta muestra que ninguno de los enfermeros y doctores se infectaron por SRAG en la provincia de Sichuan.

20 **Principal:** Jin-yan Wang

Asistentes de laboratorio: Yan-hong Zhao, Xiao-guang Ji, Xiao-yu Li.

Fecha: Del 1 al 30 de julio de 2003

25

Ejemplo 10:

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS INHIBIDORES DE DIFERENTES INTERFERONES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL VHB

30

El ADN del virus de la hepatitis B (VHB) contiene elementos consenso para transactivar proteínas cuya actividad de unión está regulada por interferones. El tratamiento de hepatocitos infectados por VHB con interferones conduce a la inhibición de la expresión génica del VHB. El objetivo del presente estudio fue caracterizar los efectos de diferentes interferones en la transcripción regulada por el VHB. Usando transfección transitoria de células de hepatoma humano con plásmidos indicadores que contienen el gen de luciferasa de luciérnaga bajo el control del Potenciador del VHB (EnH) I, Enh II y promotor del núcleo, el Solicitante estudió las actividades biológicas de tres interferones diferentes en la transcripción.

35

Materiales y Métodos

40

1. Interferones: IFN-con1 (Infergen[®]), IFN-Hui-Yang (γSIFN-co) e IFN-beta 1b

2. Plásmido indicador: Los fragmentos de ADN que contienen el Potenciador del VHB (EnH) I, Enh II y promotor del núcleo se prepararon usando PCR y extremos romos clonados en el sitio de SmaI del promotor, y el plásmido indicador de luciferasa de luciérnaga sin potenciador pGL3-Basic (Promega, WI, EE.UU.). El plásmido indicador resultante se nombró pGL3-HBV-Luc.

45

3. Cultivo Celular y transfección de ADN: se cultivaron células HepG2 en medio DMEM complementado con FBS al 10 % y penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. Las células se mantuvieron en incubador de CO₂ al 5 %, a 30 °C. Las células se transfectaron con el plásmido indicador pGL3-HBV-Luc usando el kit de transfección de Lipofectina de Boehringer. Después de 18 horas, el medio que contenía reactivos de transfección se retiró y se añadió medio nuevo con o sin interferones. Las células se mantuvieron en cultivo durante otras 48 horas.

50

4. Ensayo de Luciferasa: Cuarenta ocho horas después de la adición de interferón, las células se recogieron y se preparó la lisis celular. La concentración de proteínas de los lisados celulares se midió usando el kit de Ensayo de Proteínas Bio-Rad. La actividad luciferasa se midió usando Sistemas de Ensayo Indicadores de Luciferasa de

Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS

5 Expresión de la Actividad Luciferasa en Diferentes Lisados de Células Tratadas con Interferón

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

Este resultado muestra que el γ SIFN-co inhibe más eficazmente la expresión génica del VHB.

10 **Ejemplo 11:**

EFFECTOS SECUNDARIOS Y CAMBIOS EN LA TEMPERATURA CORPORAL CUANDO SE USA γ SIFN-co

15 Habitualmente hay más efectos secundarios para el uso de interferón. Los efectos secundarios incluyen: náuseas, dolor muscular, pérdida de apetito, alopecia, hipoleucocitosis (hipoleucemia; hipoleucocitosis; hipoleuquia) y reducción de las plaquetas sanguíneas, etc.

MÉTODO

20 Los pacientes de muestras se dividieron en dos grupos. Se inyectó a 11 pacientes del Grupo A 9 μ g de Infergen[®]. Se inyectó a 10 pacientes del Grupo B 9 μ g de γ SIFN-co. Ambos grupos se controlaron durante 48 horas después de las inyecciones. Se registró el primer control 1 hora después de la inyección. Después de esto, los registros se tomaron cada 2 horas.

25 La Tabla 11.1 es la comparación de los efectos secundarios entre los pacientes a los que se inyectan 9 μ g de Infergen[®] y 9 μ g de γ SIFN-co.

Tabla 11.1. Efectos secundarios

| | | γ SIFN-co 9 μ g | Infergen [®] 9 μ g |
|--|--------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| | | Persona: n=10 | Persona: n=11 |
| Sistemas corporales | Reacciones | Recuento | Recuento |
| En general | Debilidad | 3 | 3 |
| | Calor | 1 | |
| | frigorolábil | 3 | 4 |
| | Debilidad de las piernas | | 3 |
| | Lumbago leve | 2 | 1 |
| | Dolor corporal | 4 | 5 |
| Sistema Nervioso Central/Sistema Nervioso Periférico | Cefalea | 3 | 6 |
| | Mareo | 2 | 11 |
| | Somnolencia | | 3 |
| Gastroenterostomía | Apoclesis | 1 | |
| | Celiodinia | 1 | |
| | Diarrea | 1 | |
| Sistema musculoesquelético | Mialgia | 1 | 2 |
| | Artralgia | 2 | |
| Sistema respiratorio | Congestión nasal | 1 | |
| Paropsia | Ojos hinchados | | 1 |

30 **RESULTADOS**

Para los pacientes a los que se inyectó γ SIFN-co, los efectos secundarios fueron menores. Tuvieron algunos síntomas comunes a la gripe, tales como: cefalea, debilidad, frigolabilidad, dolor muscular, hidrosis, artralgia (artrodinia; artronalgia). Los efectos secundarios de los pacientes a los que se inyectó Infergen[®] fueron peores que a los que se inyectó γ SIFN-co.

A partir de las Figuras 9A-1, 9A-2, 9B-1 y 9B-2, resultó obvio que las temperaturas corporales de los pacientes de muestra en el Grupo A eran mayores que los pacientes en el Grupo B. También se reflejó que la resistencia de γ SIFN-co fue mucho mejor que la de Infergen[®].

Ejemplo 12:**CRECIMIENTO CRISTALINO de γ SIFN-co Y ENSAYO DE PARÁMETROS DE CRISTALOGRAFÍA**

5 Cristal de γ SIFN-co. Se encontraron dos tipos de cristal después de un ensayo y experimento sistemático (Véase Figuras 10-12).

1. Crecimiento cristalino

10 Disolver proteína γ -SIFN-co con agua pura (H₂O) hasta 3 mg/ml de densidad. Búsqueda de cristalización usando Exploración de Cristal de Hampton Research I y II que se realizó por Hampton Company. Usando el Método de Difusión de Suspensión de Gotas, líquido 500 μ l, gota 1 μ l de proteína + 1 μ l de líquido, a temperatura de 293 K. En primer lugar se encontraron 2 tipos diferentes de cristales pequeños como se enumera en la Tabla 12.1.

Tabla 12.1. Exploración de Cristalinidad de γ -SIFN-co

| Condición | I | II |
|-------------------------|-------------------------|---------------------|
| Diluyente | Tris-HCl 0,1 M pH=8,75 | HEPES 0,1 M pH=7,13 |
| Precipitante | PEG550 MME 17,5 % (p/v) | PEG6K 10 % (p/v) |
| Aditivos | NaCl 0,1 M | MPD 3 % (v/v) |
| Temperatura | 293 K | 293 K |
| Tamaño del Cristal (mm) | 0,2x0,2x0,1 | 0,6x0,02x0,02 |
| Cristalograma | Figura 10 | Figura 11 |

15 2. Recogida y procesamiento de datos

El Cristal I se usó para recoger datos de difracción de Rayos X y análisis preliminar de cristalografía. También se ensayaron los parámetros. Los datos de difracción se recogieron a temperatura ambiente. El Cristal I (Condición I) se insertó en un tubo de pared siliconada fina. Usando un detector BrukerAXS Smart CCD, la fuente de luz es CuK α ($\lambda=1,5418$ Å) generada por el generador de rayos X Nonius FR591. Potencia lumínica 2000 KW (40 kv x 50 mA), longitud de onda 1,00 Å, con exposición de 60 segundos, $\Delta\phi=2^\circ$, la distancia entre el cristal y el detector fue de 50 mm. Los datos se procesaron para usar el Envase de Procedimiento Proteum de Bruker Company. Véase Figura 12 para el patrón de difracción de cristales (parcialmente). Véase Tabla 12.2 para el resultado del proceso.

Tabla 12.2. Resultados de los Parámetros de Cristalografía

| | |
|--------------|--------|
| a (Å) | 82,67 |
| b (Å) | 108,04 |
| c (Å) | 145,01 |
| α (°) | 90,00 |
| β (°) | 90,00 |
| γ (°) | 98,35 |

Grupo Espacial P2 o P2₁
 Nitidez de separación 5 Å
 Molécula simétrica n° 10
 Disolución 57,6 %

25 Además, no hubo ningún crecimiento cristalino de γ SIFN-co basándose en publicaciones previas. El resultado más cercano al γ SIFN-co fue h₁IFN-a2b pero la exploración fue muy complicada. Después de sembrar 3 veces, el cristal creció hasta 0,5x0,5x0,3 mm, la nitidez de separación fue de 2,9 Å, el grupo espacial fue P2₁. Los cristales fueron también grandes, el número de moléculas asimétricas fue 6 y la disolución fue de aproximadamente 60 %.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un interferón recombinante que puede obtenerse mediante un proceso que comprende la introducción en *E. coli* de la secuencia polinucleotídica mostrada en la Figura 1, para su uso como medicamento para el tratamiento de una enfermedad viral en su sujeto.
- 10 2. Una composición farmacéutica que comprende un interferón recombinante que puede obtenerse mediante un proceso que comprende la introducción en *E. coli* de la secuencia polinucleotídica mostrada en la Figura 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de una enfermedad viral.
- 15 3. El interferón recombinante para el uso de la reivindicación 1 o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 2, en donde la enfermedad viral es hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, otros tipos de hepatitis, o una enfermedad de las vías respiratorias superiores inducida por virus.
- 20 4. El interferón recombinante para el uso de la reivindicación 1 o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 2, en donde la enfermedad viral es una infección causada por el virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus, herpesvirus simple, otros tipos de herpesvirus, papovavirus, poxvirus, picornavirus, adenovirus, rinovirus, virus de la leucemia humana de células T de tipo I, virus de la leucemia humana de células T de tipo II, virus de la leucemia humana de células T de tipo III, o virus de la gripe aviar.
- 25 5. Un interferón recombinante que puede obtenerse mediante un proceso que comprende la introducción en *E. coli* de la secuencia polinucleotídica mostrada en la Figura 1, para su uso como medicamento para el tratamiento de un tumor en un sujeto.
- 30 6. Una composición farmacéutica que comprende un interferón recombinante que puede obtenerse mediante un proceso que comprende la introducción en *E. coli* de la secuencia polinucleotídica mostrada en la Figura 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de un tumor.
- 35 7. El interferón recombinante para el uso de la reivindicación 5 o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 6, en donde el tumor es cáncer de piel, carcinoma de células basales, melanoma maligno, cáncer de hígado, carcinoma de células renales, cáncer tiroideo, cáncer rinofaríngeo, carcinoma sólido, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer abdominal, cáncer esofágico, cáncer rectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga superficial, hemangioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, glioma, leucocitemia aguda, leucocitemia crónica, leucemia mielógena crónica, tricoleucemia, linfadenoma, mieloma múltiple, policitemia vera o sarcoma de Kaposi.
- 40 8. El interferón recombinante para el uso de las reivindicaciones 1 o 5, en donde el interferón se administra por vía oral, inyección venosa, inyección muscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, administración nasal, administración mucosa o por inhalación.
9. El interferón recombinante para el uso de las reivindicaciones 1 o 5, en donde el interferón recombinante se formula como comprimido, cápsula, líquido para administración oral, pasta, inyección, pulverización, supositorio o solución.

Figura 1

```

5'           11           21           31           41           51
+1 M C D L P Q T H S L E N R R A L I L L A
      1 ATGTGCGAGC TGGCGCAGAC CCACTCCCTG GGTAAACCGTGT GTGCTOTGAT CCTGCTGGCT
      TACACGCTGG ACGGCGTCTG GGTGAGGGAC GCATTGGCAG CAGGAGACTA 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 GATCTCCCC GTTCTCCTGC CTGAAAGACC GTCAGGACTT CGGTTCCCG
      GTCTACGAG CATAGAGGG CAAGAGGAGG GACTTTCTGG CAGTGTGAA 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 CCAGTTCAG AAAGCTCAGG CTATCTCCGT TCTGCAAGAA
      GTCCCTCTTA AGCTGCCATF GGTCAAGGTC TTTCGAGTCC GATAGAGGCA AGAGTGTCTT

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 AGACOTTCAA OCTGTTCTCC ACCAAAGACT CCTCCGCTGC TTGGGAGGAA
      TACTAGGTCC TCTGGAAGTT GGACAAGAGG TGGTTTCTGA GGAGGCGAGG AACCTGTCTT

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 AAAAATTGTA CACGAACTG TACCAGCAGC TGAAGACCT GGAAGCTTGC
      AGGGACGACC TTTTAAAGAT GTGGCTTGAC ATGGTGTGTC ACTTGCTGGA CCTTGAAGC

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 AGTTGACTC CATCCTGGCT
      CAATAGGTCC TTCAAGCACA ACTTCITTTGG 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 ACTTCAGCG TATCACCTG TACCTGACC GAAAAAATA CTCCCGCTGC
      CAATTTTTTA TGAAGGTCC ATAGTGGGAC ATGGACTGGC TTTTITTTAT GAGGGGCGAG

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 G
      421 GCTTGGGAAG TTGTTCTGTC TGAATCATG CGTTCCTTCT CCGTGTCCAC GAACCTGCAG
      CGAACCGTTC AACAAAGCAG ACTTTAGTAC GCAAGGAAGA GGGACAGGTG GTTGGACGTC

5'          491          501
+1 E R L R R K E #
      481 GAAAGTGTGC GTGTAAGA ATAA
      CTTGCAGAGC 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 TAGCTGAAAC TGATTCTGTT GGTAAACCGTC GCGCTCTEAT TCTGCTGGCA
  TAGACACTAA ATGGAGTTTG AGTAAGAGAA GCATTGGCAG GCGGAGACTA 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 CAGATGGGTG GTATTTCCDC GTTTAGCTGC CTGAAAGACC CTCACGACTT GCGCTTTCCG
  GTCTACGCAG CATAAAGGGG CAAATCGACG GACTTTCTGG CAGTGGTGAA GCGGAAAGGC

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 CCAATTCGAG AAAGCTCAGG CAATCTCTGT ACTGCACGAA
  GTTCTTCTCA AGCTACCGTT GGTAAAGGTC TTTCGAGTCC GTTAGAGACA TGACGTGCTT

5'           91           1           11           21           31
+1 M I Q Q T F W L F S T K D S S A A W D E
181 ATGATCCAAC AGACCTTCAA CCTGTTTTCC ACTAAAGACA GCTCTGCTGC TTGGGAGGAA
  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 CACTGAAGTG TATCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCATCC
  TCGAAGCAAC TCTTCAAGAT GTGACTTGAC ATAGTCGTGG ACTTGGCTGGA CCTTCGTACG

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 ACCTGCACTC TATTCTGGCA
  CATTAGGTCG TTCAAGCACA TCTTCTCTGA GCGGACTACT TGCAGCTGAG ATAAGACCGT
    
```

Figura 3

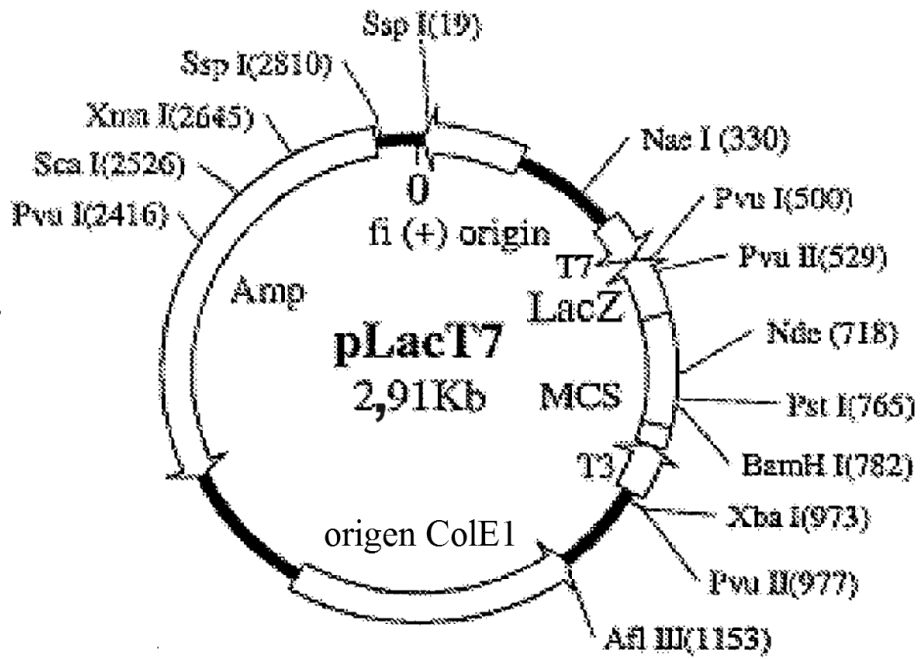


Figura 4

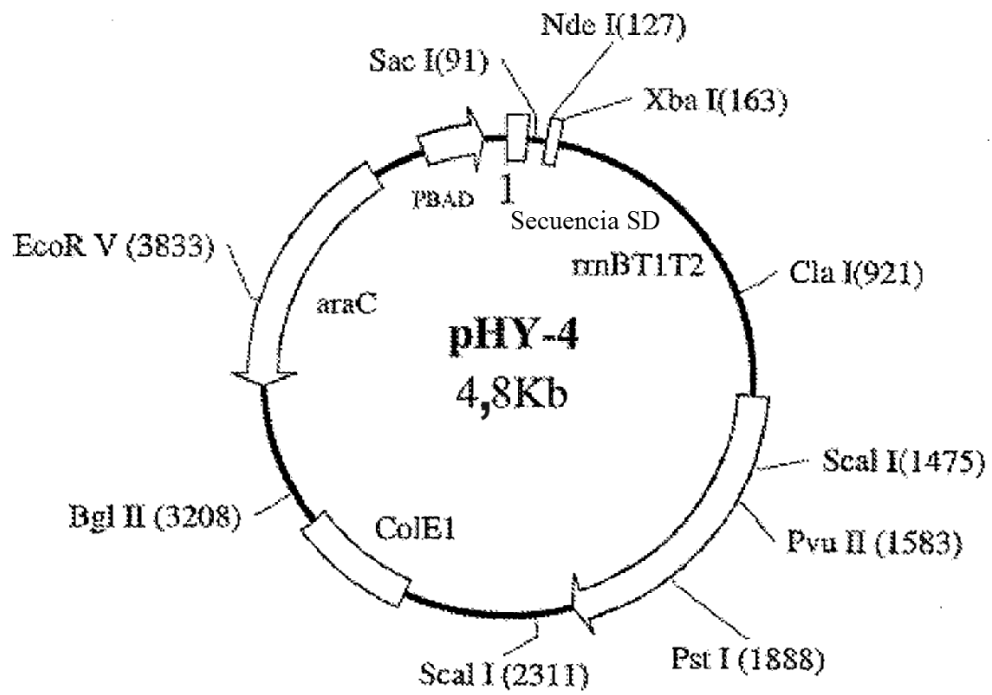


Figura 5

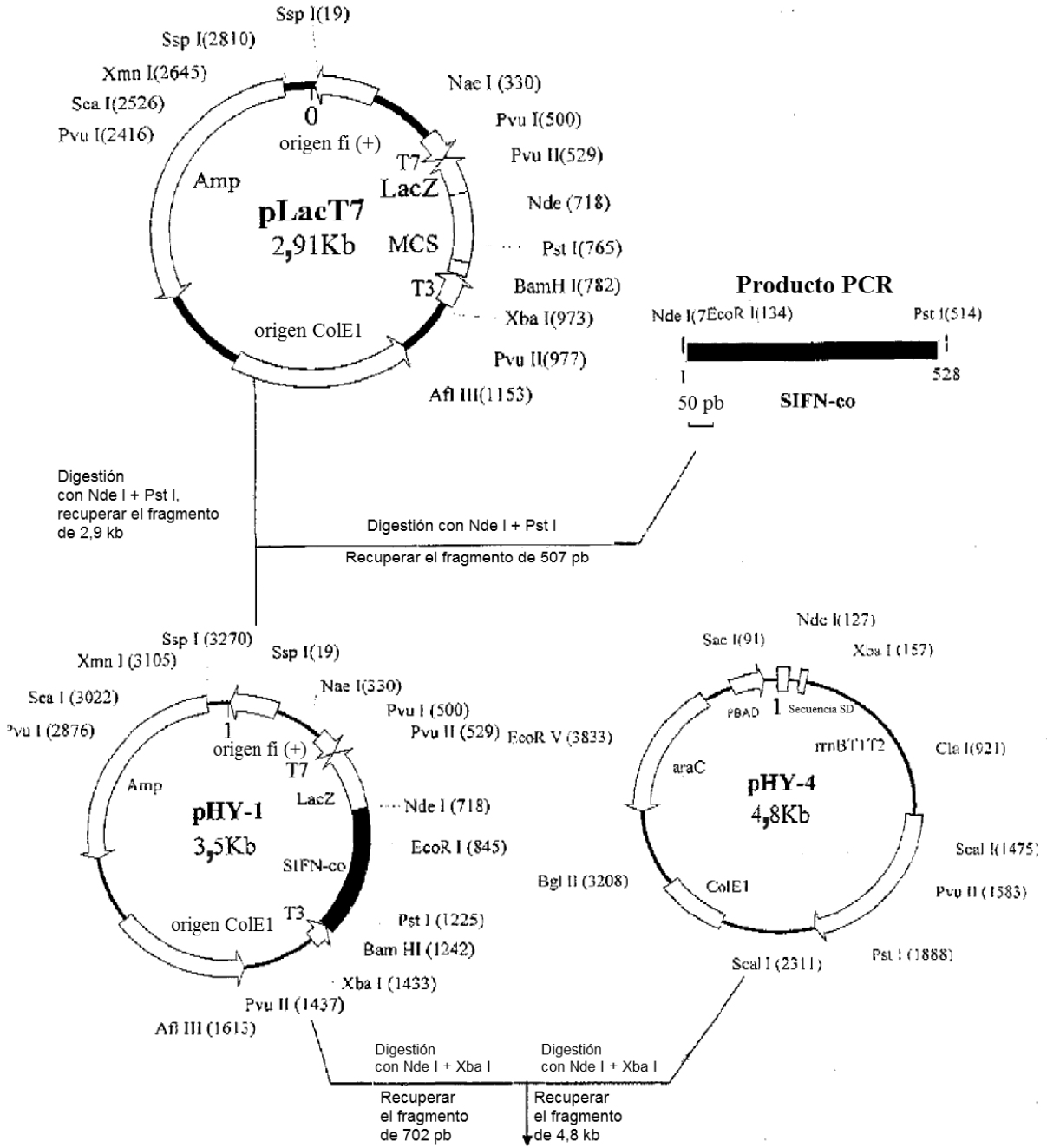


Figura 5 A

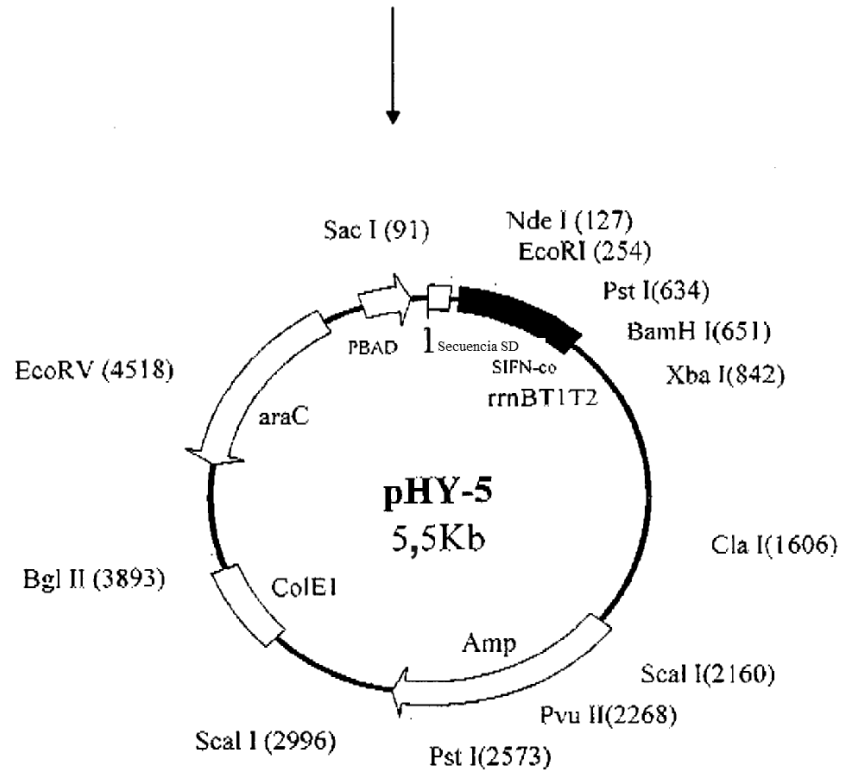


Figura 6-A

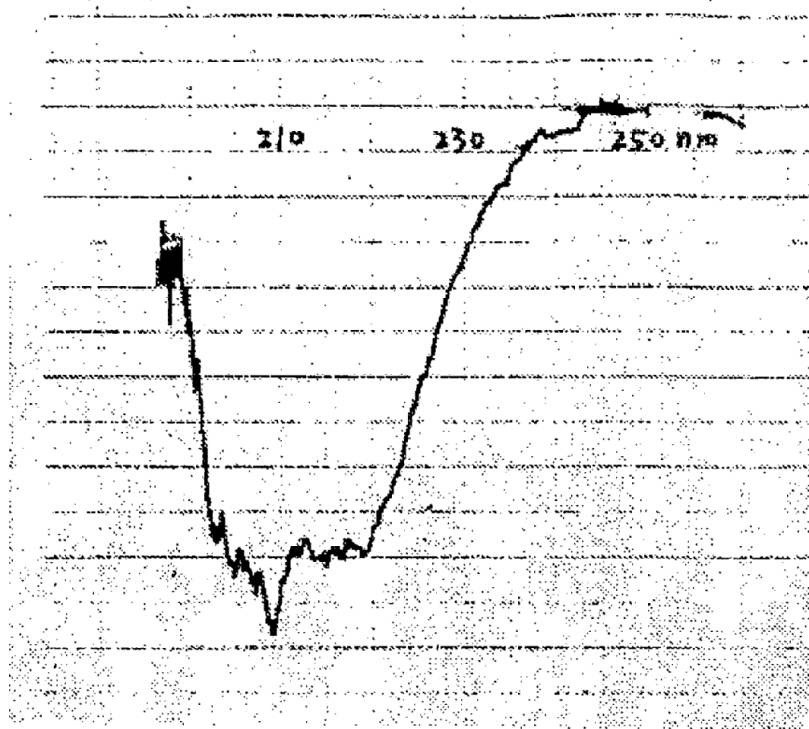


Figura 6-B

IFN CONSENSO DE LA ESPECIE ALFA HUMANA

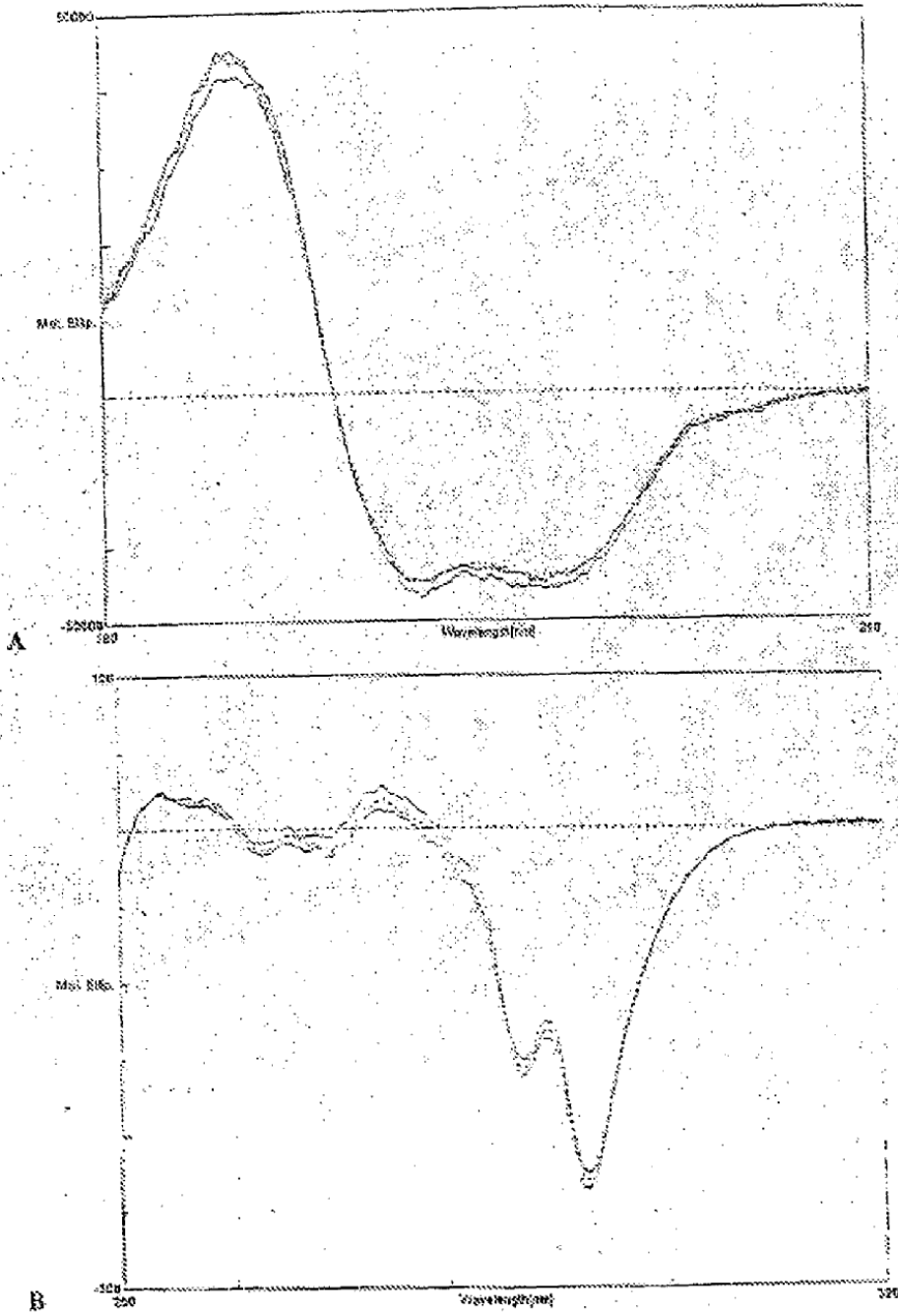


Figura 6-C

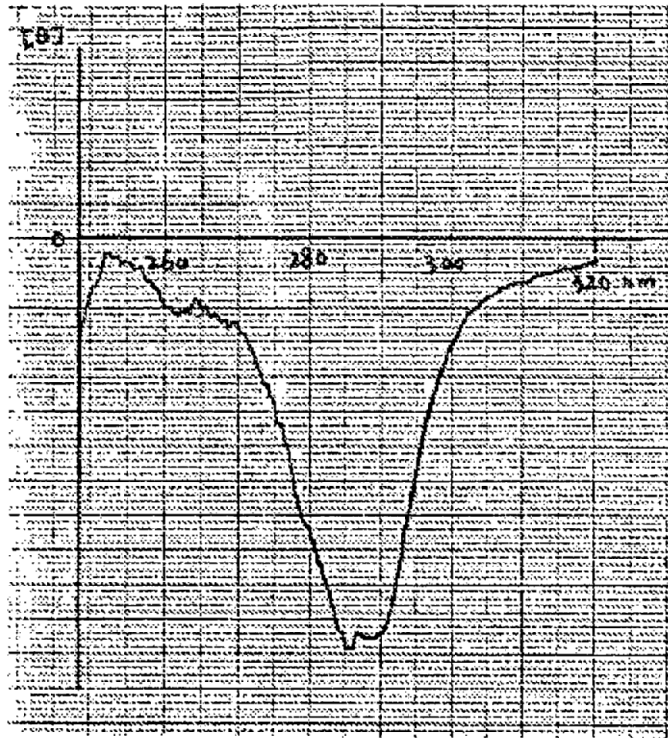


Figura 6-D

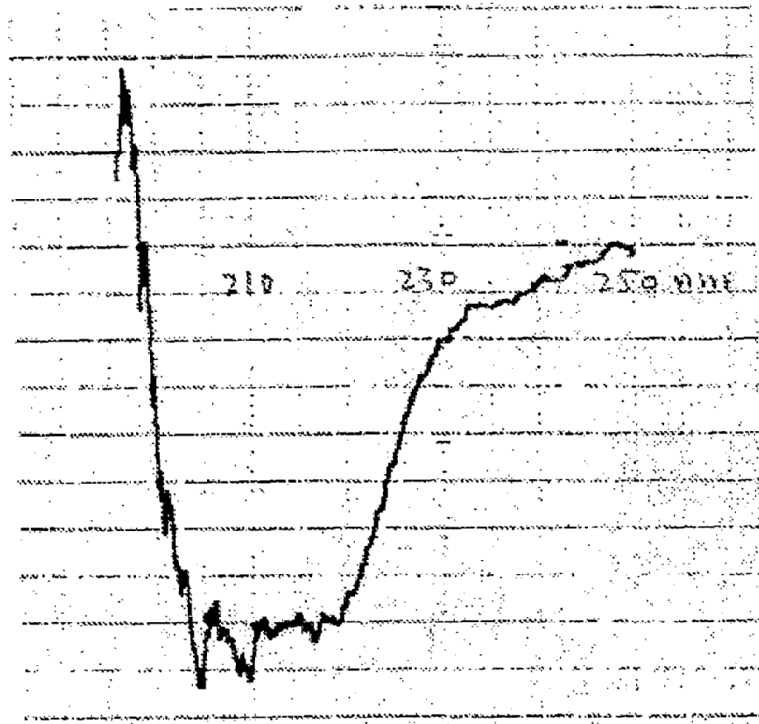


Figura 7A



Figura 7B

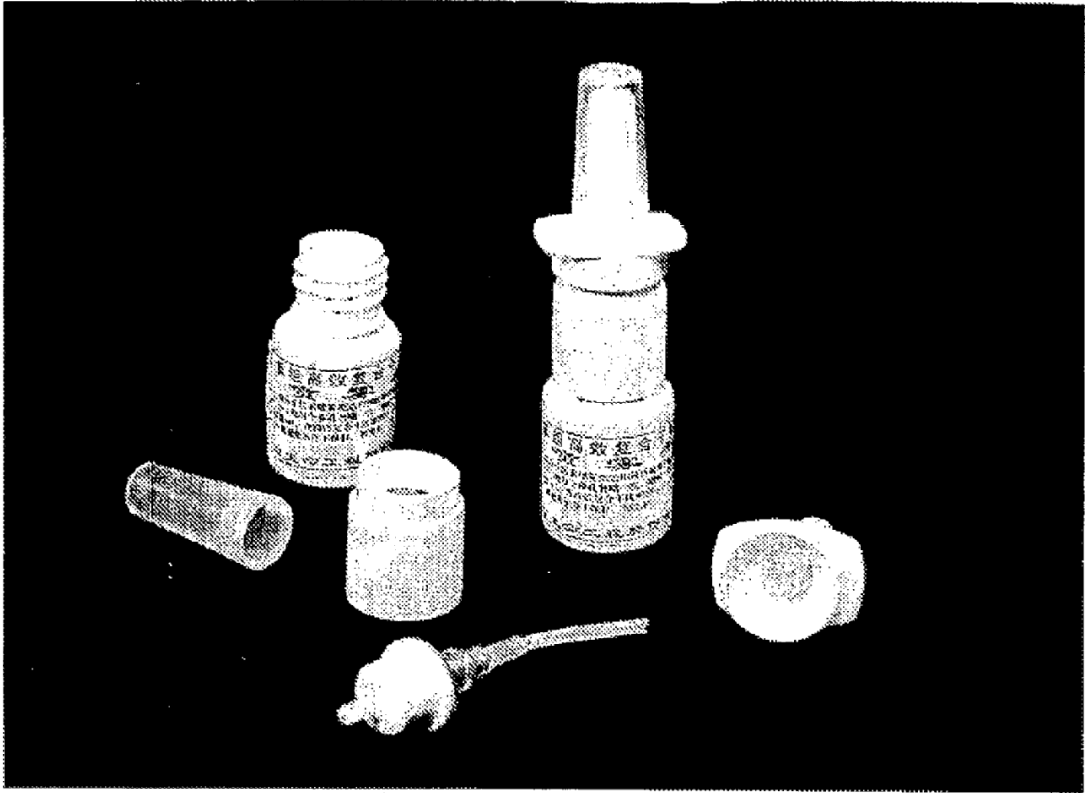


Figura 7C



Figura 7D

1. Pre-pulverizar

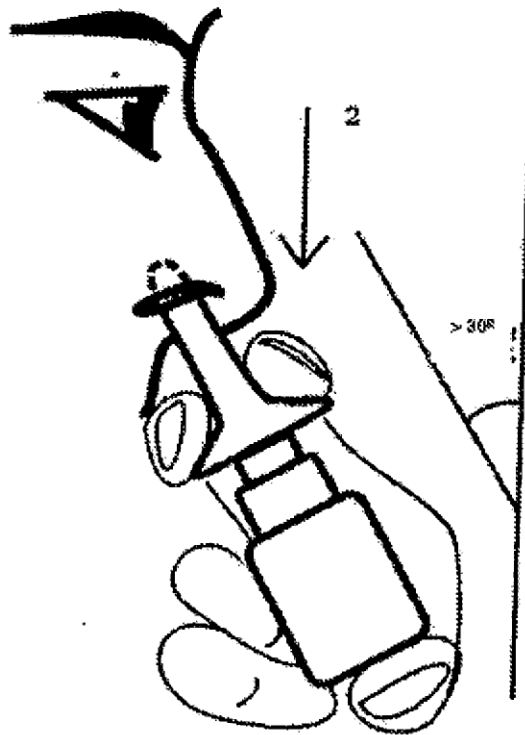
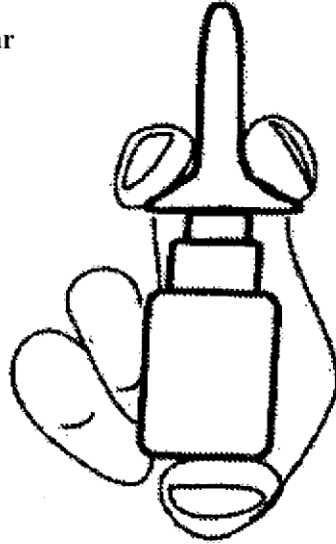


Figura 8

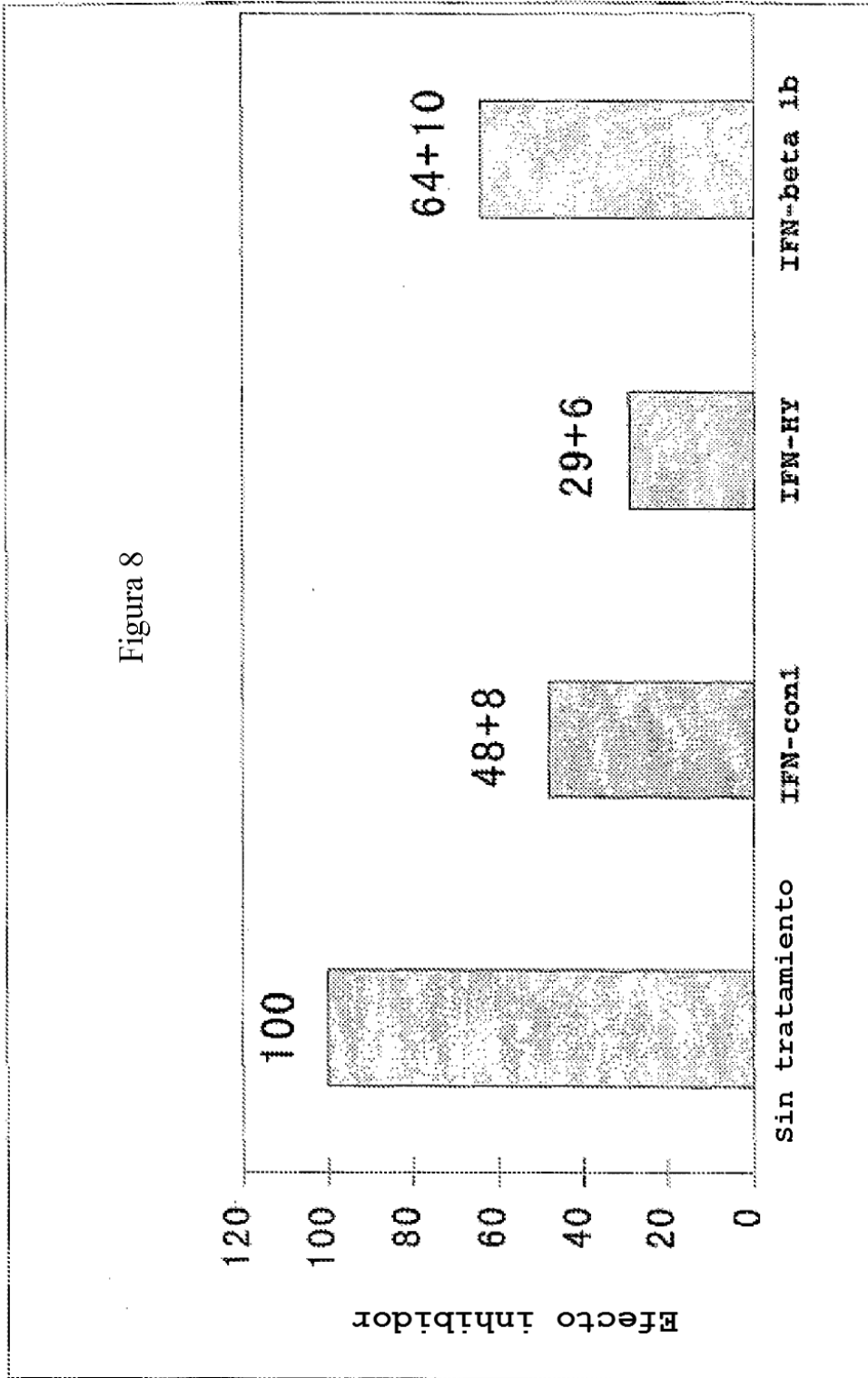


Figura 9A-1

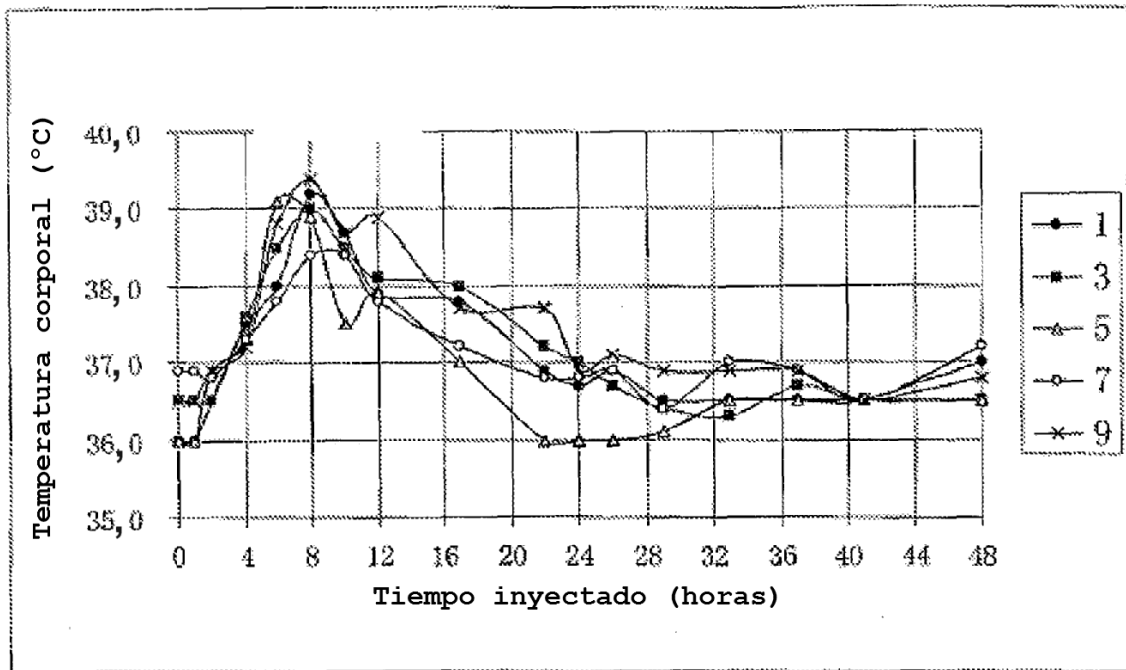


Figura 9A-2

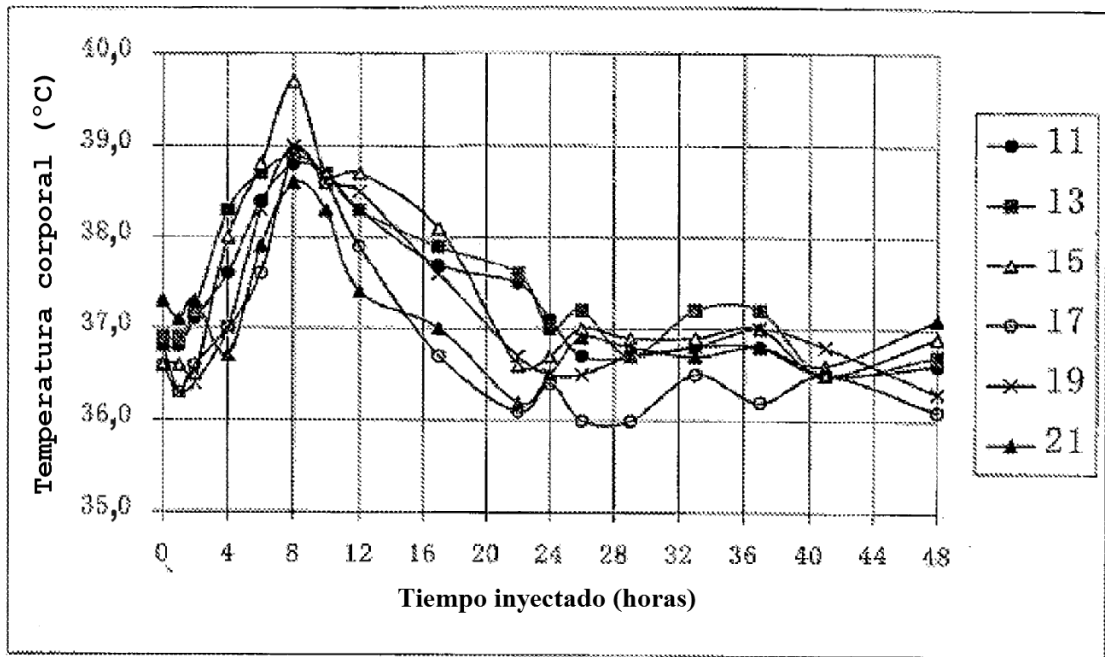


Figura 9B-1

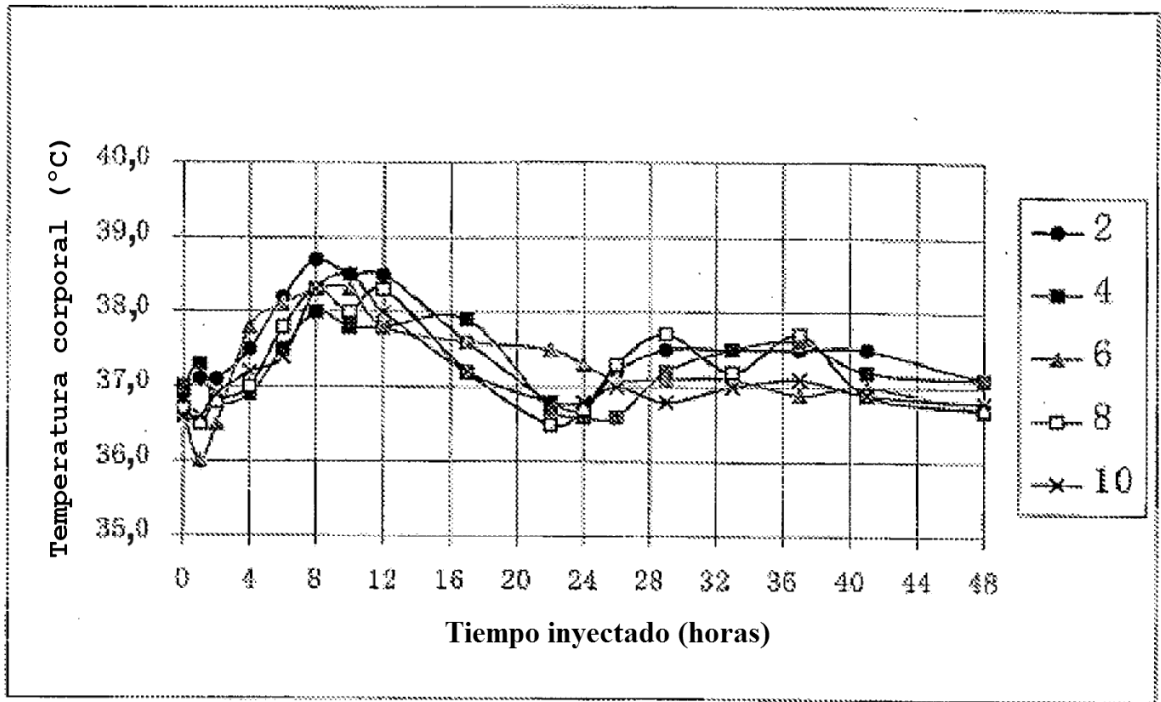


Figura 9B-2

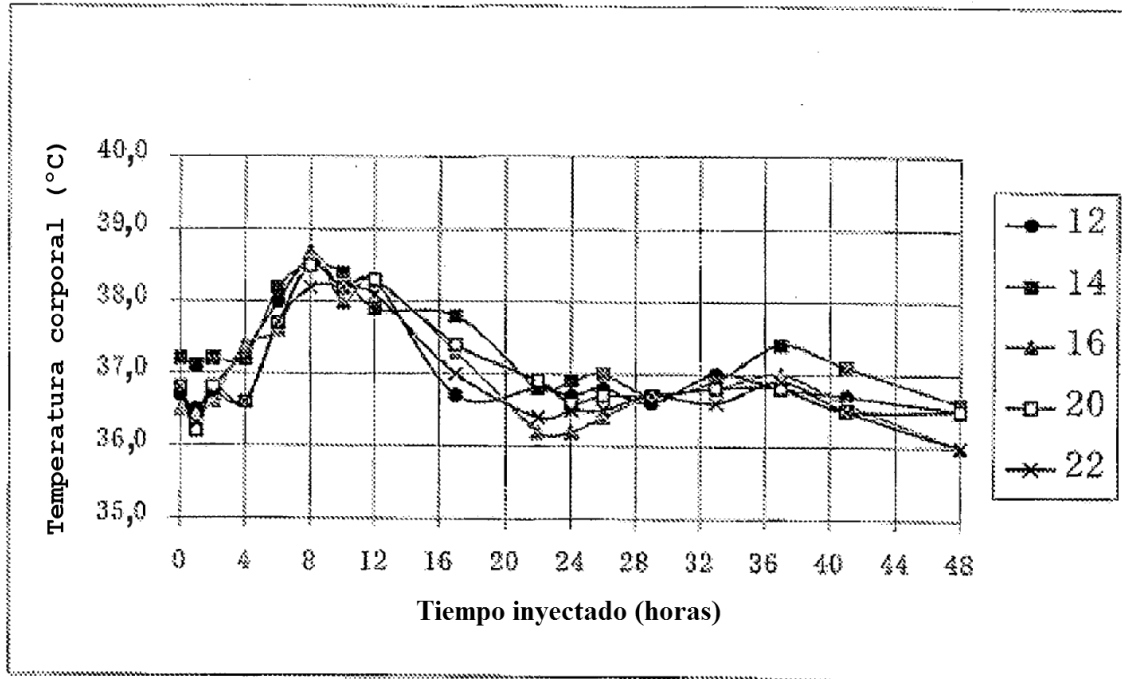


Figura 10

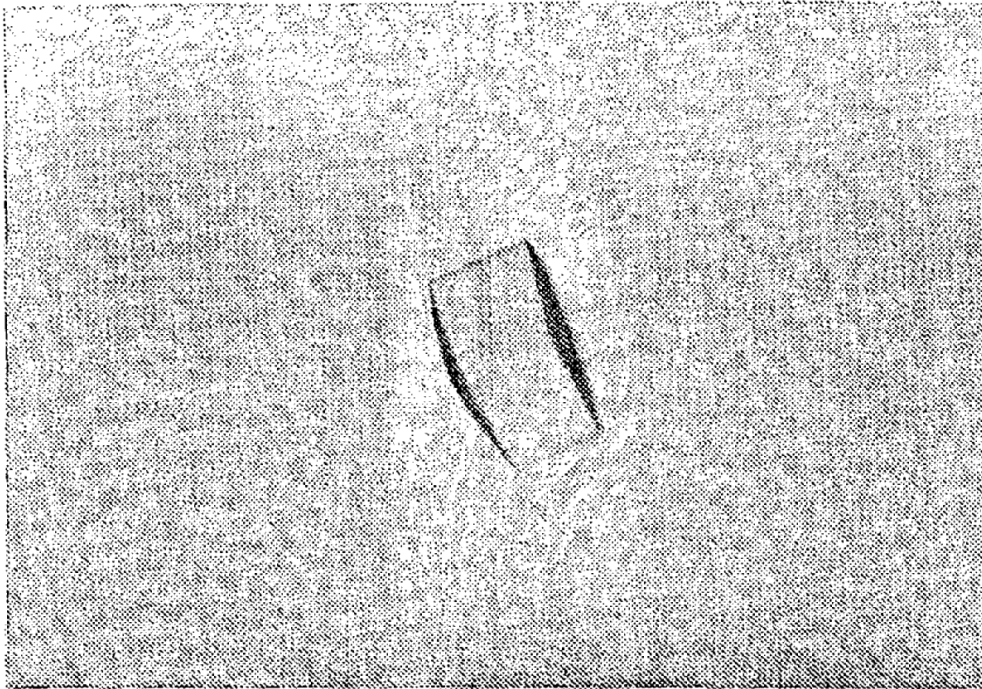


Figura 11

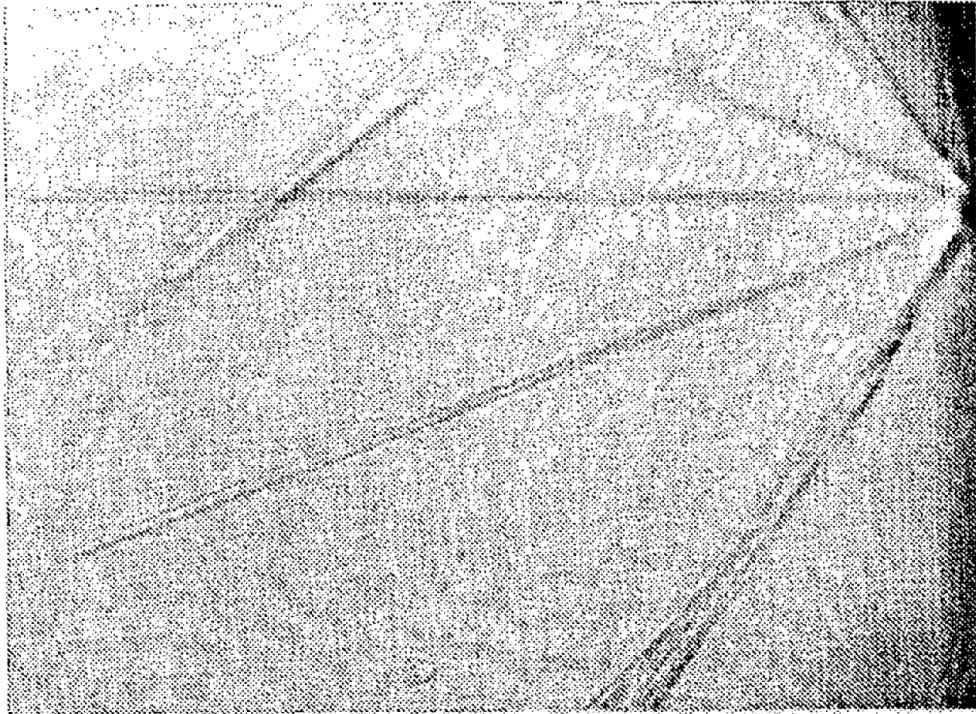


Figura 12

