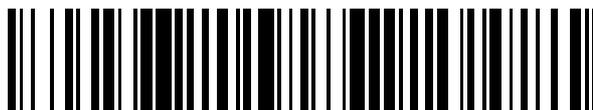


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 398**

51 Int. Cl.:

C12N 15/20 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C07K 14/555 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2007** E 12159128 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016** EP 2465935

54 Título: **Proteínas de tipo interferón humano recombinantes**

30 Prioridad:

18.06.2007 US 764786

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

14.10.2016

73 Titular/es:

NOVAGEN HOLDING CORPORATION (100.0%)
2nd Floor, The Grand Pavilion Commercial
Centre, 802 West Bay Road, P.O. Box 10338
George Town, Grand Cayman KY1-1003, KY

72 Inventor/es:

WANG, HAITAO;
MAO, CHUNSHENG;
LI, JIZHI;
WANG, LING;
DU, YONG;
LIU, LONGBIN;
XU, JING y
ZHANG, RUI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 586 398 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

Proteínas de tipo interferón humano recombinantes

5 **Campo de la invención**

Esta solicitud se refiere a proteínas recombinantes que tienen actividades biológicas de tipo interferón humano.

10 **Antecedentes**

En esta solicitud se ha adoptado la nomenclatura de interferón (IFN) publicada en *Nature* (1).

Los interferones humanos (HuIFN) que se descubrieron por Isaacs y Lindenmann en 1957 (2), son una familia bien conocida de citocinas secretadas por una gran variedad de células eucariotas tras la exposición a varios estímulos, tales como infección viral o exposición a mitógeno. Los IFN pueden provocar muchos cambios en el comportamiento celular, incluyendo efectos sobre el crecimiento celular y la diferenciación y modulación del sistema inmunitario (3-7). Los HuIFN se han clasificado en seis subgrupos, en concreto IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , IFN- ϵ e IFN- κ ; HuIFN- α (interferón derivado de leucocitos) se produce en células leucocitarias humanas y, junto con cantidades minoritarias de HuIFN- β (interferón derivado de fibroblastos), en células linfoblastoides. Los HuIFN se han clasificado adicionalmente por sus características químicas y biológicas en dos categorías generales, en concreto tipo I y tipo II. El tipo I consiste en los subgrupos IFN- α e IFN- β , así como los subgrupos recientemente descubiertos IFN- ω , IFN- ϵ e IFN- κ . El tipo II tiene solo un miembro: IFN- γ (interferón inmune).

Los diferentes subgrupos de interferón tienen diferentes características estructurales y biológicas. HuIFN- β es una glicoproteína unida a N (8, 9) que se ha purificado hasta homogeneidad y se ha caracterizado. Es heterogénea con respecto al tamaño, presumiblemente debido a su resto de carbohidrato. Sin embargo, existe solo un gen de IFN- β humano, que codifica para una proteína de 166 aminoácidos. IFN- β tiene una baja homología con IFN- α , compartiendo aproximadamente un 30-40 % de identidad.

Al contrario de la exclusividad del gen de IFN- β , HuIFN- α es un subgrupo que consiste en una familia de múltiples genes de 14 genes esencialmente. Variantes minoritarias preparadas a partir de diferencias de uno o dos aminoácidos representan los múltiples alelos (10). Excluyendo el pseudogén IFNAP22, existen 13 genes que codifican para 13 proteínas. Cada proteína comprende 165-166 aminoácidos. La proteína codificada por el gen IFNA13 es idéntica a la proteína IFNA1. Por tanto, existen 12 proteínas de interferón alfa individuales: IFNA 1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA14, IFNA16, IFNA17 e IFNA21. La identidad de secuencia de aminoácido entre subtipos de IFN- α tiene generalmente un 80-85 % de homología (11).

El IFN- ω maduro muestra un 60 % de homología de secuencia nucleotídica con la familia de especies de IFN- α pero es más largo en 6 aminoácidos en su extremo C terminal. IFN- ω está relacionado de manera más distanciada con el interferón- β (comparte alrededor de un 30 % de homología de secuencia). El IFN- ω humano no está clasificado en el grupo de IFN- α porque es antigénicamente distinto del IFN- α y difiere en su interacción con el receptor de IFN- α de tipo I (12). IFN- ω se secreta por leucocitos infectados con virus como un componente mayoritario de interferones de leucocitos humanos.

La proteína madura de IFN- ϵ contiene 185 aminoácidos, compartiendo aproximadamente un 33 % y un 37 % de homología de secuencia con IFN- $\alpha 2$ e IFN- β respectivamente (13, 14). La función y las propiedades biológicas de IFN- ϵ no se han caracterizado significativamente en detalle; sin embargo, funciona como los interferones de Tipo I. IFN- ϵ puede desempeñar también un papel en la función reproductora (15).

IFN- κ , una citocina humana de 180 aminoácidos es un IFN de Tipo I identificado recientemente. La secuencia codificante de IFN- κ es ~30 % idéntica a los otros interferones de Tipo I encontrados en seres humanos. Una característica distintiva de IFN- κ es la expresión constitutiva detectable de su transcripto en células no inducidas, particularmente queratinocitos. IFN- κ puede desempeñar un papel en la regulación de funciones inmunológicas sistémicas o locales a través de su efecto sobre células del sistema inmunitario innato (16). Sin embargo, IFN- κ muestra una baja actividad anti-viral (17).

El interferón de Tipo I humano parece unirse a dos subunidades de receptor, IFNAR-1 y -2, que están ampliamente distribuidas en la superficie celular de diversos tipos de células. La implicación de ligandos lleva a la inducción de la fosforilación de tirosina quinasas TYK2 y JAK-1 que se acoplan a IFNAR-1 y -2 respectivamente. Una vez fosforiladas, las proteínas STAT se liberan del receptor y forman homodímeros así como heterodímeros (18, 19). Una vez liberados, los dímeros de STAT se asocian con el Factor 9 Sensible a interferón (IRF-9), una proteína de unión a ADN, que forma un complejo denominado factor-3 de genes estimulados por IFN (ISGF-3) que migra al interior del núcleo. A continuación, el complejo ISGF-3 se une a un elemento de ADN que existe en el sentido 5' de todos los genes inducibles por IFN. Ésta es la denominada ruta de transducción de señales "clásica".

Nuevos modos de acción y rutas bioquímicas reguladas por IFN de Tipo I se están descubriendo continuamente. Por ejemplo, en el sentido 3' de P13K en la ruta de transducción de señales, el factor nuclear kappa-B (NF-κB) y PKC-d, se asocian con efectos anti-apoptóticos observados en neutrófilos incubados con IFN-β (20).

5 Más de 300 genes, denominados genes inducidos por interferón, son sensibles al tratamiento con IFN. Las proteínas de IFN más estudiadas son aquellas con propiedades anti-virales. Por ejemplo, la enzima de la familia de 2,5 oligosintetasa (OAS-1 y -2) cataliza la síntesis de oligoadenilatos cortos, que se unen a y activan la ARNasaL, una enzima que escinde ARN viral y celular, inhibiendo así la síntesis de proteínas. La proteína quinasa activada por ARNbc (PKR) fosforila el factor de iniciación de la traducción eIF2a, dando como resultado así la inhibición de síntesis de proteínas celulares y virales. Más recientemente, se descubrió también que PKR se requería para la activación del factor de transcripción NF-κB, un actor central en la inducción de citocinas inflamatorias, modulación inmunitaria, y apoptosis. Las proteínas Mx (de resistencia a mixovirus) inhiben la replicación de los virus de ARN mediante o bien evitando el transporte de partículas virales al interior de las células, o bien mediante la transcripción de ARN viral. La adenosina desaminasa específica de ARN (ADAR) convierte adenosina en inosina, provocando así una hipermutación de genomas de ARN virales (21).

Los HuIFN presentan un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo funciones anti-virus, antitumorales, y de inmunorregulación. Los potenciales clínicos de los interferones humanos se han explorado ampliamente y se resumen a continuación.

20 Con respecto a las aplicaciones antitumorales, los HuIFN pueden mediar efectos antitumorales o bien indirectamente mediante regulación de respuestas inmunomoduladoras y anti-angiogénicas o directamente afectando a la proliferación o diferenciación celular de células tumorales (22). La terapia con interferón se ha usado en el tratamiento de diversas leucemias (23), por ejemplo leucemia de células pilosas (24), leucemia mieloide aguda y crónica (25-27), osteosarcoma (28), carcinoma de células basales (29), glioma (30), carcinoma de células renales (31), mieloma múltiple (32), melanoma (33), sarcoma de Kaposi (23) y enfermedad de Hodgkin (34). La terapia de combinación de IFN-α con citarabina (ara-C), 5-FU, hidroxiura e IL-2 se han estudiado adecuadamente, principalmente mostrando resultados significativamente mejores que el HuIFN-α solo (3). También se ha notificado el tratamiento sinérgico de cáncer avanzado con una combinación de HuIFN y temozolomida (35).

30 Con respecto a las aplicaciones anti-virus, los HuIFN se han usado clínicamente para terapia anti-viral, por ejemplo, en el tratamiento del SIDA (36), hepatitis viral incluyendo hepatitis B crónica, hepatitis C (37, 38), infección por el virus del papiloma (39), infección por virus del herpes (40), encefalitis viral (41), y en la profilaxis de rinitis e infecciones respiratorias (40).

35 Los HuIFN se han usado también clínicamente para terapia antibacteriana (42), por ejemplo, HuIFN-γ aerosolizado (43) y HuIFN-α se han usado en pacientes con tuberculosis pulmonar resistente a múltiples fármacos (44). Los HuIFN-γ se han usado en el tratamiento de tuberculosos resistente a múltiples fármacos del cerebro (45).

40 Los HuIFN se han usado también clínicamente para terapia de inmunomodulación por ejemplo, para prevenir el rechazo de injerto contra el huésped, o para cercenar la progresión de enfermedades autoinmunitarias, tales como esclerosis múltiple (46, 47) y síndrome de Sjogren (48). IFN-β está aprobado por la FDA en los Estados Unidos para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Recientemente se ha informado de que pacientes con esclerosis múltiple tienen una producción disminuida de interferones de Tipo I e interleucina-2 (49). Además, la terapia de inmunomodulación con HuIFN-α parece ser una terapia eficaz en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) que recaen tras trasplante de médula ósea (50).

50 Con respecto a la adyuvación con vacunas, los HuIFN se han usado clínicamente como un adyuvante en el tratamiento del melanoma (51) y pueden usarse también como un adyuvante o coadyuvante para potenciar o simular la respuesta inmunitaria en casos de vacunación profiláctica o terapéutica para muchas otras enfermedades (52).

55 HuIFN-α2a fue el primer inhibidor de la angiogénesis para usarse en ensayos clínicos y fue eficaz en niños para el tratamiento de hemangiomas potencialmente mortales (53, 54). Otra indicación clínica es un tumor de células gigantes del hueso. Kaban y col. notificaron la regresión drástica de un tumor de células gigantes recurrente de rápido crecimiento, grande, de la mandíbula (55).

Aunque los HuIFN tienen muchas aplicaciones clínicas importantes, no muestran efectos secundarios significativos ni otras limitaciones. La mayoría de las citocinas, incluyendo los HuIFN, tienen semividas en circulación relativamente cortas puesto que se producen *in vivo* para actuar localmente y de forma transitoria. Puesto que se administran normalmente como agentes terapéuticos sistémicos, los HuIFN necesitan administrarse frecuentemente y en dosis relativamente grandes. Las administraciones parenterales frecuentes son inconvenientes y dolorosas. Además, los efectos secundarios tóxicos asociados con la administración de HuIFN son con frecuencia tan graves que algunas personas no pueden tolerar el tratamiento. Estos efectos secundarios están probablemente asociados con la administración sistémica de altas dosificaciones. Además, en estudios clínicos se ha encontrado que algunos pacientes producen anticuerpos frente a rHuIFN, lo que neutraliza su actividad biológica (56).

Claramente, el desarrollo de proteínas de interferón novedosas con potencia aumentada es urgentemente necesario para numerosas aplicaciones, por ejemplo, terapias contra el cáncer, así como anti-virales, inmunoterapia, antiparasitarias, antibacterianas o cualquier afección médica o situación en la que se requieran una actividad de interferón aumentada y/o efectos secundarios reducidos. En general, es altamente probable que los HuIFN desempeñen un papel principal en la próxima generación de terapias antitumorales y anti-virales novedosas (10).

Es bien conocido en la técnica que la mayoría de los medios eficientes para mejorar las propiedades farmacéuticas de fármacos y citocinas es mutar la propia proteína citocina. Varias estrategias y técnicas para mutar péptidos de interferón han evolucionado con el tiempo. En general, actualmente se usan tres estrategias para crear mutantes de HuIFN- α .

La primera estrategia es preparar híbridos de IFN. Algunos investigadores han aprovechado la presencia de sitios de escisión de endonucleasa de restricción (RE) que se produce de forma natural dentro de secuencias codificantes de IFN para montar fragmentos codificantes homólogos (57, 58). La producción de varios IFN híbridos se ha revisado por Horisberger y Di Marco (11); este artículo que proporciona una visión general del proceso de construcción de tales moléculas. Se describen ejemplos específicos de métodos para la construcción de interferones híbridos. Algunos investigadores han aprovechado la amplificación de PCR para construir IFN- α mutantes para así crear fragmentos en ácido nucleico deseados específicamente, y entonces obtener el potencial de montar nuevas piezas de diferentes IFN (59). La Patente de los Estados Unidos N° 6.685.933 (60) describe también técnicas de amplificación por PCR para preparar híbridos de IFN humanos. Los híbridos de interferón pueden crearse dentro de un subgrupo de interferón, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.137.720 (61) y la Patente de los Estados Unidos N° 6.685.933 (60) o de entre al menos dos grupos de clasificación de interferón diferentes, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 6.174.996 (62) y la Patente de los Estados Unidos N° 6.685.933 (60). Además, los genes originales del híbrido pueden proceder de una especie (principalmente del ser humano), por ejemplo, híbridos entre HuIFN- α y HuIFN- ω , o de más de una especie animal, por ejemplo, híbridos entre interferones- α humano y murino (63).

Una segunda estrategia para construir mutantes de interferón es usar la mutagénesis puntual dirigida al sitio introduciendo cambios de uno o más nucleótidos en moléculas de ADN de IFN (64). Recientemente, se usan métodos computacionales y de mutación sistemática como una guía para la mutagénesis de proteínas (65).

Una tercera estrategia para la construcción de HuIFN de Tipo I es redistribuir fragmentos génicos de IFN que se crean mediante digestión con RE, amplificación por PCR, síntesis química o digestión con ADNasa, seguido de PCR para montar aleatoriamente los fragmentos y luego amplificarlos. Los productos de PCR resultantes son de hecho un conjunto de fragmentos génicos de interferón alfa redispuestos que pueden usarse para construir una biblioteca de ADN, a partir de la cual pueden aislarse clones de ADN con fenotipos deseados (66). Por ejemplo, Chang y col. han descrito un método para construir y seleccionar una biblioteca de redistribución de HuIFN para identificar derivados de HuIFN con actividades anti-virales y anti-proliferación aumentadas en células de ratón (67).

El Interferón humano alfacon-I (interferón consenso) es un HuIFN- α que se produce de forma no natural recombinante con 166 aminoácidos. Se ha generado evaluando los aminoácidos más altamente conservados en cada región correspondiente basándose en las secuencias de HuIFN- α clonadas conocidas. Tiene un 89 % de homología de secuencia a nivel de aminoácidos con HuIFN- α 2b y una actividad anti-viral específica de aproximadamente 10^9 UI/mg. El Interferón humano alfacon-1 se ha aprobado para el tratamiento de infección crónica por VHC en pacientes de 18 años o mayores con enfermedad hepática compensada (68).

Aunque algunas proteínas de interferón recombinantes se conocen en la técnica anterior, existe una necesidad de nuevas proteínas de tipo interferón y composiciones de proteína que tengan actividades biológicas potenciadas.

Sumario de la invención

De acuerdo con la invención se divulga un polinucleótido aislado que codifica para una proteína que tiene actividades biológicas de tipo interferón humano, el polinucleótido comprende una secuencia nucleotídica al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones la secuencia nucleotídica es al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

En una realización, la invención comprende una proteína que muestra actividades biológicas de tipo interferón humano, seleccionándose dicha proteína del grupo que consiste en proteínas que comprenden cada una una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 2. Preferentemente la proteína no se produce naturalmente tiene una actividad anti-viral y anti-proliferativa potenciada en comparación con el interferón alfa 2b humano (HuIFN- α 2b). Por ejemplo, la proteína puede tener una actividad anti-viral al menos 2 veces mayor que HuIFN- α 2b y una actividad anti-proliferativa al menos 10 veces mayor que HuIFN- α 2b. En realizaciones particulares la secuencia de aminoácidos de proteína es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

La invención abarca también fragmentos de polipéptidos que muestran actividades biológicas de tipo interferón

humano. La invención incluye además constructos de proteína y otras composiciones que muestran actividades biológicas de tipo interferón, tal como conjugados que comprenden la proteína y otro resto, tal como un polímero inorgánico. La invención incluye además métodos y usos de la proteína y las composiciones para fines terapéuticos, por ejemplo como agentes anti-virales o anticancerígenos. La invención puede usarse también para el tratamiento de otras afecciones que responden a la terapia con interferón.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 representa una secuencia de ADN completa que codifica para una proteína novedosa de la invención denominada en el presente documento Novaferon™ (SEQ ID NO: 1) (A). La Figura 1 muestra también la secuencia de aminoácidos predicha de Novaferon (SEQ ID NO: 2) (B) y la alineación de la secuencia de aminoácidos de Novaferon con la secuencia de ADN de Novaferon (C). El primer aminoácido, cisteína, en la proteína de Novaferon madura se designa como residuo 1.

La Figura 2 muestra la alineación de secuencia nucleotídica del gen de Novaferon con el gen de HuIFN- α 14 (número de Genebank: NM_002172) (A) y la alineación de secuencia de aminoácidos de la proteína de Novaferon con la proteína de HuIFN- α 14 (traducida, número de Genebank: NM_002172) (B). El primer aminoácido, cisteína, en la proteína de Novaferon madura se designa como residuo 1. Novaferon comparte aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia (462/498) con HuIFN- α 14 a nivel de nucleótidos y aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia (144/166) a nivel de aminoácidos. Los nucleótidos divergentes se indican con un blanco en la línea central.

La Figura 3 muestra alineación de secuencia nucleotídica del gen de Novaferon con el gen de HuIFN- α 2b (número de Genebank: NM_000605) (A) y la alineación de secuencia de aminoácidos de la proteína de Novaferon con la proteína de HuIFN- α 2b (traducida a partir del gen HuIFN- α 2b, con número de Genebank: NM_000605) (B). El primer aminoácido, cisteína, en la proteína de Novaferon madura se designa como residuo 1. Novaferon comparte aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia (445/498) con HuIFN- α 2b a nivel de nucleótidos y aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia (135/166) a nivel de aminoácidos. Nucleótidos divergentes se indican con un blanco en la línea central.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la inhibición anti-proliferativa *in vitro* de células Daudi por Novaferon en comparación con HuIFN- α 2b.

La Figura 5 es un gráfico que muestra los efectos antitumorales *in vivo* de Novaferon y HuIFN- α 2b en ratones atímicos con xenoinjertos de PC-3 de cáncer de próstata humano.

La Figura 6 es un gráfico que muestra los efectos antitumorales *in vivo* de Novaferon y HuIFN- α 2b en ratones atímicos con xenoinjertos de Hep G2 de cáncer de hígado humano.

La Figura 7 es un gráfico que muestra los efectos antitumorales *in vivo* de Novaferon y HuIFN- α 2b en ratones atímicos con xenoinjertos de A-375 de melanoma humano.

La Figura 8 es un gráfico que muestra los efectos antitumorales *in vivo* de Novaferon y HuIFN- α 2b en ratones atímicos con xenoinjertos de LS 180 de cáncer de colon.

La Figura 9 es un gráfico que muestra los efectos antitumorales *in vivo* de Novaferon y HuIFN- α 2b en ratones atímicos con xenoinjertos de HL 60(S) de leucemia humana.

Descripción detallada

A lo largo de la siguiente descripción se exponen detalles específicos con el fin de proporcionar una comprensión más exhaustiva de la invención. Sin embargo, la invención puede ponerse en práctica sin estos detalles. En otros casos, elementos bien conocidos no se han mostrado ni descrito en detalle para evitar obscurecer innecesariamente la invención. Por consiguiente, la memoria descriptiva y los dibujos han de considerarse en un sentido ilustrativo más que restrictivo.

Definición de términos

Antes de describir la presente descripción en detalle, ha de entenderse que esta invención no se limita a las moléculas de proteína particulares, metodología, protocolos, líneas celulares, vectores y reactivos descritos como tal pueden variar. Ha de entenderse también que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que se limitará solo por las reivindicaciones adjuntas.

Con el fin de hacerse entender más completamente la invención que se describe en el presente documento, se

emplean los siguientes términos y se pretende que se definan tal como se indica a continuación. Ha de entenderse que la terminología que se usa en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que se limitará solo por las reivindicaciones adjuntas.

5 El término "interferón" se refiere a una familia de proteínas secretadas producidas por varias células eucariotas tras la exposición a varios estímulos ambientales, incluyendo infección por virus o exposición a un mitógeno. Además de tener propiedades anti-virales, se ha mostrado que los interferones afectan a una amplia variedad de funciones celulares. Todas las unidades de interferón se expresan en el presente documento con referencia a las normas internacionales de la OMS, 94/786 (rHuIFN- α consenso) y 95/650 (rHuIFN- α 2a).

15 El término "de tipo interferón" se refiere a características funcionales y/o estructurales mostradas por, o similares a, interferones conocidos o análogos de interferón. Por ejemplo, "actividades biológicas de tipo interferón" incluye actividades anti-virales y anti-proliferativas. Otros ejemplos de actividades biológicas de tipo interferón se describen en el presente documento y se entenderán por un experto en la técnica. El término plural "actividades" incluye el término singular "actividad"; es decir, la invención abarca proteínas recombinantes o constructos de proteína o composiciones que muestran al menos una actividad de tipo interferón.

20 El término "interferón consenso" se refiere a un tipo de interferón sintético que tiene una secuencia de aminoácidos que es un promedio aproximado de las secuencias de todos los subtipos de interferón alfa humano conocidos. Se ha notificado que el interferón consenso tiene una actividad anti-viral mayor (aproximadamente 5 veces), anti-proliferación y de activación de células NK, que cualquier subtipo de IFN- α humano natural.

25 El término "aislado" tal como se usa en el presente documento se refiere a moléculas tales como ADN o ARN, que se han retirado de su entorno nativo. Por ejemplo, moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Ejemplos adicionales de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células huésped heterólogas o moléculas de ADN purificadas (parcial o sustancialmente) en solución. Es decir ADN "aislado" incluye moléculas de ADN recuperadas a partir de una biblioteca que puede contener fragmentos de ADN naturales o artificiales de interés, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente. Los ácidos nucleicos aislados pueden por lo tanto producirse de manera recombinante.

35 La expresión "secuencia nucleotídica" se refiere a una secuencia nucleotídica que comprende un oligonucleótido, polinucleótido o molécula de ácido nucleico, y fragmentos o porciones de los mismos. En el caso de una molécula de ADN, la secuencia puede comprender una serie de desoxirribonucleótidos y en el caso de una molécula de ARN la secuencia puede comprender una serie correspondiente de nucleótidos. El oligonucleótido, polinucleótido o molécula de ácido nucleico pueden ser monocatenarios o bicatenarios y la secuencia nucleotídica puede representar la hebra sentido o antisentido.

40 Las expresiones "fragmento de oligonucleótido" o un "fragmento de polinucleótido", "porción" o "segmento" o "sonda" o "cebador" se usan de manera intercambiable y se refieren a una secuencia de residuos de nucleótidos que tienen aproximadamente al menos 5 nucleótidos de longitud. Preferentemente los fragmentos pueden usarse para hibridar con una secuencia nucleotídica diana. Un cebador sirve como un punto de iniciación para la polimerización de nucleótidos catalizada o bien por ADN polimerasa, ARN polimerasa o bien transcriptasa inversa. Un fragmento o segmento pueden identificar únicamente cada secuencia polinucleotídica de la presente invención. Preferentemente el fragmento comprende una secuencia sustancialmente similar a SEQ ID NO: 1.

50 Los términos "proteína" o "péptido" u "oligopéptido" o "polipéptido" se refieren a moléculas sintéticas o que se producen de forma natural que comprenden una secuencia de aminoácidos.

La expresión "marco de lectura abierto" u ORF, significa una serie de tripletes de nucleótidos que codifican para aminoácidos sin codón de terminación alguno y habitualmente indica una secuencia traducible en una proteína.

55 La expresión "secuencia codificante de proteína madura" se refiere a una secuencia que codifica para una proteína o péptido sin una secuencia señal o líder. La proteína puede haberse producido mediante procesamiento en la célula que elimina cualquier secuencia líder/señal. La proteína puede producirse de forma sintética o usando un polinucleótido que codifica solamente para la secuencia codificante de proteína madura.

60 Las expresiones "purificado" o "sustancialmente purificado" tal como se usan en el presente documento significan que la proteína indicada está presente en ausencia sustancial de otras moléculas biológicas, por ejemplo, otras proteínas, polipéptidos y similares. La proteína se purifica de manera que constituye al menos un 95 % en peso de las macromoléculas biológicas indicadas presentes (pero pueden estar presentes agua, tampones, y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tienen un peso molecular inferior a 1000 daltons).

65 La expresión "vehículo de expresión recombinante o vector" se refiere a un plásmido o fago o virus o vector, para expresar una proteína a partir de una secuencia de ADN (ARN). Un vehículo de expresión puede comprender una

- unidad transcripcional que comprende un conjunto de (1) un elemento genético o elementos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en una proteína, y (3) secuencias de iniciación y de terminación de la transcripción apropiadas. Las unidades estructurales pretendidas para su uso en levadura o sistemas de expresión eucariota, preferentemente incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de proteínas traducidas por una célula huésped. Como alternativa, cuando la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo metionina amino terminal. Este residuo puede escindirse o no posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.
- La expresión "similitud sustancial" se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo que tiene un alto grado de identidad de secuencia con otro ácido nucleico cuando se alinean de manera óptima con el otro ácido nucleico o su cadena complementaria. La identidad de secuencia un homología puede determinarse usando software de análisis de secuencia, por ejemplo, BLASTN. Un primer ácido nucleico se considera que es sustancialmente similar a un segundo ácido nucleico si muestran una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 85-95 % o superior cuando están alineados de forma óptima. Por ejemplo, para determinar la identidad de secuencia u homología entre dos ácidos nucleicos diferentes, se usa el programa BLASTN "secuencias BLAST 2". Este programa se encuentra disponible para el uso público en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) en Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) (69). A modo de ejemplo no limitativo, pueden hacerse comparaciones de este tipo usando el software configurado en los ajustes por defecto (expect=10, filter=default, open gap =5, extension gap=2 penalties, gap x dropoff=50). Igualmente, una primera proteína o polipéptido se considera que es sustancialmente similar a una segunda proteína o polipéptido si muestran una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 85 %-95 % o superior cuando están alineadas de manera óptima y se comparan usando el software BLAST (blastp) usando los ajustes por defecto.
- A modo de ilustración adicional, un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia nucleotídica de referencia que codifica para una proteína, significa que la secuencia nucleotídica del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia nucleotídica de referencia que codifica para la proteína. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia nucleotídica al menos un 95 % idéntica a una secuencia nucleotídica de referencia, hasta el 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden deleccionarse o sustituirse por otro nucleótido, o varios nucleótidos hasta el 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia.
- Los términos "complementario" o "complementariedad", tal como se usan en el presente documento, se refieren a la unión natural de polinucleótidos en condiciones de temperatura y de sal permisivas mediante apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" se une a la secuencia complementaria "T-C-A". La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser "parcial", en la que solo algunos de los ácidos nucleicos se unen, o puede ser completa cuando existe complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos por la eficiencia y la fuerza de hibridación entre hebras de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en reacciones de amplificación que dependen de la unión entre hebras de ácido nucleico.
- El término "transformación" significa introducir ADN en un organismo de modo que el ADN pueda replicarse, o bien como un elemento extra cromosómico, o bien mediante integración cromosómica. El término "transfección" se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula huésped adecuada, ya se expresen o no de hecho alguna secuencia codificante.
- Los términos "tratamiento" o "tratar" y equivalentes gramaticales de los mismos se usan en el sentido más amplio e incluyen tratamiento terapéutico, prevención, profilaxis y mejora de ciertos síntomas indeseados o estados.
- Las expresiones "biológicamente activo" y "actividades biológicas" tal como se usan en el presente documento, se refieren a funciones estructurales, reguladoras, bioquímicas u otras funciones biológicas en sistemas vivos, por ejemplo similares o idénticos a moléculas que se producen de forma natural o de forma no natural.
- La expresión "anti-proliferación" y "anti-proliferativo" tal como se usa en el presente documento se refieren a ralentizar y/o prevenir el crecimiento y la división de células, dando como resultado la reducción del número de células totales y/o la reducción del porcentaje de las células diana en cualquiera de todas las fases del ciclo celular. Puede especificarse adicionalmente que las células se detienen en una fase particular del ciclo celular: G1 (Gap 1), fase S (síntesis de ADN), G2 (Gap 2) o fase M (mitosis). La expresión "actividad anti-proliferativa" tal como se usa en el presente documento se refiere a la actividad de una proteína, constructo de proteína, o composición que muestra proliferación celular, especialmente proliferativa de células neoplásicas, por ejemplo, células cancerosas, o bien *in vitro* o bien *in vivo*.
- La expresión "antitumoral" o "anticancerígeno" tal como se usa en el presente documento se refiere a contrarrestar o prevenir la formación de tumores malignos. La "actividad antitumoral" o "actividad anticancerosa" cuando se usa en el presente documento se refiere a la actividad de una proteína, constructo de proteína, o composición que presenta

proliferación celular, especialmente proliferación de células neoplásicas, por ejemplo, de células cancerosas, o bien *in vitro* o bien *in vivo*.

5 El término "CI₅₀" o la "concentración inhibidora máxima media", representa la concentración de un inhibidor, tal como una proteína, que se requiere para una inhibición del 50 % del crecimiento celular *in vitro*.

10 Los términos "anti-viral" y "anti-virus" tal como se usan en el presente documento se refieren a ralentizar y/o prevenir infección por virus de células o interferir con la replicación del virus en células *in vitro* y/o *in vivo*, dando como resultado una ralentización o detención de la propagación del virus, o la reducción del número total de partículas de virus. La "actividad anti-viral" como se usa en el presente documento significa la actividad de una proteína, constructo de proteína, o composición que inhibe infecciones virales o interferencias con la replicación viral, o bien *in vitro* y/o *in vivo*.

15 Proteína de Novaferon

La presente invención se refiere a la preparación y caracterización de una proteína de tipo interferón humano novedosa, denominada en el presente documento "Novaferon™". Tal como se describe en detalle a continuación, la proteína de Novaferon presenta actividades biológicas anti-virales y anti-proliferativas potenciadas en comparación con HulFN- α 2b que se produce de forma natural tal como se mide en pruebas *in vitro* convencionales. En particular, 20 la proteína de Novaferon muestra un aumento de 12,5 veces en la actividad anti-viral cuando se somete a ensayo en un sistema Wish-VSV, y aproximadamente una mejora de 400 veces en la inhibición anti-proliferativa del crecimiento de células Daudi en comparación con HulFN- α 2b en los mismos sistemas de ensayo.

25 En una realización, la proteína de Novaferon se codifica por un polinucleótido que consiste en 498 nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1 y la Figura 1(A). La proteína de Novaferon madura consiste en 166 aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y la Figura 1(B). Las secuencias polinucleotídicas y aminoácidos y variantes de las mismas que se abarcan por la invención se describen en más detalle a continuación.

30 Para fines de comparación, la homología de Novaferon con HulFN que se producen de forma natural se exploró por los inventores. Búsquedas con BLAST revelaron que el Novaferon tiene la mayor homología con HulFN- α 14 a niveles tanto de nucleótidos como de aminoácidos. Tal como se muestra en la Figura 2, la secuencia polinucleotídica (SEQ ID NO: 1) que codifica para Novaferon tiene una homología de aproximadamente el 93 % (462/498) con HulFN- α 14 y la secuencia de aminoácidos tiene una homología de aproximadamente el 87 % (144/166) con HulFN- α 14. En comparación con HulFN- α 2b, el producto de interferón humano más ampliamente usado, la homología es 35 de aproximadamente el 89 % a nivel de nucleótidos (445/498) y aproximadamente el 81 % (135/166) a nivel de aminoácidos como tal como se muestra en la Figura 3.

40 Con respecto al IFN sintético alfacon-1 (interferón consenso), Novaferon tiene aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia a nivel de nucleótidos (453/498) y aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos (140/166).

45 Tal como se describe en detalle en la sección experimental a continuación, la secuencia polinucleotídica (SEQ ID NO: 1) se seleccionó de la biblioteca de redistribución de ADN de interferón humana de Tipo I. En resumen, la proteína de Novaferon se produjo mediante transfección de células huésped con un vector recombinante que contenía la secuencia polinucleotídica completa de SEQ ID NO: 1. La proteína de Novaferon contenida en el sobrenadante de la línea de células huésped se purificó y se mostró que presentaba actividades biológicas de tipo interferón humano, tal como funciones anti-virales y anti-proliferativas.

50 Polinucleótido y variantes

La secuencia polinucleotídica novedosa/molécula de ácido nucleico de la presente invención consiste en 498 nucleótidos tal como se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). Usando la información proporcionada en el presente documento tal como la secuencia nucleotídica, una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica 55 para una proteína de Novaferon (SEQ ID NO: 2) puede obtenerse mediante expresión recombinante, síntesis química o usando otros procedimientos de biología molecular convencionales, tal como aquellos para la mutagénesis de ADN.

60 La invención, además de la molécula de ácido nucleico aislada (SEQ ID NO: 1), incluye también moléculas de ADN que tienen secuencias que son diferentes de la secuencia de ADN dada a conocer en la SEQ ID NO: 1 pero, debido a la degeneración del código genético, codifican todavía para la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos de la proteína de Novaferon (SEQ ID NO: 2). Los códigos genéticos y preferencias de codones específicas de especies se conocen bien en la técnica. Por lo tanto sería rutinario para un experto en la técnica generar las variantes degeneradas de secuencias de ADN diferentes a partir de la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 1, por ejemplo para optimizar la expresión de codón para un huésped particular (por ejemplo para cambiar 65 codones en el ARNm humano por aquéllos preferidos por un huésped bacteriano tales como *E. coli*).

La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia nucleotídica que se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) o una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de ácido nucleico en SEQ ID NO: 1. La presente invención también proporciona información sobre y se refiere a los vectores recombinantes, que incluyen las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención y a células huésped que contienen los vectores recombinantes, así como a los métodos para preparar tales vectores y crear células huésped que expresan la proteína de Novaferon, y usar las células huésped para la producción de Novaferon mediante técnicas recombinantes.

Basándose en la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención (SEQ ID NO: 1, Figura 1 (A)), la invención abarca moléculas de ácido nucleico que son sustancialmente similares a la misma, tal como ácidos nucleicos que tienen al menos un 95 % o mayor de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, cuando están alineadas de manera óptima. Por ejemplo, en un aspecto, los ácidos nucleicos que tienen aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID NO: 1 se encuentran dentro del alcance de la invención.

Tales moléculas de ácido nucleico podrían usarse por ejemplo como sondas para la detección del ARNm en células ya transfectadas con un vector que contiene la secuencia nucleotídica de la presente invención para la producción de Novaferon. En otras palabras estas secuencias de ácido nucleico al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 podrían usarse como marcadores para determinar la expresión de los genes heterólogos en una célula huésped.

Además de la secuencia de ácido nucleico dada a conocer en la SEQ ID NO: 1 que codifica para la proteína de Novaferon, la presente invención incluye también, pero no se limita a, secuencias de ácido nucleico que codifican para la secuencia de aminoácidos de la proteína de Novaferon completa junto con aminoácidos adicionales / péptidos / polipéptidos, por ejemplo en una secuencia líder secretora añadida.

También están incluidas en la presente invención las secuencias de ácido nucleico que tienen la secuencia de ácido nucleico que se da a conocer en la SEQ ID NO: 1 así como secuencias adicionales, no codificantes, que incluyen, por ejemplo pero no de manera limitativa, intrones y secuencias en 5' y 3' no codificantes, tal como la secuencias transcritas, no traducidas que desempeñan un papel en la transcripción, procesamiento de ARNm (es decir señales de poliadenilación y corte y empalme, unión a ribosoma y estabilidad de ARNm), y secuencias codificantes adicionales que codifican para aminoácidos adicionales con o sin funcionalidades.

La presente invención se refiere además a las variantes de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención (SEQ ID NO: 1) que codifican para porciones, análogos o derivados de la proteína de Novaferon. Pueden obtenerse variantes mediante la selección de una biblioteca de redistribución de interferón o usando técnicas de mutagénesis o/y otras técnicas conocidas que se describen en la técnica.

Tal como se explicó anteriormente tales variantes pueden incluir aquellas producidas mediante inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos. Las inserciones, deleciones o sustituciones pueden implicar uno o más nucleótidos. Estas mutaciones pueden ocurrir en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier posición entre esas posiciones terminales, intercaladas o bien individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Alteraciones pueden producir sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Entre éstas se prefieren especialmente sustituciones silenciosas, adiciones y/o deleciones, que no alteran las propiedades y actividades de la proteína de Novaferon o porciones de la misma. Es decir, se prefiere especialmente a este respecto las sustituciones conservativas.

Debido a la degeneración del código genético un experto común en la técnica reconocerá inmediatamente que un gran número de las moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de al menos aproximadamente el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) codificarán para una proteína que tiene actividad similar o idéntica a la proteína de Novaferon. De hecho puesto que todas las variantes de degeneración codifican para la misma proteína esto será evidente para el experto incluso sin realizar un ensayo de comparación. Se reconocerá adicionalmente en la técnica que para tales moléculas de ácido nucleico que no son variantes de degeneración, un número razonable codificará para una proteína que tiene actividades biológicas de tipo interferón. Esto se debe a que el experto está totalmente al tanto de sustituciones de aminoácidos que es menos probable que o que probablemente no afectarán significativamente a la función de la proteína (por ejemplo, reemplazar un aminoácido alifático por un segundo aminoácido alifático), tal como se describe a continuación adicionalmente. Por ejemplo, una guía referente a cómo prepara sustituciones de aminoácidos silenciosas fenonormalmente se proporciona por Bowie y col (70), donde los autores indican que muchas proteínas son tolerantes de sustituciones de aminoácidos.

Proteína y variantes de polipéptido y constructos

La presente invención abarca la proteína de Novaferon de SEQ ID NO: 2 y proteínas o variantes de polipéptido que son sustancialmente similares a la misma, tales como proteínas que tienen al menos un 90 % o mayor de identidad

de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, proteínas que tienen al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 se encuentran dentro del alcance de la invención. Además, la proteína de Novaferon de la invención puede estar estructuralmente modificada mediante fusión de la misma a otras proteínas o fragmentos de proteína u otras moléculas para el fin de potenciar sus funciones y propiedades. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, fusionarla con otros fragmentos de proteína/proteínas para aumentar su expresión y/o para estabilizar adicionalmente la proteína de Novaferon.

En una realización la secuencia de ácido nucleico que codifica para Novaferon y/o proteínas de Novaferon de la invención pueden marcarse con una etiqueta distinta de la estructura principal. "Marcadas" en el presente documento significa que un compuesto de la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) o la proteína de Novaferon (SEQ ID NO: 2) se ha unido con al menos un elemento, isótopo u otros productos químicos (etiquetas) para permitir la detección del compuesto. En general las etiquetas entran en tres clases: a) etiquetas isotópicas, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados; b) etiquetas inmunes, que pueden ser anticuerpos o antígeno; y c) colorantes coloreados o fluorescentes. Las etiquetas pueden incorporarse en el compuesto en cualquier posición.

Una vez preparada la proteína de Novaferon puede también modificarse covalentemente. Un tipo de modificación covalente incluye tratar la proteína de Novaferon con un agente de derivatización orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N o C terminales de la proteína de Novaferon. La derivatización con agentes bifuncionales es útil por ejemplo para reticular la proteína de Novaferon para dar una matriz de soporte insoluble en agua o superficie para su uso en la purificación de anticuerpos anti-Novaferon o ensayos de selección. Los agentes de reticulación comúnmente usados incluyen 1,1-bis (diazacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida (por ejemplo ésteres con ácido 4-azidosalicílico), imidoésteres homobifuncionales incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones de la proteína de Novaferon incluyen: desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo para dar los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente; hidroxilación de prolina y lisina; fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo; metilación de los grupos amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (71); acetilación de la amina N terminal; y amidación de cualquier grupo carboxilo C terminal.

Otro tipo de modificación covalente de la proteína de Novaferon de la presente invención comprende alterar el patrón de glicosilación nativo de la proteína. Esto se consigue, por ejemplo, por (1) delección y/o adición de uno o más restos de carbohidrato hallados en la secuencia nativa de la proteína de Novaferon, o (2) adición y/o delección de uno o más sitios de glicosilación que no existen en la secuencia nativa de la proteína de Novaferon.

La adición de sitios de glicosilación a la proteína de Novaferon puede lograrse mediante alteración de la secuencia de aminoácidos de la proteína de Novaferon. La alteración puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia nativa de la proteína de Novaferon (para sitios de glicosilación unidos a O). La alteración de la secuencia de aminoácidos de la proteína de Novaferon podría lograrse a través de cambios a nivel de ADN, en particular mediante la mutación de la secuencia de ADN que codifica para la proteína de Novaferon en bases de nucleótidos preseleccionadas de modo que los codones alterados se traducirían en los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumentar los números de restos de carbohidrato en la proteína de Novaferon es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Tales métodos se describen en la técnica, por ejemplo tan pronto como en 1981, JD Aplin y Wriston JC Jr. han descrito la preparación, las propiedades y las aplicaciones de conjugados de carbohidrato de proteínas y lípidos (72).

La eliminación de restos de carbohidrato presentada en la proteína de Novaferon puede lograrse químicamente o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de los codones que codifican para los residuos de aminoácido que sirven como dianas para la glicosilación. Técnicas de desglicosilación química se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por Edge AS y col (73). La escisión enzimática de restos de carbohidrato en polipéptidos puede lograrse mediante el uso de varias endo y exo-glicosidasas como se describe por Thotakura y col (74).

Tales constructos derivatizados pueden incluir restos que mejoran la solubilidad, absorción, permeabilidad a lo largo de la barrera hematoencefálica, la semivida biológica, etc. Tales restos o modificaciones de la proteína de Novaferon pueden eliminar alternativamente o atenuar cualquier posible efecto secundario indeseable de la proteína y similares. Restos que pueden mediar en tales efectos se dan a conocer, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (75).

Otro tipo de modificación covalente de Novaferon comprende ligar la proteína de Novaferon a uno de varios polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, por ejemplo en la manera que se expone en la Patente de los Estados Unidos N° 4.640.835 (76); 4.496.689 (77); 4.791.192 (78) o 4.179.337 (79).

Además, la proteína de Novaferon en la presente invención puede modificarse también de manera que forme moléculas quiméricas que comprenden una proteína de Novaferon fusionada con otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. En una realización, una molécula quimérica de este tipo comprende un compuesto de fusión de una proteína de Novaferon con un polipéptido de etiqueta que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta de epítipo está situada generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal de la proteína de Novaferon. La presencia de tales formas con etiqueta de epítipo de una proteína de Novaferon puede detectarse usando un anticuerpo frente al polipéptido de etiqueta. Es decir, la provisión de la etiqueta de epítipo permite que la proteína de Novaferon se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta de epítipo. En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender un compuesto de fusión de una proteína de Novaferon con una inmunoglobulina o una región/fragmento particular de una inmunoglobulina. Por ejemplo, para formar una forma bivalente de la molécula quimérica, la proteína de Novaferon podría fusionarse con la región Fc de una molécula de IgG.

Diversos polipéptidos de etiqueta y sus anticuerpos respectivos se conocen bien en la técnica. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o de poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido de etiqueta flu HA y su anticuerpo 12CA5 (80); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 frente a la misma (81); y la etiqueta de glicoproteína y el virus Herpes Simple D (gD) y su anticuerpo (82). Otros polipéptidos de etiqueta incluyen el péptido Flag (83); péptido de epítipo de tubulina (84) y la etiqueta de péptido de proteína del gen 10 de T7 (85).

Además, la proteína de Novaferon de la presente invención puede producirse mediante procedimientos de síntesis química conocidos por los expertos comunes en la técnica. Por ejemplo polipéptidos de hasta aproximadamente 80-90 residuos de aminoácidos de longitud pueden producirse en un sintetizador de péptidos disponible comercialmente modelo 433A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA EE.UU.). Además los péptidos sintetizados químicamente más largos de hasta 120 residuos se encuentran también comercialmente disponibles, por ejemplo, de Bio-Synthesis, Inc. Lewisville, TX EE.UU.). Por lo tanto, tal como se apreciará fácilmente, la proteína de Novaferon madura de longitud completa puede producirse sintéticamente (por ejemplo, en fragmentos que pueden conectarse entre sí).

Por lo tanto, la proteína de Novaferon de la presente invención (SEQ ID NO: 2) incluye todas las preparaciones de proteína y de polipéptido y constructos que tienen la misma secuencia de aminoácidos que se da a conocer en la SEQ ID NO: 2, a pesar de si estas proteínas de Novaferon y derivados de proteínas se producen mediante procedimientos de síntesis química, y/o mediante técnicas recombinantes a partir de células huésped procariontas o eucariotas u otras células y huéspedes, incluyendo, pero sin limitarse a, células bacterianas y de levadura, vegetales, de insecto y de mamífero. Dependiendo de los huéspedes empleados en un método de producción recombinante, las proteínas de la presente invención pueden glicosilarse o no glicosilarse, pegilarse o no pegilarse. Además, las proteínas de la invención pueden incluir también un residuo de metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de procesos mediados por huésped. Por lo tanto, se conoce bien en la técnica que la metionina N-terminal codificada por el codón de iniciación de la traducción se elimina generalmente, con alta eficacia, a partir de cualquier proteína después de la traducción en todas las células eucariotas. Es decir, mientras que la metionina N-terminal en la mayoría de las proteínas se elimina eficientemente en la mayoría de los procariontas, para algunas proteínas este proceso de eliminación procarionta no es eficiente, dependiendo de la naturaleza del aminoácido al que está ligada covalentemente la metionina N-terminal.

Producción

La presente invención se refiere también a los vectores recombinantes que consisten en las moléculas de ADN aisladas de la presente invención, a células huésped que se modifican mediante ingeniería genética/transfectan con los vectores recombinantes, y a la producción de la proteína de Novaferon o fragmentos de la misma mediante técnicas recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, fago, vector viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser competentes para la replicación o defectuosos para la replicación. En el último caso la propagación viral se producirá generalmente sólo en células huésped de complementación. Ejemplos que describen en detalle la producción de Novaferon se exponen a continuación.

Vectores preferidos para la expresión de la proteína de Novaferon de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, vectores que comprenden regiones de control de acción cis eficaces para la expresión en un huésped operativamente ligado al polinucleótido que va a expresarse. Factores de acción trans apropiados se suministran o bien por el huésped, mediante un vector de complementación o mediante el propio vector tras la introducción en el huésped.

La secuencia de ácido nucleico que se da a conocer en la presente invención (SEQ ID NO: 1) puede ligarse operativamente a un promotor apropiado. "Promotor" en este documento significa cualquier secuencia de ácido nucleico que pueda unirse a ARN polimerasa e iniciar un exón (habitualmente en la transcripción aguas abajo (3')) de la secuencia codificante para la proteína de Novaferon en ARNm. Un promotor bacteriano tiene una región de

5 iniciación de la transcripción que está situada habitualmente próxima al extremo 5' de la secuencia codificante. Esta
 10 región de iniciación de la transcripción incluye normalmente un sitio de unión de ARN polimerasa y un sitio de
 15 iniciación de la transcripción. Secuencias que codifican para enzimas de la ruta metabólica proporcionan secuencias
 de promotor particularmente útiles. Ejemplos incluyen secuencias de promotor derivadas de enzimas de
 20 metabolización de azúcar, tales como galactosa, lactosa y maltosa, y secuencias derivadas de enzimas biosintéticas
 tales como triptófano. También pueden usarse y se conocen en la técnica promotores de bacteriófago. Además, los
 25 promotores sintéticos y promotores híbridos son también útiles; por ejemplo, el promotor tac es un híbrido de las
 secuencias de promotor *trp* y *lac*. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores que se producen de
 forma natural de origen no bacteriano que tienen la capacidad de unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la
 30 transcripción. Los promotores de bacterias preferidos incluyen, pero no se limitan a, promotores de *E. coli lacI*, *trp*,
phoA y *lacZ*, los promotores de T3 y de T7, el promotor *gpt*, los promotores lambda PR, PL y el promotor *trp*.

15 Los promotores eucariotas tienen una región de iniciación de la transcripción que está situada habitualmente
 próxima al extremo 5' de la secuencia codificante y una caja TATA, habitualmente ubicada 25-30 pares de bases
 20 (pb) aguas arriba del sitio de iniciación de la transcripción. La caja TATA está pensada para dirigir a la ARN
 polimerasa II para iniciar la síntesis de ARN en el sitio correcto. Un promotor mamífero también contiene un
 elemento promotor en sentido de 5' (elemento potenciador), habitualmente ubicado dentro de 100 a 200 pares de
 25 bases en el sentido de 5' de la caja TATA. Un elemento promotor en el sentido de 5' determina la tasa a la que se
 inicia la transcripción y puede actuar en cualquier orientación. Son de uso particular como promotores mamíferos los
 30 promotores de genes virales de mamífero, puesto que los genes virales se expresan con frecuencia altamente y
 tienen una amplia gama de huéspedes. Los ejemplos incluyen el promotor temprano SV40, promotor de virus LTR
 de tumor mamario de ratón. Los promotores de células animales preferidos incluyen, pero no se limitan a, promotor
 tardío principal de adenovirus, promotor del virus herpes simple, y el promotor de CMV. Entre los promotores
 35 eucariotas conocidos adecuados a este respecto se encuentran el promotor temprano inmediato de CMV, el
 promotor de factor 1 alfa (EF1A) de elongación, el promotor de timidina quinasa de HSV, los promotores de SV40
 tempranos y tardíos, y los promotores de LTRs retrovirales, tales como aquellos del virus del sarcoma de Rous
 ("RSV"). Secuencias de promotor preferidas para la expresión en levadura incluyen el promotor de GAL1/10
 40 inducible, los promotores de alcohol deshidrogenasa, enolasa, glucoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa,
 gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa, hexoquinasa, fosfofructoquinasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa y
 el gen de fosfatasa ácida.

45 Vectores para la propagación y expresión incluyen generalmente por lo tanto uno o más marcadores seleccionables.
 Tales marcadores pueden ser adecuados para la amplificación de los vectores y pueden contener marcadores
 50 adicionales para este fin. A este respecto los vectores de expresión contienen uno o más genes de marcadores
 seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de las células huésped transfectadas, aunque
 los expertos en la técnica reconocerán que ciertos marcadores seleccionables del sistema pueden proporcionarse
 en vectores separados. Los marcadores preferidos incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a ampicilina (Amp),
 tetraciclina (Tet) o higromicina (HYG) para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Los marcadores seleccionables de
 55 levadura incluyen ADE2, HIS4, LEU2, TRPI y ALG7, que confieren resistencia a tunicamicina; el gen de neomicina
 fosfotransferasa, que confiere resistencia a G418; y el gen de CUPI, que permite a la levadura crecer en presencia
 de iones cobre. Los marcadores seleccionables de célula animal incluyen gen de deshidrofolato reductasa (DHFR),
 genes de resistencia a neomicina (Neo) o higromicina (HYG).

60 Además, los vectores para la propagación y expresión comúnmente contienen uno o más sitios para la iniciación de
 la transcripción, terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para la traducción. La porción
 65 codificación de los transcritos expresados por los constructos incluye preferiblemente un codón de iniciación de la
 traducción al inicio y un codón de terminación (JAA, UGA o UAG) situados apropiadamente al final de la secuencia
 de ADN que va a traducirse. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros
 elementos es objeto del diseño rutinario dentro del nivel de la pericia común en la técnica. Muchos de estos
 70 elementos se describen en la bibliografía y se encuentran disponibles en proveedores comerciales.

Los siguientes vectores se encuentran comercialmente disponibles y se prefieren para su uso en bacterias: pBV220
 (86) y sus derivados de Shanghai Sangon; series pQE de Qiagen; vectores de pET de Qiagen; vectores pBS,
 75 Phagescript vectors, Bluescript vectors, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A de Stratagene; y ptrc99a, pKK223-3,
 pKK233-3, pDR540, pRIT5 de Pharmacia. Entre los vectores eucariotas preferidos se encuentran vectores pCI de
 Promega, vectores pcDNA de Invitrogen, pSV2CAT, pOG44, pXTI y pSG de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y
 pSVL de Pharmacia. Estos vectores se enumeran únicamente como ejemplos para demostrar que muchos vectores
 80 comercialmente disponibles y bien conocidos se encuentran disponibles para los expertos en la técnica para su uso
 en la producción de la proteína de Novaferon que se da a conocer en la presente invención mediante métodos
 genéticos/recombinantes.

En ciertas realizaciones preferidas a este respecto, los vectores proporcionan medios para una expresión específica.
 Tal expresión específica puede ser expresión inducible o expresión solamente en ciertos tipos de células o puede
 85 ser tanto inducible como específica de células. Entre los vectores inducibles se prefieren particularmente los
 vectores que pueden inducirse para expresar mediante factores ambientales que son fáciles de manipular, tales
 como la temperatura y aditivos de nutrientes. Varios vectores adecuados para esta aplicación, incluyendo vectores

de expresión constitutiva e inducible para su uso en huéspedes procariotas y eucariotas, se conocen bien y se emplean de manera rutinaria por los expertos en la técnica.

El vector que contiene la secuencia de ADN que se da a conocer en la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, así como un promotor apropiado, y otras secuencias de control apropiadas, puede introducirse usando varias técnicas conocidas en la técnica, en una célula huésped apropiada adecuada para la expresión de una proteína deseada. Representantes de tales huéspedes adecuados incluyen células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*; células de levadura, tales como células de *Pichia pastoris*; células de insecto, tales como células *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células de mamífero tales como CHO y COS; y células vegetales. Los huéspedes para una gran variedad de constructos de expresión son bien conocidos, y los expertos en la técnica podrán, con la información que se da a conocer en la presente invención seleccionar fácilmente un huésped para expresar la proteína de Novaferon que se da a conocer en la SEQ ID NO: 2.

Las células huésped pueden modificarse mediante ingeniería genética para incorporar polinucleótidos que codifican para Novaferon y expresar proteínas de Novaferon de la presente invención. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican para Novaferon pueden introducirse en células huésped usando técnicas conocidas en la técnica de transfección. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como los discutidos por Kingston (87). Los polinucleótidos que codifican para Novaferon pueden introducirse/transfectarse solos o con otros polinucleótidos. Tales otros polinucleótidos pueden introducirse independientemente, co-introducirse o introducirse conjuntamente con los polinucleótidos que codifican para Novaferon que se dan a conocer en la SEQ ID NO: 1.

Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican para Novaferon de la invención pueden transfectarse en células huésped junto con un polinucleótido separado que codifica para un marcador seleccionable para la co-transfección y selección del marcador en células de mamífero. Como alternativa, los polinucleótidos que codifican para Novaferon pueden incorporarse en un vector que contiene una secuencia de ADN codificante de marcador seleccionable para inducir la propagación en las células huésped.

Las células huésped modificadas con ingeniería genética transfectadas con los vectores que contienen el polinucleótido que codifica para Novaferon pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales que pueden modificarse específicamente para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes diana. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, como pH, etc. se ajustan y son adecuadas para que las células huésped seleccionadas expresen la proteína de Novaferon de la presente invención.

Pueden incorporarse señales de secreción adecuadas y co-expresarse con la proteína de Novaferon para promover la secreción del polipéptido de proteína traducido en la luz del retículo endoplasmático, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular.

Purificación

Un tipo de célula huésped adecuada se selecciona habitualmente para la expresión de la proteína recombinante diana, dependiendo de la naturaleza de la proteína diana y de la consideración de otras condiciones, tales como los costes de producción, si se aumentan a escala fácilmente, el tamaño de producción industrial, etc. Los clones de las células transfectadas que expresan la proteína diana con el mayor rendimiento se seleccionan entonces, y el clon final con la expresión óptima se denomina la línea celular de expresión de la proteína diana y se usa para la producción de la proteína diana. La línea celular que expresa la proteína diana se hace crecer en un medio que contiene varios nutrientes. Para el crecimiento óptimo de las células y/o la expresión óptima de la proteína diana, se usan varios agentes o condiciones para inducir el promotor selectivo incorporado con la secuencia de ADNc de la proteína diana en el vector transfectado. Si el tipo de célula huésped/sistema de expresión es bacteria, las células cultivadas se recogen del medio, normalmente mediante centrifugación. Los cuerpos de las células recogidas se rompen mediante medios físicos o químicos, y los extractos brutos recogidos, que contienen la proteína diana sintetizada, se conservan para la purificación adicional de la proteína. Los métodos aplicados para la ruptura de las células microbianas incluyen, pero no se limitan a, ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica, o uso de agentes de lisis celular. Tales métodos se conocen bien por los expertos en la técnica.

Los inventores usaron la bacteria *E. coli*, como la célula huésped para la expresión de la proteína de Novaferon. Tal como se describe a continuación *E. coli* se transfectó con el vector que contenía la secuencia polinucleotídica que codifica para Novaferon, y una cepa de *E. coli*, que tenía la expresión óptima de la proteína de Novaferon, se seleccionó para la producción de la proteína de Novaferon. Una vez sintetizada, la proteína puede conservarse en el citoplasma como gránulos insolubles o puede ser secretarse al citoplasma en forma soluble. En el primer caso, los gránulos se recuperan después de la lisis de los cuerpos celulares, y se desnaturalizan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El re-plegamiento de la proteína de Novaferon/polipéptido desnaturalizado se obtiene entonces diluyendo el desnaturalizante con solución excesivamente diluida o mediante diálisis frente a una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguido por diálisis frente a una solución salina tamponada. En el último caso, la proteína puede recuperarse directamente, sin desnaturalizar, a partir del espacio periplásmico en forma soluble y funcional tras la ruptura de las células recogidas. Evitando los procedimientos de

desnaturalización y de re-plegamiento, la proteína de Novaferon soluble no se daña y contiene moléculas de proteínas no deformadas o con plegamiento erróneo.

5 Los inventores encontraron que una porción significativa de la proteína de Novaferon sintetizada producida en la línea celular de *E. coli* se secretó al citoplasma. Esta porción se purificó entonces tal como se describe a continuación.

Ensayos de actividad y usos médicos

10 Tal como se indicó anteriormente, la proteína de Novaferon muestra una homología de secuencia con muchos miembros de la familia de interferón, en particular con la proteína interferón traducida por el ARNm de HuIFN- α 14 (Figura 2). Se ha mostrado que HuIFN- α tiene una amplia gama de actividades biológicas incluyendo actividades anti-virales, anti-proliferativas, y de inmunomodulación (10).

15 Con tal homología con HuIFN- α , se esperaría que Novaferon presentara funciones biológicas similares a HuIFN- α , incluyendo, pero sin limitarse a, la inhibición de proliferación tumoral, actividades anti-virales, activación de células NK, y modulación del sistema inmunitario. No es sólo particularmente importante la conservación de las propiedades funcionales de tipo HuIFN- α , sino también la potencia mejorada de estas funciones biológicas de la proteína de Novaferon en comparación con HuIFN- α . Para verificar y determinar la potencia de sus propiedades funcionales, las actividades biológicas de la proteína de Novaferon se determinaron por tanto usando los ensayos *in vitro* clásicos y rutinarios diseñados para detectar las propiedades anti-virales y anti-proliferativas. Tal como se describe en la sección experimental a continuación, la potencia *in vivo* de propiedades anti-proliferativas de la proteína de Novaferon se observó adicionalmente en modelos animales de varios tipos de cáncer humano y se compararon con HuIFN- α , así como a un agente anti-cancerígeno químico en algunos experimentos.

25 Muchos ensayos adecuados para determinar las actividades de HuIFN se conocen bien en la técnica. Los inventores emplearon los sistemas de ensayo basados en células *in vitro* para determinar las actividades anti-virales y anti-proliferativas. Los mismos ensayos *in vitro* se usaron para todos los procedimientos y experimentos relacionados con la presente invención, que incluían pero no sin limitarse a selección de biblioteca de redistribución de genes de interferón de tipo 1 humano, selección de Novaferon a partir de las proteínas expresadas de la biblioteca de redistribución de genes interferón de tipo I humano, y la determinación de las actividades biológicas de la proteína de Novaferon recombinante pura.

30 Existen muchos ensayos que miden las actividades anti-virales de las muestras/agentes de ensayo entre la observación del grado de resistencia de las células a virus (88). Tres bioensayos principales se han usado para medir las actividades anti-virales de HuIFN y sus híbridos. Estos se clasifican de acuerdo con los métodos de determinación de varios aspectos de virus en células cultivadas.

35 El ensayo para determinar la inhibición de efectos citopáticos inducidos por virus mide el grado de reducción de efectos citopáticos líticos inducidos por virus sobre células cultivadas con pre-tratamiento de IFN. Este ensayo puede realizarse en placas de 96 pocillos (89), y se ha usado ampliamente para HuIFN- α recombinante puesto que proporciona un método sencillo para seleccionar un gran número de muestras.

40 La inhibición de la formación de placas de virus es otro método para cuantificar las actividades anti-virales de HuIFN en cultivos tisulares. Los resultados de un ensayo de reducción de placas son independientes de la multiplicidad de infección. Además, una reducción del 50 % en la formación de placa puede medirse con alta precisión. Usando el virus de estomatitis vesicular ubicuo (VSV) para inducir la formación de placas, por ejemplo, podría determinar el perfil de actividad de especies cruzadas de un IFN recombinante particular, mediante la selección de un número de líneas celulares a partir de diferentes especies animales (90).

45 El tercer ensayo se basa en la determinación de la reducción del rendimiento del virus. La producción de virus se mide, habitualmente durante el único ciclo de crecimiento celular, mediante la cantidad de virus liberada. Este ensayo es particularmente útil para someter a ensayo las actividades anti-virales de IFN frente a virus que no provocan efectos citopáticos, o que no forman placas en cultivos de células diana. En este ensayo, sin embargo, la multiplicidad de infección afecta al grado aparente de protección inducido por una concentración fija de IFN (91).

50 Las actividades anti-virales de Novaferon se midieron mediante un ensayo de inhibición de efecto citopático convencional usando células WISH y virus de la estomatitis vesicular (VSV). Las actividades anti-virales se determinaron y se calibraron usando las muestras de referencia convencionales de las normas internacionales de la OMS: 95/650 (rHuIFN- α 2A) y 94/786 (rHuIFN- α consenso). Una unidad de actividad anti-viral se define como la cantidad de proteína necesaria para conseguir un 50 % de inhibición de los efectos citopáticos de VSV en células cultivadas. Tal como se describe a continuación, la actividad de proteína de Novaferon era de $2,5 \times 10^9$ UI/mg, que es aproximadamente 12.5 veces mayor que la de HuIFN- α 2b. Estos ensayos demuestran que las propiedades anti-virales de Novaferon se potencian enormemente en comparación con HuIFN- α 2b. Esta potencia aumentada frente a virus, mostrada por la proteína de Novaferon, proporciona la base para un efecto anti-virus potenciado de predicción

in vivo en seres humanos. Basándose en la naturaleza de HuIFN, es razonable esperar un perfil anti-virus muy amplio para Novaferon. En otras palabras, Novaferon debería ser más potente frente a una amplia gama de virus que los HuIFN naturales. La potencia anti-virus aumentada de Novaferon podría traducirse en mejores efectos anti-virus o mejores efectos terapéuticos en situaciones clínicas para pacientes con diversas enfermedades virales.

Tal como se explicó anteriormente, los IFN muestran también una proliferación celular y muestran potentes efectos anti-tumorales a lo largo de varios mecanismos. Varios ensayos anti-proliferación *in vitro* se han establecido mediante usando sistemas de cultivo celular y se describen bien en la técnica. La proliferación celular en estos ensayos puede medirse contando los números de células; bioensayo de violeta cristal (92, 93); quimiosensibilidad al colorante rojo neutro (94-96); incorporación de nucleótidos radiomarcados (97); incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el ADN de células de proliferación (98); uso de sales de tetrazolio (99, 100).

La línea de células Daudi linfoblastoide humana es muy sensible frente al efecto anti-proliferación de HuIFN- α y su crecimiento en cultivos en suspensión facilita la cuantificación de sus números de células (101). Esta línea celular se ha usado para medir la actividad anti-proliferación de HuIFN- α e híbrida durante muchos años (102). Otras líneas celulares se usan también para someter a ensayo la actividad anti-proliferación de un agente de ensayo.

Las actividades anti-proliferativas de la proteína de Novaferon se observaron *in vivo* mediante la observación de la inhibición del crecimiento de masa tumoral mediante administración de Novaferon a modelos animales con varios xenoinjertos de tumor humano. Los efectos anti-tumorales *in vivo* de Novaferon se compararon con HuIFN- α 2b y en algunos modelos de xenoinjerto, también con agentes anti-tumorales químicos.

Tal como se describe en detalle a continuación, los inventores encontraron que la actividad anti-proliferativa *in vitro* de Novaferon, medida usando el método de células Daudi convencional, era 400 veces más potente que la de HuIFN- α 2b natural, que muestra probablemente las actividades anti-proliferativas más potentes entre todos los HuIFN naturales. La potencia anti-proliferativa aumentada de Novaferon era amplia y universal, ya que presentaba una inhibición potenciada o más potente que el HuIFN- α 2b natural, de todas las líneas celulares de cáncer humano que los inventores sometieron a ensayo *in vitro*. Esto indica que la inhibición potente del cáncer humano por Novaferon no es selectiva. Aunque el alcance de sus actividades anti-proliferativas potenciadas hacia todos los tipos sometidos a ensayo de líneas celulares de cáncer humano variaron, Novaferon tiene el potencial de ser un agente anti-canceroso amplio en el entorno clínico. Esta es una ventaja significativa con respecto a los agentes anti-cancerígenos químicos, anticuerpos monoclonales u otros agentes anti-cancerígenos específicos de diana.

Los experimentos de modelo de animal de xenoinjerto descritos a continuación establecen adicionalmente que:

(1). Los efectos de anti-proliferación *in vivo* de Novaferon se potenciaron enormemente o eran más potentes en comparación con HuIFN- α 2b natural

(2). Los efectos de anti-proliferación *in vivo* de Novaferon, a dosis muy inferiores, fueron mejores que el agente químico sometido a ensayo, 5-fluorouracilo (5-FU) en el mismo modelo de xenoinjerto.

(3). Novaferon pudo lograr más de un 90 % de inhibición del crecimiento del cáncer en los modelos de xenoinjerto, pero no induce pérdida de peso, cambios de actividad u otros efectos secundarios negativos en los animales tratados, lo que contrasta considerablemente con la significativa pérdida de peso y reducción de la actividad en los animales tratados con 5-FU.

Estos resultados indican que las propiedades anti-proliferativas *in vitro* e *in vivo* de Novaferon se potencian enormemente, en comparación con HuIFN- α 2b natural. La potencia anti-proliferativa aumentada de Novaferon se traduce en una inhibición efectiva (> 90 %) de crecimiento tumoral humano en un modelo de animal de ratón, y esta inhibición parece trabajar muy ampliamente para todos los tipos de cánceres humanos sometidos a ensayo y mejor que el agente anticancerígeno químico clásico, 5FU. Estos resultados indican también que la potente inhibición del crecimiento de células cancerosas por Novaferon es muy específica hacia el cáncer pero no hacia las células normales tal como se soporta por la observación de un apetito y un comportamiento en la actividad normales y ninguna pérdida de peso en los animales tratados con Novaferon. Novaferon por lo tanto tiene el potencial de trabajar en todos o la mayoría de los cánceres humanos.

En una realización preferida, la molécula o moléculas completas o parciales de la proteína de Novaferon (SEQ ID NO: 2) preparadas mediante tecnologías recombinantes usando la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 1 o sintetizadas químicamente, podrían aplicarse al tratamiento y/o la prevención de cualquier y/o todos los tumores y cánceres de origen humano o de origen no humano, en seres humanos y/o en especies no humanas. Estos tumores, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, sarcoma osteogénico; mieloma múltiple; enfermedad de Hodgking; linfoma nodular escasamente diferenciado; leucemia linfocítica aguda; leucemia mieloide aguda; carcinoma de mama; melanoma; papiloma; y carcinoma nasofaríngeo, cáncer de colon, cáncer de hígado y melanoma.

En otra realización, la molécula o moléculas completas o parciales de la proteína de Novaferon (SEQ ID NO: 2)

preparadas mediante tecnologías recombinantes usando la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1 o sintetizadas químicamente, podrían aplicarse para el tratamiento y/o la prevención de cualquiera y/o de todas las enfermedades virales en seres humanos y/o en especies no humanas. Ejemplos de las infecciones virales susceptibles incluyen, pero no se limitan a, encefalomiocarditis viral, gripe, y otras infecciones virales del aparato respiratorio, rabia y otras zoonosis virales, e infecciones por arbovirus, así como queratitis por herpes simplex, conjuntivitis hemorrágica aguda, varicela zóster, y hepatitis B y C, SARS y gripe aviar, síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA, VIH).

En otra realización, la molécula o moléculas completas o parciales de la proteína de Novaferon (SEQ ID NO: 2) preparadas mediante tecnologías recombinantes usando la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1 o sintetizadas químicamente, podrían aplicarse para el tratamiento y/o la prevención de cualquiera y/o de todos los trastornos relacionados con el sistema inmunitario en seres humanos. Ejemplos de los trastornos inmunitarios incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, síndrome de Sjorgen y diabetes. La proteína Novaferon puede aplicarse también para prevenir el rechazo de injerto contra el huésped.

En otra realización, la molécula o moléculas completas o parciales de la proteína de Novaferon (SEQ ID NO: 2) preparadas mediante tecnologías recombinantes usando la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1 o sintetizadas químicamente, podrían aplicarse para el tratamiento y/o la prevención, como un inmunoadyuvante, para cualquiera y/o para todas las enfermedades de angiogénesis. Ejemplos de las enfermedades de angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, hemangiomas, neovascularización inducida por tumor, degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía diabética.

La proteína de Novaferon sola o junto con cualquier material portador/proteína u otros constructos, puede administrarse a seres humanos y/o especies no humanas en cualquier preparación/formulación farmacéuticamente aceptable en cualquier ruta/método de administración/suministro, que incluyen pero no se limitan a, la toma oral, inhalación, pulverización intranasal, inyección intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intralesional o subcutánea.

Las preparaciones/formulaciones farmacéuticas que contienen la proteína de Novaferon con principio activo, podrían prepararse incorporando un vehículo sólido o líquido apropiado, en las formas de líquido, sólido, semisólido y/o cualquier otra forma clínicamente aceptable, tales como comprimidos, píldoras, polvos, soluciones líquidas o suspensiones, liposomas, supositorios, soluciones inyectables e infundibles. Las preparaciones/formulaciones que contienen Novaferon podrían prepararse usando los vehículos convencionales, materiales, métodos que se describen en la técnica o que están aceptados generalmente en la práctica de la industria farmacéutica. Las preparaciones/formulaciones que contienen Novaferon podrían prepararse también mediante el uso de los métodos, materiales no convencionales que no se han descrito ni usado en la técnica en la industria farmacéutica.

Por ejemplo, las formulaciones parenterales son habitualmente fluidos inyectables que consisten en los materiales farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, o soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol, etc. Además, los fluidos inyectables podrían contener también, además de la proteína de Novaferon, otras proteínas tales como vehículos, tales como albúmina de suero humana o preparaciones de plasma. Las preparaciones/formulaciones farmacéuticas pueden contener también cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes de tamponamiento de pH (por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitan). Los métodos de formulación son bien conocidos en la técnica y se dan a conocer, por ejemplo, en Remington: The science and Practice of Pharmacy. Pharmaceutical Sciences (75).

Las preparaciones/formulaciones de proteína de Novaferon particulares, estarían determinadas por las aplicaciones clínicas pretendidas y/o por los métodos de administración, que podrían prepararse por cualquier experto en la técnica usando técnicas conocidas. Por ejemplo, además de fluidos inyectables, pueden emplearse formulaciones tópicas y orales. Las preparaciones tópicas pueden incluir, pero no se limitan a, gotas oculares, ungüentos y pulverizaciones. Las formulaciones orales incluyen, pero no se limitan a, las formas de líquido (por ejemplo, jarabes, soluciones o suspensiones), o sólido (por ejemplo, polvos, píldoras, comprimidos o cápsulas). Para preparaciones/formulaciones sólidas los vehículos sólidos no tóxicos convencionales incluyen, pero no se limitan a, los grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Procedimientos y/o métodos actuales de preparación de estas preparaciones/formulaciones se conocen, o serán evidentes, por los expertos en la técnica (75).

Las preparaciones/formulaciones farmacéuticamente aceptables de la proteína de Novaferon pueden administrarse a seres humanos y/o especies no humanas en varios modos que incluyen pero no se limitan a, administración oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal o intraocular, y en el tratamiento de heridas directamente aplicado localmente.

Las concentraciones/cantidades de la proteína de Novaferon en las preparaciones/formulaciones pueden variar desde >0 hasta 1,0 molar y/o >0 hasta 100 % (peso/peso) dependiendo de la práctica clínica. Las dosis exactas, intervalos de administración y la duración del tratamiento de cada una y/o de todas las formulaciones/preparaciones de Novaferon se determinarán mediante ensayos clínicos, los estados patológicos, el estado del paciente y por el

personal médico. En una realización preferida, debido a la degradación de proteína, administración sistémica frente a localizada, y tasa de síntesis de nueva proteasa, así como la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la interacción de fármacos y la gravedad de la afección, etc., pueden ser necesarios ajustes en la administración de Novaferon incluyendo, pero sin limitarse a, las dosis individuales y/o

5 totales, intervalos de administración, la duración del tratamiento, y ciclos necesarios del tratamiento, y podrán determinarse con experimentación rutinaria por los expertos en la técnica.

En una realización preferida, puede alterarse la semivida de circulación de la proteína de Novaferon tras la administración a los cuerpos de seres humanos y/o de especies no humanas. Las alteraciones incluyen, pero no se limitan a, la extensión o acortamiento de la semivida de Novaferon *in vivo*. La extensión de la semivida *in vivo* de la proteína de Novaferon puede lograrse de varios modos, que incluyen, pero no se limitan a:

10

(1). Formación de complejos entre una molécula de Novaferon y un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo de este tipo, conectaría preferentemente con la proteína de Novaferon en sitios que no perjudican materialmente a sus funciones terapéuticas (103).

15

(2). Complejo de fusión de Novaferon con otras proteínas/polipéptidos. La molécula de Novaferon puede fusionarse de manera recombinante con otras proteínas/polipéptidos, tales como un fragmento de la región constante de una inmunoglobulina (Fc) (104).

20

(3). Conjugación de la proteína de Novaferon. Por ejemplo, la proteína de Novaferon puede conjugarse con polímeros no antigénicos, tales como restos de polietilenglicol o restos de polialquilenglicol relacionados (105-108).

25

En otra realización preferida, un compuesto terapéutico podría conjugarse con un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo anti-proteína de Novaferon. El compuesto terapéutico puede ser un agente citotóxico. En este método, los agentes citotóxicos pueden seleccionarse como diana, mediante la unión del anticuerpo conjugado a moléculas de Novaferon, a tejido tumoral o celular, destruyendo de ese modo y reduciendo el número de células afectadas para lograr la reducción función de los síntomas del cáncer. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, fármacos citotóxicos, toxinas o fragmentos activos de tales toxinas, y compuestos radioquímicos. Toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen cadena de difteria A, exotoxina A, cadena de ricina A, cadena de abrina A, curcina, crotina, fenomicina, enomicina y similares.

30

Ejemplos

35

Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la invención que se ha descrito anteriormente, así como para exponer los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos no sirven en modo alguno para limitar el verdadero alcance de esta invención, sino que, más bien, se presentan para fines ilustrativos. Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan expresamente por referencia en su totalidad.

40

Ejemplo 1. Amplificación por PCR de genes de IFN- α humano a partir de ADNc de leucocito humano

Se extrajo el ARNm total de leucocitos de sangre periférica humana. La preparación de ADNc se realizó usando el kit Advantage™ RT-for-PCR (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU.) y un cebador de síntesis de ADNc (oligo dT18) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

45

La amplificación de ADNc de IFN- α humano se realizó mediante tecnología de PCR en un ciclador térmico MJ PTC, usando las siguientes condiciones: 2,5 μ l 10 \times tampón de amplificación *pfx* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), 0,75 μ l de dNTPs 10 mM, 0,5 μ l de MgSO₄ 25 mM, 0,25 μ l de *Platinum pfx DNA Polymerase* (2,5 U/ μ l; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), 0,75 μ l de ADNc, 0,75 μ l de cebador 5' (10 μ M; IFNaO5: 5'-TGGTGCTCAGCT (A/G)CAAGTC-3'), (SEQ ID NO: 3) 0,75 μ l de mezcla de cebador 3' (1,7 μ M cada uno; IFNaO3-1: 5'-AATCATTTCATGTTG(A/G)ACCAG-3' (SEQ ID NO: 4); IFNaO3-2: 5'-AATCATTTCCTGGTTGTACCAG-3' (SEQ ID NO: 5); IFNaO3-3: 5'-AATCATTTCATGTTGAAACAG-3' (SEQ ID NO: 6); IFNaO3-4: 5'-AATCATTTC AAGATGAGCCCAG-3' (SEQ ID NO: 7); IFNaO3-5: 5'-AATGATTTTCATGTTGAACCAG-3' (SEQ ID NO: 8); IFNaO3-6: 5'-AATCATTT(C/G)(C/G)ATGTTGAACCAG-3' (SEQ ID NO: 9); IFNaO3-7: 5'-GATCATTTCATGTTGAATGAG-3' (SEQ ID NO: 10); IFNaO3-8: 5'-GAGTCGTTTCTGTGTTGGATCAG-3' (SEQ ID NO: 11).

50

55

Los productos de PCR amplificados se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1,0 %, se escindieron, se purificaron en gel, y se clonaron en vector pCRII-TOPO o pCR-4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las recomendaciones del fabricante. La secuenciación automática se llevó a cabo en una mezcla Prism Ready Reaction Dye Termination en un secuenciador automático ABI (PE Applied Biosystems, CA, EE.UU.).

60

Puesto que no se encontró ningún inserto deseado para las secuencias codificantes de IFNa6, IFNa7 e IFNa16 en

65

los clones anteriores, se realizaron de nuevo PCR en las condiciones anteriores con la excepción del tipo de cebadores específicos. Para una amplificación específica de IFN α 6, los cebadores 5' y 3' fueron IFN α 05: 5'-TGGTGCCTCAGCT (A/G)CAAGTC-3' (SEQ ID NO: 3), y IFN α 03-8: 5'-GAGTCGTTTCTGTGTTGGATCAG-3' (SEQ ID NO: 11) respectivamente. Para una amplificación específica de IFN α 7, los cebadores 5' y 3' fueron IFN α 7UO: 5'-ATGCCCTGTCCCTTTTCTTTAC-3' (SEQ ID NO: 12) y una mezcla equimolar de IFN α 03-5 e IFN α 03-6, respectivamente. Para una amplificación específica de IFN α 16, los cebadores 5' y 3' usados fueron IFN α 7UO e IFN α 03-7: 5'-GATCATTTCATGTTGAATGAG-3' (SEQ ID NO: 10) respectivamente. Los fragmentos amplificados se clonaron en vector pCRIITOPo o pCR-4-TOPO y se secuenciaron tal como anteriormente.

Todos los genes de IFN-alfa humano de Tipo I clonados se alinearon individualmente con aquellas secuencias de ADN en GeneBank. Los números de registro de nucleótido de GeneBank para estos genes a los que se hace referencia en el presente documento son: NM_024013(IFN- α 1), NM_000605 (IFN- α 2), NM_010504 (IFN- α 4), NM_010505 (IFN- α 5), NM_008335 (IFN- α 6), NM_008334 (IFN- α 7), NM_008336 (IFN- α 8), NM_002171 (IFN- α 10), NM_002172 (IFN- α 14), NM_002173 (IFN- α 16), NM_021268 (IFN- α 17), NM_002175 (IFN- α 21).

Ejemplo 2. Construcción de librerías de redistribución de plásmidos que portan HuIFN de Tipo I

Para construir plásmidos que portan la secuencia codificante de uno de los IFN- α humanos de Tipo I, se sintetizaron 15 pares de oligonucleótidos, con sitios de restricción BamHI y EcoRI (Genentech, South San Francisco, CA, EE.UU.), basándose en la región codificante de ADNc individual para proteínas de IFN de Tipo I humano maduras. Los números de registro de nucleótido de GeneBank para estas proteínas a las que se hace referencia en el presente documento son: NM_024013(IFN- α 1), NM_000605 (IFN- α 2), NM_010504 (IFN- α 4), NM_010505 (IFN- α 5), NM_008335 (IFN- α 6), NM_008334 (IFN- α 7), NM_008336 (IFN- α 8), NM_002171 (IFN- α 10), NM_002172 (IFN- α 14), NM_002173 (IFN- α 16), NM_021268 (IFN- α 17), NM_002175 (IFN- α 21). Los cebadores y plásmidos construidos en el Ejemplo 1 como moldes se usaron en una PCR convencional (111). Los productos resultantes se escindieron con endonucleasas de restricción (RE) BamHI y EcoRI y se clonaron en el vector de expresión *E. coli* pBVB, que es un plásmido de expresión derivado de pBV220 (86) que contiene un sitio de BamHI y un sitio de EcoRI en su región de clonación múltiple. Todos estos constructos finales se verificaron mediante análisis de secuencia de ADN (PE Applied Biosystems, EE.UU.).

Los fragmentos de ADN que contenían ORF de IFN humano se amplificaron mediante PCR usando un par de oligonucleótidos, BVF4: 5'-AGGGCAGCATTCAAAGCAG-3' (SEQ ID NO: 13) y BVR3: 5'-TCAGACCGCTTCTGCGTTCTG-3' (SEQ ID NO: 14), y usando plásmidos que portan HuIFN de Tipo I construidos previamente. Los productos resultantes se mezclaron en cantidades iguales y se sometieron a digestión con ADNasa I y ensamblaje por PCR de acuerdo con el procedimiento descrito por Stemmer (112).

Los productos de PCR ensamblados se amplificaron adicionalmente mediante un par de cebadores internos: BVF: 5'-GAAGGCTTTGGGGTGTGTG-3' (SEQ ID NO: 15) y BVR: 5'-AATCTTCTCTCATCCGC-3' (SEQ ID NO: 16), seguido de digestión con BamHI y EcoRI y se clonaron de nuevo en el vector de expresión *E. coli* pBVB se escindieron con los RE BamHI y EcoRI. Todos estos constructos finales se verificaron mediante análisis de secuencia de ADN. Los genes de HuIFN- α redistribuidos que portaban plásmidos se transformaron en células competentes DH5 α de *E. coli*.

En todos los procedimientos de PCR anteriores, o bien amplificación por PCR o bien ensamblaje por PCR, se usó ADN polimerasa regular (New England Biolab, MA, EE.UU.), en lugar de ADN polimerasa de alta fidelidad.

Ejemplo 3. Selección de las bibliotecas de redistribución

Células DH5 α de *E. coli* transformadas recientemente se hicieron crecer durante la noche sobre una placa de LB a 37 °C. Se recogieron individualmente colonias separadas y se inocularon en 100 μ l de medio LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina en placas de 96 pocillos. Las colonias se agitaron a 250 rpm a 30 °C. Después de cultivarse durante la noche, se inocularon por duplicado 10 μ l de cultivos bacterianos en 100 μ l de medio LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina en placas de 96 pocillos. Las placas originales, (denominadas placas madre) se almacenaron temporalmente a 4 °C. Las células en placas por duplicado se hicieron crecer a 30 °C hasta una DO600 de 0,4 y se indujeron entonces mediante 42 °C. Después de una inducción de calor de 4 horas, los cultivos de bacterias se movieron directamente a un congelador a -80 °C para iniciar el ciclo de congelación-descongelación. Después de 2 ciclos de congelación-descongelación, la suspensión de bacterias/lisado se diluyó hasta una concentración deseada y se expuso a cultivo de células Daudi para un ensayo de anti-proliferación (101) o cultivo de células de Wish para un ensayo anti-viral (113).

En cada ronda de etapas de selección, se seleccionaron en principio 20.000 colonias y aproximadamente 100 colonias con las mayores actividades anti-proliferativas o anti-virales se seleccionaron para pruebas de confirmación adicionales. Los cultivos bacterianos seleccionados en placas madre se sembraron en estrías sobre placas de LB que contenían 50 μ g/ml de ampicilina. Las colonias individuales se hicieron crecer durante la noche a 37 °C, se recogieron, y se inocularon en 1 ml de medio LB que contenía 50 μ g/ml de ampicilina en tubos de ensayo. Las

bacterias en tubos se hicieron crecer durante la noche a 30 °C con agitación a 250 rpm. Entonces se inocularon 40 µl de bacterias que habían crecido en uno de otro conjunto de tubos que contenía 1 ml de LB con ampicilina (50 µg/ml). Las muestras se sometieron entonces a las etapas de expresión de inducción, recogida de cultivo celular, tratamiento por ciclo de congelación-descongelación y ensayos anti-proliferativos y anti-virales tal como se describió anteriormente con respecto a las etapas de selección primarias.

En cada ronda de etapas de selección, aproximadamente 20 colonias con la mayor actividad anti-proliferativa o anti-viral se eligieron tras pruebas confirmativas para preparar plásmidos y sus insertos se secuenciaron automáticamente. Los insertos que tenían una secuencia de ADN única se amplificaron adicionalmente usando un par de cebadores de PCR BVBF: 5'-ACCATGAAGGTGACGCTC-3' (SEQ ID NO: 17); y BVR: 5'-AATCTTCTCTCATCCGC-3' (SEQ ID NO: 16), que son secuencias flanqueantes en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de múltiples sitios de clonación del vector pVBV respectivamente. Los productos de PCR amplificados se usaron para la siguiente ronda de construcción de bibliotecas de redistribución.

Se llevaron a cabo cinco ciclos de etapas de selección basándose en el aumento de su actividad o bien anti-proliferativa o bien anti-viral.

Ejemplo 4: Expresión y purificación de la proteína de Novaferon recombinante en *E. coli*

Se expresó proteína de Novaferon (SEQ ID NO: 2) en *E. coli*. El marco de lectura de la SEQ ID NO: 1 con una adición artificial de codón de iniciación ATG se clonó en el vector pVBV inducible por temperatura bajo el control del promotor λPRPL (114). El plásmido de expresión de Novaferon, pVBVNF, se transformó en células DH5α. Colonias individuales se recogieron individualmente y se inocularon en 2 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 30 °C durante 8 horas. Entonces los 2 ml de bacterias cultivadas se incubaron adicionalmente con 50 ml de medio que contenía 50 µg/ml de ampicilina durante la noche a 30 °C con agitación. A la mañana siguiente, las bacterias cultivadas durante la noche se sembraron a una razón de 1:10 ~ 1:20 en un gran volumen de medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina, y se incubaron a 30 °C con agitación. Cuando los cultivos habían alcanzado la fase media logarítmica de crecimiento (A550 = 0,5-0,6), la temperatura de incubación se aumentó rápidamente hasta 42 °C y se mantuvo durante 4 horas con el fin de inducir la expresión de Novaferon. Después de una inducción térmica de 4 horas, las células bacterianas se centrifugaron y se lavaron con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) 3 veces, entonces se almacenaron a -80 °C hasta que se procedió a la purificación.

La mayoría de las moléculas de proteína de Novaferon eran solubles en el sistema de producción de *E. coli* que se describe en el presente documento, aunque se sobre-expresaban en el citoplasma. Por lo tanto, las células se rompieron mediante digestión con lisozima en tampón de lisis celular I (Tris-Cl 50 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8), NaCl 100 mM) (115). El lisado se sonicó adicionalmente con el fin de romper las células intactas restantes y cortar y empalmar moléculas de ADN. Entonces se centrifugó el lisado.

Las moléculas de proteínas de Novaferon solubles en los sobrenadantes se purificaron secuencialmente mediante cromatografía de intercambio iónico, hidrofóbica y filtración en gel. En primer lugar los sobrenadantes se cargaron sobre y se pasan a través de Fenil Sepharose 6 Fast Flow columna (GE Healthcare, EE.UU.). En segundo lugar, las fracciones que contienen la proteína de Novaferon se aplicaron a una columna POROS 50 D (Applied Biosystems, EE.UU.). En tercer lugar, las fracciones que contenían moléculas de Novaferon se sometieron a la purificación mediante columna POROS 50 HS (Applied Biosystems, EE.UU.), y finalmente, las moléculas de Novaferon recogidas se purificaron adicionalmente mediante HiLoad 26/100 Superdex 75pg (Amersham, EE.UU.).

La pureza de la proteína de Novaferon pura se verificó mediante análisis de SDS-PAGE al 15 %. La proteína de Novaferon recombinante pura se mostró como una única banda con un peso molecular (MW) de 19-20 KDa. El análisis de espectrometría de masas indicó que la pureza de la molécula de Novaferon purificada era de > 98 % y que el peso molecular era de 19.313 dalton, lo que era idéntico al peso molecular predicho 19.315 dalton a partir de su secuencia de aminoácidos.

Ejemplo 5: Expresión y purificación de HulFN-α2b recombinante en *E. coli*

El plásmido de expresión de HulFN-α2b, pBV2b, contiene la región codificante de ADNc para la proteína madura de HulFN-α2b (número de registro de nucleótido de GeneBank: NM_000605), que se encuentra bajo el control del promotor λPRPL termo-inducible. La expresión de HulFN-α2b se realizó siguiendo los protocolos descritos por Joseph S y David WR (116).

El plásmido de expresión pBV2bF se transformó en células DH5-α. Se seleccionaron individualmente colonias separadas y se inocularon en 2 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 30 °C durante 8 horas. Entonces los 2 ml de bacterias cultivadas se incubaron adicionalmente con 50 ml de medio que contenía 50 µg/ml de ampicilina durante la noche a 30 °C con agitación. A la mañana siguiente, el cultivo de bacterias se sembró a una razón de 1:10 ~ 1:20 en un gran volumen de medio LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina, y se incubaron a

30 °C con agitación. Cuando los cultivos habían alcanzado la fase media logarítmica de crecimiento ($A_{550} = 0,5-0,6$), la temperatura de incubación se elevó rápidamente hasta 42 °C y se mantuvo durante 4 horas con el fin de inducir la expresión de HulFN- $\alpha 2b$. Después de inducción por calor durante 4 horas, las células se centrifugaron y se lavaron con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM) 3 veces, entonces se almacenaron a -80 °C hasta que se procedió a la purificación

La proteína de HulFN- $\alpha 2b$ se expresó de manera insoluble en el sistema de expresión de *E. coli* que se describe en el presente documento y por tanto la recuperación de cuerpos de inclusión y procedimientos de lavado se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos descritos en Molecular Cloning (115). En resumen, las células bacterianas recogidas se resuspendieron en tampón de lisis celular I (Tris-Cl 50 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8), NaCl 100 mM) y se lisaron mediante lisozima y sonicación. Los cuerpos de inclusión se lavaron 3 veces con tampón de lisis celular II (tampón de lisis celular I complementado con Triton X-100 al 0,5 % (v/v)).

Los cuerpos de inclusión recuperados se rompieron mediante suspensión en guanidina 7N a temperatura ambiente con agitación durante 4 horas. Después de una centrifugación de 15 minutos a 4 °C, la proteína desnaturalizada se replegó en tampón Borex a pH 9,5 0,15 M durante 48 horas a 4 °C. El pH se ajustó a 7,4 mediante HCl en la última etapa de replegamiento.

La solución que contenía HulFN- $\alpha 2b$ replegado se purificó entonces mediante cromatografía de intercambio iónico hidrofóbica y filtración en gel. En primer lugar, la solución se cargó en y se pasó a través de la columna Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, EE.UU.). En segundo lugar, las fracciones que contenían HulFN- $\alpha 2b$ se aplicaron a la columna POROS 50 D (Applied Biosystems, EE.UU.). En tercer lugar, las fracciones que contenían HulFN- $\alpha 2b$ se sometieron a la purificación mediante columna POROS 50 HS (Applied Biosystems, EE.UU.). Finalmente, las moléculas de HulFN- $\alpha 2b$ recogidas se purificaron adicionalmente mediante HiLoad 26/100 Superdex 75pg (Amersham, EE.UU.). La proteína de HulFN- $\alpha 2b$ pura se mostró como una única banda mediante de SDS-PAGE al 15 % y su pureza era de > 98 % tal como se confirmó mediante espectrometría de masas.

Ejemplo 6. Determinación de la actividad anti-viral de Novaferon

La actividad anti-viral se determinó usando el sistema WISH-VSV tal como se describe en los protocolos clásicos descritos por Armstrong JA (113). El primer día se sembraron células WISH (ATCC, nº de catálogo CCL 25) en placas de 96 pocillos a una densidad de 14.000 células/pocillo y se incubaron a 37 °C. 24 horas más tarde, se añadieron Novaferon diluido 2 veces en serie, HulFN- $\alpha 2b$, estándares internacionales de IFN humano según la OMS o medio de cultivo en blanco a cada pocillo, y se incubaron a 37 °C durante otras 24 horas. El tercer día, el medio se retiró y se reemplazó por medio que contenía 1000 UFP de virus de estomatosis vesicular (VSV, ATCC, número de catálogo VR-1421). Las células se incubaron de nuevo durante 24 horas a 37 °C y entonces se lavaron con NaCl al 0,85 % para eliminar las células muertas. A continuación, las placas de cultivo se empaparon en solución fijadora de colorante (violeta cristal al 0,5 %, formalina al 5 % (V/V), etanol al 50 % (V/V), y NaCl al 0,85 %) durante 1 hora. La solución fijadora de colorante se decantó entonces y las microplacas se enjuagaron meticulosamente con agua del grifo y se dejaron secar. Las células teñidas se disolvieron en 0,2 ml de 2-metoxietanol. Las placas se leyeron a 550 nm en un Model Opsys MR (Thermo Labsystems, EE.UU.) para el bioensayo con violeta cristal.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y las muestras de Novaferon y HulFN- $\alpha 2B$ se sometieron a ensayo en la misma placa. Las actividades anti-virales de Novaferon y HulFN- $\alpha 2b$ preparados en el presente documento se sometieron a ensayo en paralelo y las unidades anti-virales (unidad internacional, o UI) se determinaron con referencia a las normas internacionales de la OMS, 94/786 (rHulFN- α consenso) y 95/650 (rHulFN- $\alpha 2A$), que se adquirieron del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, USA).

La actividad anti-viral medida de la proteína de Novaferon modificada frente a VSV sobre WISH fue de $2,5 \times 10^9$ UI/mg mientras que la actividad anti-viral de HulFN- $\alpha 2b$ es $2,0 \times 10^8$ UI/mg. Estos datos indican que la actividad anti-viral de la proteína de Novaferon es aproximadamente 12,5 veces más fuerte que la de HulFN- $\alpha 2b$.

Ejemplo 7 Actividad anti-proliferativa de Novaferon

El ensayo de actividad anti-proliferativa se llevó a cabo básicamente tal como se describe por Evinger y Pestka (101).

A. Cultivo celular de líneas de células tumorales humanas

Las líneas de células tumorales humanas se adquirieron de diferentes organizaciones (Tabla 1 a continuación), en concreto, ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, P.O. Caja 1549, Manassas, VA 20108, EE.UU.), DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania), JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources-Cell Bank, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japón).

Tabla 1. Líneas celulares de tumor humano

Líneas celulares	Tumores	Códigos	Organizaciones*
A-375	Melanoma	CRL1619	ATCC
IGR-1	Melanoma	Acc 236	DSMZ
IGR-37	Melanoma	Acc 237	DSMZ
IPC-298	Melanoma	Acc 251	DSMZ
HCT-8	Adenocarcinoma colorrectal	CCL-244	ATCC
SW1116	Adenocarcinoma colorrectal	CCL-233	ATCC
LS 180	Adenocarcinoma colorrectal	CL-187	ATCC
DLD-1	Adenocarcinoma colorrectal	CCL-221	ATCC
LS174T	Adenocarcinoma colorrectal	CL-188	ATCC
Hep G2	carcinoma hepatocelular	HB-8065	ATCC
Hep3B	carcinoma hepatocelular	HB-8064	ATCC
HuH-7	Hepatoma	0403	JCRB
PLC/PRF/5	Hepatoma	CRL-8024	ATCC
HL60(S)	linfocítico	0163	JCRB
Daudi	Linfoma de Burkitt	CCL-213	ATCC
L-428	Linfoma de Hodgkin	Acc 197	DSMZ
DU 145	Carcinoma de próstata	HTB-81	ATCC
PC-3	Carcinoma de próstata	Acc 465	DSMZ
MKN 1	Adenocarcinoma gástrico	0252	JCRB
KYSE 30	Carcinoma de esófago	0188	JCRB
A549	Carcinoma de pulmón	CCL-185	ATCC
HeLa	Adenocarcinoma de cuello uterino	CCL-2	ATCC
C-33A	Carcinoma de cuello uterino	HTB-31	ATCC

* DSMZ: Centro de Recursos Nacionales Alemán para Material Biológico (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) Alemania

ATCC: *American Type Culture Collection*, USA

JCRB: *Japanese Collection of Research Bioresources-Cell Bank*, Japón

- 5 Todas las células usadas en pruebas de actividad anti-proliferativa se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía el 5 % de CO₂. Las células se hicieron crecer de acuerdo con el manual de crecimiento de cada célula, en medio de crecimiento basal, tal como DMEM, MEM, F12K y 1640 o 1640 más F12 (todos de Gibco BRL, EE.UU.), complementado con suero de bovino fetal inactivado por calor al 5-20 % FBS, de Gibco BRL, EE.UU..
- 10 El medio de crecimiento basal para cada línea celular individual se enumera en la Tabla 2, a continuación. Todas las líneas celulares se examinaron diariamente en placas de cultivo bajo un microscopio invertido. Las células se recogieron y se usaron para experimentos en su fase de crecimiento logarítmica con viabilidades que superaban el 90 % tal como se determinaba mediante exclusión de colorante azul tripán. Los recuentos celulares y las viabilidades se examinaron en un hematocitómetro convencional.

Tabla 2. Cultivo y métodos de medición de líneas celulares de tumor humano

Línea celular	Medio de cultivo	Células/Pocillo	Métodos de medición
IGR-1	DMEM	5000	bioensayo de violeta cristal
IGR-37	DMEM	2000	bioensayo de violeta cristal
IPC-298	1640	2000	bioensayo de violeta cristal
HCT-8	1640	500	bioensayo de violeta cristal
LS 180	MEM	3000	bioensayo de violeta cristal
DLD-1	1640	1500	bioensayo de violeta cristal
Hep G2	MEM	1000	bioensayo de violeta cristal
Hep 3B	MEM	800	bioensayo de violeta cristal
HuH-7	DMEM	4000	bioensayo de violeta cristal
PLC/PRF/5	MEM	6000	bioensayo de violeta cristal
KYSE 30	1640+F12	1000	bioensayo de violeta cristal
DU 145	MEM	1000	bioensayo de violeta cristal
PC-3	1640	2000	bioensayo de violeta cristal
MKN 1	1640	2000	bioensayo de violeta cristal

A549	F12K	400	bioensayo de violeta cristal
SW 1116	1640	1000	bioensayo de violeta cristal
LS 174T	MEM	4000	bioensayo de violeta cristal
HeLa	MEM	500	bioensayo de violeta cristal
C-33A	MEM	1000	bioensayo de violeta cristal
A-375	DMEM	200	bioensayo de violeta cristal
HL 60(S)	1640	800	recuento celular directo
Daudi	1640	400	recuento celular directo
L-428	1640	800	recuento celular directo

B. Procedimiento para ensayo anti-proliferativo

5 Las líneas celulares con fase de crecimiento logarítmico se suspendieron suavemente en medio calentado (36 °C) hasta una densidad de 2×10^3 - 6×10^4 células/ml (variable con la línea celular, véase la Tabla 2). 100 µl de suspensión celular se sembró en cada pocillo de placa de 96 pocillos, seguido de incubación durante 6-8 horas a 37 °C. Entonces se añadieron volúmenes iguales (100 µl) de Novaferon o HulFN-α2b diluido en medio de cultivo a los pocillos por triplicado. Las placas se agitaron suavemente durante 4-5 segundos para mezclar el contenido, y se incubaron a 37 °C durante 6 días. Las muestras de Novaferon y de HulFN-α2b se sometieron a ensayo en la misma placa con el fin de garantizar la comparabilidad.

Se usaron dos métodos para determinar los números de células en un pocillo de células y para calcular las actividades anti-proliferativas de Novaferon y de HulFN-α2b de acuerdo con los números de células.

15 Se usó un método de recuento de células para determinar el número de células de célula en suspensión. Después de 6 días de cultivo, los cultivos de células en suspensión se diluyeron con azul tripán (concentración final: 0,02 %), y se contaron los números de células directamente usando un hematocitómetro.

20 Se usó el método de bioensayo de violeta cristal para determinar los números de células de las células adhesivas (93). Después de 6 días de cultivo, las células muertas se retiraron pipeteando PBS arriba y abajo en los pocillos de cultivo. A continuación se llenaron los pocillos con solución fijadora de colorante para teñir las células vivas durante 1 hora. La solución fijadora de colorante contenía el 0,5 % de violeta cristal, 0,5 % de formalina (V/V), 50 % de etanol (V/V), y 0,85 % de NaCl en agua destilada. Entonces las microplacas se enjuagaron meticulosamente con agua del grifo y se dejaron secar. Las células teñidas se disolvieron en 0,2 ml de 2-metoxietanol la densidad óptica a 550 nm (DO550) (lector de placas Modelo Opsys, Thermo Labsystems, EE.UU.), se midió y se usó como el indicador relativo de los números de células.

30 La tasa de inhibición del crecimiento se calculó mediante la siguiente fórmula: Tasa de inhibición % = $(1 - (E - B) / (C - B)) \times 100$, donde E era el número de células del valor de DO₅₅₀ en pocillos tratados con Novaferon o HulFN-α2b en el día 6; B era el número de células del valor de DO₅₅₀ en un cultivo celular en el día 0; C era el número de células del valor de DO₅₅₀ en pocillos no tratados en el día 6.

35 La tasa de inhibición se expresó junto con las concentraciones de compuestos. La CI₅₀ de Novaferon o HulFN-α2b se estimó usando un intervalo de concentraciones de muestra. Los datos se ajustaron a la curva sigmoidea (117) con una pendiente de Hill uno: $Y = \text{min} + (\text{Max} - \text{min}) / (1 + 10^{-(X - X_{50})})$, donde X es la concentración logarítmica de fármaco; Y es la tasa de inhibición; Min o Max es la meseta de tasa de inhibición mínima o máxima. La CI₅₀ de varios compuestos frente a una diana particular puede compararse, donde una CI₅₀ inferior indica un compuesto más potente.

40 Las concentraciones de Novaferon y HulFN-α2b y las correspondientes tasas de inhibición de crecimiento celular para la línea de células Daudi se presentan en la Figura 4. Basándose en estos datos, la CI₅₀ de Novaferon y HulFN-α2b para inhibir el crecimiento de células Daudi se calcularon como 0,0174 pmol y 6,9550 pmol. Por lo tanto, la CI₅₀ de Novaferon es aproximadamente de 1/400 la de HulFN-α2b, representando un aumento de aproximadamente 400 veces de potencia anti-proliferativa de Novaferon en comparación con HulFN-α2b.

45 Las actividades anti-proliferativas de Novaferon se evaluaron y se compararon con las de HulFN-α2b en 23 líneas celulares de tumor, incluyendo 4 líneas celulares derivadas de melanoma (A-375, 1GR-1, la 1GR-37, 1PC-298), 5 líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal (HCT-8, SW1116, LS 180, DLD-1, LS174T), 4 líneas celulares de cáncer de hígado (Hep G2, Hep 3B, HuH-7, PLC/PRF/5), 3 líneas celulares de linfoma (HL-60(S), 2 líneas celulares de carcinoma de próstata (DU 145, PC-3), 2 líneas celulares de cáncer de cuello uterino (HeLa, C-33A), 1 línea celular de adenocarcinoma gástrico (MKN 1), 1 línea celular de carcinoma de pulmón (A 549) y una línea celular de cáncer de esófago (KYSE 30). Novaferon mostró actividades anti-proliferativas mucho más fuertes que las de HulFN-α2b frente a todas las líneas celulares de cáncer sometidas a ensayo. El alcance del aumento de la potencia varió en las diferentes líneas celulares de cáncer, y oscilaba desde 16 hasta 1134 veces (Tabla 3, a continuación).

55 **Tabla 3.** Valores de CI₅₀ de Novaferon y HulFN-α2b y las veces aumentadas de la inhibición de células tumorales

por Novaferon con respecto a HulFN- α 2b.

Líneas celulares	Cl ₅₀ (pmol)		Veces (Novaferon/HulFN- α 2b)
	HulFN- α 2b	Novaferon	
PLC/PRF/5	0,0407	0,0025	16
A549	4,27	0,2202	19
DU 145	0,1319	0,0036	36
HepG2	0,1718	0,004	43
HuH-7	0,1474	0,0026	58
Hep3B	4,3934	0,0758	58
IPC-298	0,0516	0,0007	70
LS174T	0,0165	0,0002	74
IGR-37	0,6017	0,0055	109
PC-3	1,8777	0,0146	128
HeLa	0,2364	0,0017	141
C-33A	2,5242	0,0176	143
MKN I	0,233	0,0011	207
HCT-8	2,9479	0,0139	212
SW 1116	0,2278	0,001	222
DLD-1	0,3977	0,0014	282
HL-60(S)	0,5855	0,0019	306
LS 180	0,7579	0,0022	350
Daudi	6,955	0,0174	400
KYSE 30	18,0134	0,0264	683
A-375	1,4134	0,0019	733
IGR-1	6,6718	0,0076	876
L-428	17,2789	0,0152	1134

Ejemplo 8. Experimentos de modelo tumoral *in vivo*

5 A. Cultivo celular y modelos de xenoinjerto de tumor humano *in vivo*

La línea celular de cáncer de colon (LS 180), línea celular de melanoma (A-375) y línea celular de cáncer de hígado (Hep G2) se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD). La línea celular de cáncer de próstata (PC-3) se obtuvo de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen, Alemania). La línea celular linfocítica (HL 60(s)) se adquirió de la Colección Japonesa de Biorecursos de Investigación de Banco Celular (JCRB, Japón). Todas las células se cultivaron de acuerdo con sus instrucciones (véase la Tabla 1). En resumen, LS 180 y Hep G2 se cultivaron en medio MEM. A-375 se cultivó en DMEM. Ambos medios se complementaron con suero bovino fetal al 10 % (FBS), glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y piruvato de sodio 1,0 mM. Las células PC-3 y HL 60(S) se cultivaron en RPMI 1640, se complementaron con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin. Todas las células se mantuvieron en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C.

Se establecieron modelos de xenoinjerto de cáncer humano usando los métodos descritos por Beverly y col. (118). Las células cancerosas en crecimiento en fase logarítmica se recogieron de las placas de cultivo tisular, se lavaron y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7,5, 20 mM). Los xenoinjertos de tumor subcutáneo se generaron en ratones atímicos de 6 semanas de edad Balb/c mediante inyección de 6×10^6 células/0,3 ml (PC-3, HepG2), 4×10^6 células/0,3 ml (LS 180, 2×10^7 células/0,3 ml (HL 60(s)) u 8×10^6 células/0,3 ml (A-375) por vía subcutánea o en ambos lados de la región del costado. Para cada modelo de tumor *in vivo*, en el día 6 después de la inoculación de células tumorales, los ratones que portaban tumor (volumen tumoral de aproximadamente 100 mm³) se dividieron aleatoriamente en 7 u 8 grupos con iguales números de animales en cada grupo y se comenzó el tratamiento.

Se formularon Novaferon y HulFN- α 2b con solución de PBS. Inyección subcutánea diaria de PBS solo, varias dosis de Novaferon, o HulFN- α 2b duraron 30 días en total (PC-3, HepG2, A-375), 28 días (LS 180) o 21 días (HL 60(s)) a partir del día del agrupamiento de los ratones. Para el tratamiento de 5-FU, 30 mg/kg de 5-FU se administró i.v. una vez cada dos días durante un total de 5 veces. Los grupos y las dosis de tratamiento se resumen a continuación:

- Grupo 1 (Control): PBS diariamente.
- Grupo 2 (dosis baja de Novaferon): 1,25 μ g/kg diariamente.
- Grupo 3 (dosis media de Novaferon): 12,5 μ g/kg diariamente.
- Grupo 4 (dosis alta de Novaferon): 125 μ g/kg diariamente.
- Grupo 5 (dosis baja de HulFN- α 2b): 1,25 μ g/kg diariamente.
- Grupo 6 (dosis media de HulFN- α 2b): 12,5 μ g/kg diariamente.
- Grupo 7 (dosis alta de HulFN- α 2b): 125 μ g/kg diariamente.

Grupo 8 (5-FU): 30 mg/kg, administración i.v. una vez cada 2 días durante 5 veces.

Una vez comenzado el tratamiento, se midieron los tumores con un calibre una vez a la semana. Los volúmenes tumorales se calcularon usando la siguiente fórmula: volumen = $0,5 \times (\text{anchura})^2 \times (\text{longitud})$. Los ratones se sacrificaron el día de la interrupción del tratamiento (día 30 después del comienzo del tratamiento). Los tumores sólidos se aislaron, se fotografiaron y se midieron.

La tasa inhibitoria del crecimiento se calculó usando la siguiente fórmula: tasa inhibitoria = $[1 - T/C] \times 100 \%$, donde T es el peso tumoral promedio en grupos tratados con Novaferon, con HulFN- α 2b, o 5-FU; C es el peso tumoral promedio en el grupo control tras el tratamiento.

B. Modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata humano

Se trataron xenoinjertos de PC-3 de cáncer de próstata con inyección s.c. de 1,25, 12,5 o 125 μ g/kg de Novaferon durante 30 días. Novaferon mostró una inhibición fuerte, dependiente de la dosis del crecimiento de tumor de PC-3 ($P < 0,05$). Tal como se muestra en la Figura 5 y la Tabla 4, a continuación, el crecimiento del tumor de PC-3 en grupos tratados con Novaferon se suprimió enormemente en comparación con el grupo control de tratamiento con PBS. Por ejemplo, el peso promedio de masa tumoral de xenoinjerto de PC-3 en el grupo tratado con Novaferon (125 μ g/kg), $0,091 \pm 0,081$ g, se redujo muy significativamente en comparación con los animales control, $1,948 \pm 0,567$ g ($P < 0,001$) (Tabla 4). En otras palabras, el tratamiento de 30 días de 125 μ g/kg logró un 95,3 % de inhibición del crecimiento de tumor de PC-3 (Tabla 4).

Tabla 4. Peso tumoral y tasas de inhibición del crecimiento de xenoinjertos de PC-3 de cáncer de próstata humano tratados con Novaferon y HulFN- α 2b ($n = 10$)

Grupo	Dosis (μ g/kg)	Peso tumoral (g) (media \pm DE)	Tasa de inhibición (%)
Control	-	$1,948 \pm 0,567$	-
Dosificación baja de Novaferon	1,25	$1,266 \pm 0,457^*$	35,0
Dosificación media de Novaferon	12,5	$0,759 \pm 0,574^{***}$	61,0
Dosificación alta de Novaferon	125	$0,091 \pm 0,081^{***@@@}$	95,3
Dosificación baja de HulFN- α 2b	1,25	$1,284 \pm 0,862$	34,1
Dosificación media de HulFN- α 2b	12,5	$0,790 \pm 0,391^*$	59,4
Dosificación alta de HulFN- α 2b	125	$0,476 \pm 0,271^{***}$	75,6

nota: * $p < 0,06$, *** $p < 0,001$: en comparación con el grupo control; @@@ $p < 0,001$: en comparación con el grupo de dosis alta de HulFN- α 2b

Se trataron ratones atímicos Balb/c con inyección s.c. diaria de Novaferon (1,25 μ g/kg, 12,5 μ g/kg o 125 μ g/kg) durante 30 días después haberse introducido por vía subcutánea en los ratones 6×10^6 células PC-3 vivas. Los resultados se expresaron como volumen tumoral promedio (mm^3). La Figura 5 mostró que las tres dosis de Novaferon mostraban una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento tumoral de PC-3 en comparación con el grupo control de PBS ($P < 0,05$). 125 μ g/kg de Novaferon indujeron una inhibición mucho más fuerte, o casi completa del crecimiento tumoral de PC-3 que la de HulFN- μ 2b con la misma dosis (95,3 % frente a 75,6 %, $P < 0,01$) (Tabla 4).

Es interesante observar que el tratamiento más largo de Novaferon o HulFN- α 2b dio como resultado mayores diferencias en la inhibición del crecimiento tumoral en los grupos tratados con la dosis alta (125 μ g/kg). El volumen promedio de la masa tumoral de PC-3 en el grupo tratado con Novaferon fue de $107,9 \pm 68,7$ mm^3 frente a $620,7 \pm 296,6$ mm^3 en el grupo tratado con HulFN- α 2b en el día 28 ($P < 0,001$) y $122,1 \pm 100,7$ mm^3 frente a $691,9 \pm 428,3$ mm^3 en el día 30 ($P < 0,001$). Éste era el caso también cuando el peso tumoral promedio se consideró después de la terminación de la observación ($0,091 \pm 0,081$ g en grupos de alta dosificación de Novaferon frente a $0,476 \pm 0,271$ gramos en el grupo de alta dosificación de HulFN- α 2b, $P < 0,001$). Esto sugirió que el tratamiento más largo de Novaferon con esta dosis puede presentar una inhibición mejor o completa de crecimiento de tumor de PC-3 en este modelo de xenoinjerto.

C. Modelo de xenoinjerto de cáncer de hígado humano

La actividad antitumoral *in vivo* de Novaferon se evaluó también en el modelo de xenoinjerto de Hep G2 de cáncer de hígado. Novaferon mostró una inhibición efectiva, dependiente de la dosis de crecimiento de tumor de Hep G2 en comparación con el grupo control ($P < 0,001$). Los volúmenes tumorales promedio en grupos tratados con Novaferon (inyección s.c. diaria de 1,25, 12,5 o 125 μ g/kg durante 30 días) fueron $783,2 \pm 270,0$, $459,3 \pm 414,3$ y $104,6 \pm 56,5$ mm^3 , respectivamente, en comparación $2125,8 \pm 743,1$ mm^3 en el grupo control con PBS. El tratamiento 30 días de 125 μ g/kg de Novaferon consiguió la mayor inhibición del Hep G2 (96,6 %), que era significativamente mejor que la inhibición con 125 μ g/kg de HulFN- α 2b (89,2 %, $P < 0,01$). El tratamiento más largo de Novaferon con esta dosis mostró la tendencia de una inhibición incluso mejor o completa. El peso tumoral promedio al final del periodo de

observación fue de $0,074 \pm 0,083$ g en $125 \mu\text{g}/\text{kg}$ para el grupo tratado con Novaferon, significativamente inferior de en $125 \mu\text{g}/\text{kg}$ del grupo tratado con HulFN- α 2b ($0,235 \pm 0,199$ gramos, $P < 0,001$) (Tabla 5, a continuación).

5 Ratonés atímicos Balb/c se trataron con inyección s.c. diaria de Novaferon ($1,25 \mu\text{g}/\text{kg}$, $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ o $125 \mu\text{g}/\text{kg}$) durante 30 días después de haberse introducido por vía subcutánea en los ratones 6×10^6 células Hep G2 vivas. Los resultados se expresaron como volumen tumoral promedio (mm^3). La Figura 6 mostró que las tres dosis de Novaferon presentaban una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de tumor de Hep G2 en comparación con el grupo de control de PBS ($P < 0,001$). $125 \mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon indujeron una inhibición mucho más fuerte, o casi completa del crecimiento de tumor de Hep G2 que la de HulFN- α 2b con la misma dosis (96,6 % frente a 89,2 %), $P < 0,05$) (Tabla 5).

Tabla 5. Peso tumoral y tasas de inhibición del crecimiento de xenoinjertos de Hep G2 de células de cáncer de hígado humano tratados con Novaferon y HulFN- α 2b ($n = 10$)

Grupo	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Peso tumoral (g) (Media \pm DE)	Tasa de inhibición (%)
Control	-	$2,179 \pm 0,578$	-
Dosificación baja de Novaferon	125	$0,797 \pm 0,397^{***}$	63,4
Dosificación media de Novaferon	12,5	$0,321 \pm 0,300^{***}$	85,3
Dosificación alta de Novaferon	125	$0,074 \pm 0,083^{***@}$	96,6
Dosificación baja de HulFN- α 2b	1,25	$1,070 \pm 0,587^{**}$	50,9
Dosificación media de HulFN- α 2b	12,5	$0,53 \pm 0,287^{***}$	75,6
Dosificación alta de HulFN- α 2b	125	$0,235 \pm 0,199^{***}$	89,2

Nota: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, en comparación con el grupo control. @ $p < 0,01$, en comparación con el grupo de dosificación alta de HulFN- α 2b

15 D. Modelo de xenoinjerto de melanoma humano

La actividad antitumoral *in vivo* de Novaferon se evaluó adicionalmente en modelo de xenoinjerto de A-375 de melanoma maligno. La línea celular A-375 (número de ATCC: CRL-1619) se derivó de un tumor sólido maligno humano. Novaferon presentó una inhibición efectiva, dependiente de la dosis de crecimiento de tumor de A-375 en comparación con el grupo control ($P < 0,001$). Las tasas de inhibición en los grupos tratados con Novaferon (inyección s.c. diaria de $1,25$, $12,5$ o $125 \mu\text{g}/\text{kg}$ durante 28 días) fueron de 40,1 %, 75,0 % y del 82,8 % respectivamente, en comparación con el grupo control de PBS ($P < 0,001$) (Tabla 6, a continuación). El tratamiento de 30 días de $125 \mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon logró la mayor inhibición del A-375 (82,8 %), que era significativamente mejor que la inhibición con $125 \mu\text{g}/\text{kg}$ de HulFN- α 2b (69,9 %, $P < 0,001$).

25 De manera interesante, Novaferon mostró una inhibición más eficaz del crecimiento de la célula de melanoma A-375 que el agente quimioterápico, 5-FU (Tabla 6). El día 30, por ejemplo, los pesos tumorales medios en los grupos tratados con $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ o $125 \mu\text{g}/\text{kg}$ fueron de $0,763 \pm 0,187$ ($P < 0,01$) y $0,527 \pm 0,149$ ($P < 0,001$) gramos, mientras que el peso tumoral medio para el grupo tratado con 5-FU, 30 mg/kg, era de $1,004 \pm 0,105$ gramos (Tabla 6). Esto indica que Novaferon puede ser más efectivo para el tratamiento del melanoma humano A-375 que 5-FU.

35 Ratonés atímicos Balb/c se trataron con inyección s.c. diaria de Novaferon ($1,25 \mu\text{g}/\text{kg}$, $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ y $125 \mu\text{g}/\text{kg}$) durante 28 días después de haberse introducido por vía subcutánea en los ratones 8×10^6 células A-375. Los resultados se expresan como volumen tumoral promedio (mm^3). La Figura 7 mostró que las tres dosis de Novaferon mostraban una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de tumor de A-375 en comparación con el grupo control de PBS ($P < 0,001$). $125 \mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon indujeron una inhibición más fuerte del crecimiento tumoral de A-375 que la de HulFN- α 2b con la misma dosis (82,8 % frente a 69,9 %), $P < 0,001$) (Figura 7). Tanto $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ como $125 \mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon mostraron una mejor supresión (75,0 % y 82,8 % respectivamente) del crecimiento tumoral que con 5-FU (67,2 %, $P < 0,01$ y $P < 0,001$) (Figura 7).

Tabla 6. Peso tumoral y tasas de inhibición del crecimiento de xenoinjertos de A-375 de célula de melanoma humano tratados con Novaferon y HulFN- α 2b ($n = 10$)

Grupo	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Peso tumoral (g) (X \pm DE)	Tasa de inhibición (%)
Control	-	$3,057 \pm 0,384$	-
Dosificación baja de Novaferon	1,25	$1,830 \pm 0,289^{***}$	40,1
Dosificación media de Novaferon	12,5	$0,763 \pm 0,187^{***} \&\& \&\&\&$	75,0
Dosificación alta de Novaferon	125	$0,527 \pm 0,149^{***} \&\& \&\& @ \&\&$	82,8
Dosificación baja de HulFN- α 2b	1,25	$1,890 \pm 0,148^{***}$	38,2
Dosificación media de HulFN- α 2b	12,5	$1,681 \pm 0,132^{***}$	45,0
Dosificación alta de HulFN- α 2b	125	$0,920 \pm 0,139^{***}$	69,9
5-FU	30.000	$1,004 \pm 0,105^{***}$	67,2

nota: *** $p < 0,001$, en comparación con el grupo control; \$\$\$ $p < 0,001$, en comparación con dosificación media de HulFN- $\alpha 2b$ (12,5); @@@ $p < 0,001$ en comparación con grupo de dosificación alta de HulFN- $\alpha 2b$ (125) ; &&: $p < 0,01$, &&&: $p < 0,001$, en comparación con el grupo de 5-FU

E. Modelo de xenoinjerto de cáncer de colon humano

5 La actividad antitumoral *in vivo* de Novaferon se evaluó en modelo de xenoinjerto de LS 180 de cáncer de colon. La línea celular LS 180 (número de ATCC: CL-187) se derivó de un adenocarcinoma de colon humano. Novaferon presentó una inhibición efectiva, dependiente de la dosis de crecimiento de tumor de LS 180 de cáncer de colon en comparación con el grupo control ($P < 0,001$). Las tasas de inhibición en los grupos tratados con Novaferon (inyección s.c. diaria de 1,25, 12,5 o 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ durante 28 días) fueron de 75,0 %, 80,5 % y 92,5 % respectivamente, en comparación con el grupo control de PBS ($P < 0,001$, Tabla 7, a continuación). El tratamiento de 28 días de 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon logró la mayor inhibición del crecimiento de tumor de LS 180 (92,5 %), que era significativamente mejor que la inhibición con 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de HulFN- $\alpha 2b$ (82,3 %, $P < 0,001$).

15 Después del tratamiento de 28 días, 12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon inhibieron el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de LS 180 de manera similar a 5-FU (30 mg/kg) en cuanto a los pesos tumorales promedio, (0,815 \pm 0,221 gramos frente a 0,758 \pm 0,227 gramos). 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon inhibieron el crecimiento tumoral de LS 180 significativamente mejor que 30 mg/kg de 5-FU (92,5 % frente a 81,8 %, $P < 0,001$) (Tabla 7 y Figura 8). Esta observación era extremadamente interesante considerando la aplicación clínica rutinaria de 5-FU en la quimioterapia convencional en pacientes con cáncer de colon. La mejor supresión por Novaferon del crecimiento tumoral de LS180 en modelo animal indica que Novaferon tiene el potencial de trabajar como un agente contra el cáncer de colon muy efectivo en un entorno clínico.

25 Ratones atímicos Balb/c se trataron con una inyección diaria de Novaferon (1,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) durante 28 días después de haberse introducido por vía subcutánea en los ratones 4×10^6 LS 180. Los resultados se expresaron como el volumen tumoral promedio (mm^3). La Figura 8 mostró que las tres dosis de Novaferon presentaban una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de tumor LS 180 en comparación con el grupo control de PBS ($P < 0,001$). 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon indujeron una inhibición más fuerte del crecimiento de tumor de LS 180 que la de con HulFN- $\alpha 2b$ con la misma dosis (92,5 % frente a 82,3 %, $P < 0,001$) (Tabla 7). Tanto 1,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ como 12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon consiguieron una supresión similar (75,0 % y 80,5 % respectivamente) del crecimiento tumoral en comparación con 5-FU (81,8 %) (Tabla 7, Figura 8). Sin embargo, 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon presentaron una inhibición mucho mejor del crecimiento tumoral de LS 180 que la de 5-FU (92,5 % frente a 81,8 %, $P < 0,001$).

Tabla 7. Peso tumoral y tasas de inhibición del crecimiento de xenoinjertos de LS 180 de célula de cáncer de colon humano tratados con Novaferon y HulFN- $\alpha 2b$ ($n = 10$)

Grupo	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Peso tumoral (g) ($X \pm \text{DE}$)	Tasa de inhibición (%)
Control	-	4,170 \pm 3,409	-
Dosificación baja de Novaferon	1,25	1,043 \pm 0,433***	75,0
Dosificación media de Novaferon	12,5	0,815 \pm 0,221***	80,5
Dosificación alta de Novaferon	125	0,314 \pm 0,086*** &&& @@@	92,5
Dosificación baja de HulFN- $\alpha 2b$	1,25	1,225 \pm 0,565***	70,6
Dosificación media de HulFN- $\alpha 2b$	12,5	1,076 \pm 0,442***	74,2
Dosificación alta de HulFN- $\alpha 2b$	125	0,740 \pm 0,310***	82,3
5-FU	30.000	0,758 \pm 0,227***	81,8

Nota: *** $p < 0,001$, en comparación con el grupo control; @@@, $p < 0,001$, en comparación con dosificación alta de HulFN- $\alpha 2b$; &&&, $p < 0,001$, en comparación con el grupo de 5-FU

F. Modelo de xenoinjerto de leucemia humana

35 La actividad antitumoral *in vivo* de Novaferon se evaluó también en modelo de xenoinjerto de leucemia linfofítica de HL 60 (s). Novaferon mostró una inhibición efectiva, dependiente de la dosis de crecimiento de tumor de HL 60(s) en comparación con el grupo control ($P < 0,001$). Las tasas de inhibición de los grupos tratados con Novaferon (inyección s.c. diaria de 1,25, 12,5 o 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ durante 28 días) fueron de 43,8 %, 55,2 % y 80,4 % respectivamente, en comparación con el grupo control de PBS ($P < 0,001$, Tabla 8, a continuación). El tratamiento de 21 días de 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon logró la mayor inhibición del crecimiento de tumor de HL 60(s) (80,4 %), que era significativamente mejor que la inhibición con 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de HulFN- $\mu 2b$ (69,8 %, $P < 0,05$).

45 Ratones Balb/c se trataron con la inyección s.c. diaria de Novaferon (1,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) durante 21 días después de haberse introducido por vía subcutánea en los ratones 2×10^7 células HL 60(s) vivas. Los resultados se expresaron como volumen tumoral promedio (mm^3). La Figura 9 mostró que las tres dosis de Novaferon mostraron una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento tumoral de LS180 en comparación con el grupo control de PBS ($P < 0,001$). 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Novaferon indujeron una inhibición más fuerte del crecimiento

tumoral de LS 180 que la inhibición con HUlFN- α 2b con la misma dosis (80,4 % frente al 69,8 %), $P < 0,05$) y una inhibición similar en comparación con 5-FU (Figura 9, Tabla 8)

Tabla 8. Peso de tumor y tasas de inhibición del crecimiento de xenoinjertos de LS60(S) de célula de leucemia humana tratados con Novaferon y HUlFN- α 2b ($n = 10$)

Grupo	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Peso tumoral (g) ($X \pm \text{DE}$)	Tasa de inhibición (%)
Control	-	3,723 \pm 0,750	-
Dosificación baja de Novaferon	1,25	2,091 \pm 0,653***	43,8
Dosificación media de Novaferon	12,5	1,668 \pm 0,665***	55,2
Dosificación alta de Novaferon	125	0,729 \pm 0,332***@	80,4
Dosificación baja de HUlFN- α 2b	1,25	2,401 \pm 0,698***	35,5
Dosificación media de HUlFN- α 2b	12,5	1,870 \pm 0,660***	49,8
Dosificación alta de HUlFN- α 2b	125	1,124 \pm 0,397***	69,8
5-FU	30.000	0,893 \pm 0,289***	76,0

Nota: *** $p < 0,001$, en comparación con el grupo control; @ $p < 0,05$, en comparación con el grupo de dosificación alta de HUlFN- α 2b (125)

G. Estado general de los ratones durante el tratamiento con Novaferon

Los ratones con los diversos xenoinjertos de cánceres humanos se observaron de cerca durante el periodo de tratamiento con Novaferon, HUlFN- α 2b o 5-FU. A diferencia de los grupos tratados con 5-FU, los ratones en todos los grupos tratados con Novaferon o HUlFN- α 2b generalmente comieron y se comportaron normalmente y no tuvieron pérdida de peso. Los ratones tratados con 5-FU mostraron cambios típicos de apetito y comportamiento, y pérdida de peso. Estas observaciones indican que aunque muestra una potencia anticancerígena similar o mejor que 5-FU en los modelos de animal de xenoinjerto, Novaferon puede ser más específico frente a la inhibición de células cancerosas y puede tener muchos menos efectos sobre las células normales y/o las funciones fisiológicas. Esto puede traducirse en una mejor tolerancia y en efectos terapéuticos superiores en aplicaciones en seres humanos.

REFERENCIAS

1. Interferon nomenclature. Nature. 1980; 286 (5769):110
2. Isaacs A y Lindenmann J. Production of viral interfering substance. Patente de los Estados Unidos N°: 369922. 17 de octubre de 1972
3. Jonasch E y Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. Oncologist. 2001; 6(1):34-55
4. Lengyel P. Biochemistry of interferons and their actions. Annu Rev Biochem. 1982; 51:251-28
5. Gresser I y Tovey MG. Antitumor effects of interferon. Biochim Biophys Acta. 1978; 516(2):231-247
6. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(4):778-809
7. Theofilopoulos AN, y col. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. Annu Rev Immunol. 2005; 23:307-336
8. Uze G, y col. Alpha and beta interferons and their receptor and their friends and relations. J Interferon Cytokine Res. 1995; 15(1): 3-26
9. Knight E Jr. Interferon: purification and initial characterization from human diploid cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1976; 73(2):520-523
10. Pestka S, y col. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. Immunol Rev. 2004; 202:8-32
11. Horisberger MA y Di Marco S. Interferon-alpha hybrids. Pharmacol Ther. 1995; 66(3):507-534
12. Horton HM, y col. Antitumor effects of interferon-omega: in vivo therapy of human tumor xenografts in nude mice. Cancer Res. 1999; 59(16):4064-4068.
13. Hardy MP, y col. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. Genomics. 2004; 84(2):331-345.
14. Chen J, y col. Human interferon- ϵ : a type I interferon. Patente de los Estados Unidos N°: 6569420. 27 de mayo de 2003
15. Pestka S, y col. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. Annu Rev Immunol 2004, 22:929-979

16. Nardelli B, y col. Regulatory effect of IFN-kappa, a novel type I IFN, on cytokine production by cells of the innate immune system. *J. Immunol.* 2002; 169(9):4822-4830
- 5 17. LaFleur DW, y col. Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276(43): 39765-39771
18. Subramaniam PS, Johnson HM. The IFNA subunit of the type I IFN receptor complex contains a functional nuclear localization sequence. *FEBS Lett.* 2004; 578(3):207-210
- 10 19. Goodbourn S, y col. Interferons: cell signalling, immune modulation, anti-viral response and virus countermeasures. *J Gen Virol.* 2000; 81(Pt 10):2341-2364
- 15 20. Wang K, y col. Inhibition of neutrophil apoptosis by type I IFN depends on cross-talk between phosphoinositol 3-kinase, protein kinase C-delta, and NF-kappa B signaling pathways. *J Immunol.* 2003; 171(2):1035-1041
21. Katze MG Interferon, PKR, virology, and genomics: what is past and what is next in the new millennium? *J Interferon Cytokine Res.* 2002; 22(3):283-286
- 20 22. Chawla-Sarkar M, y col. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis.* 2003; 8(3):237-249
23. Kirkwood J. Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin Oncol.* 2002; 29(3 Suppl 7):18-26
- 25 24. Hofmann V, y col. Hairy cell leukemia: an interferon deficient disease? *Cancer Treat Rev.* 1985; Suppl B: 33-37
25. Stone RM, y col. Recombinant human gamma interferon administered by continuous intravenous infusion in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Oncol.* 1993; 16(2):159-163
- 30 26. Talpaz M, y col. Human leukocyte interferon to control thrombocytosis in chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med.* 1983; 99(6):789-792
27. Talpaz M, y col. Changes in granulocyte-monocyte colony-forming cells among leukocyte-interferon-treated chronic myelogenous leukemia patients. *Exp Hematol.* 1986; 14(7):668-671
- 35 28. Strander H, y col. Long-term adjuvant interferon treatment of human osteosarcoma. A pilot study. *Acta Oncol.* 1995; 34(6):877-880
29. Dogan B, y col. Intralesional alfa-2a interferon therapy for basal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 1995; 91(2):215-219
- 40 30. Fetell MR, y col. Intratumor administration of beta-interferon in recurrent malignant gliomas. A phase 1 clinical and laboratory study. *Cancer.* 1990; 65(1):78-83
31. Muss HB. The use of interferon in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 1991; 27 (Suppl 4):S84-87
- 45 32. Peest D, y col. Cytokine therapy in multiple myeloma. *Br. J Haematol.* 1996; 94(3):425-432
33. Ikic D, y col. Local interferon therapy for melanoma patients. *Int. J Dermatol.* 1995;
- 50 34(12):872-874 34. Rybak ME, y col. Interferon therapy of relapsed and refractory Hodgkin's disease: Cancer and Leukemia Group B Study 8652. *J Biol. Response Mod.* 1990; 9(1):1-4
35. Kaufmann R, y col. Temozolomide in combination with interferon-alpha versus temozolomide alone in patients with advanced metastatic melanoma: a randomized, phase III, multicenter study from the Dermatologic Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2005; 23(35):9001-9007
- 55 36. Lane HC. The role of alpha-interferon in patients with human immunodeficiency virus infection. *Semin Oncol.* 1991; 18 (Suppl 7):46-52
37. Woo MH y Brunakis TG. Interferon alfa in the treatment of chronic viral hepatitis B and C. *Ann. Pharmacother.* 1997; 31(3):330-337
- 60 38. Gibas AL. Use of interferon in the treatment of chronic viral hepatitis. *Gastroenterologist.* 1993; 1(2):129-142
39. Levine LA, y col. Treatment of subclinical intraurethral human papilloma virus infection with interferon alfa-2b. *Urology.* 1996; 47(4):553-557
- 65

40. Ho M. Interferon for the treatment of infections. *Annu Rev Med.* 1987; 38:51-59
41. Wintergerst U y Belohradsky BH. Acyclovir monotherapy versus acyclovir plus beta-interferon in focal viral encephalitis in children. *Infection.* 1992; 20(4):207-212
- 5 42. Bogdan C, y col. The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol Rev.* 2004; 202:33-48
43. Condos R, y col. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet.* 1997; 349(9064):1513-1515
- 10 44. Giosue S, y col. Aerosolized interferon-alpha treatment in patients with multi-drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw.* 2000; 11(1):99-104
45. Raad I, y col. Use of adjunctive treatment with interferon-gamma in an immunocompromised patient who had refractory multidrug-resistant tuberculosis of the brain. *Clin Infect Dis.* 1996; 22:572-574
- 15 46. Fernandez O, y col. Treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis with natural interferon beta: a multicenter, randomized clinical trial. *Mult. Scler.* 1995; Suppl 1:S67-69;
47. Freedman MS, y col. Randomized study of once-weekly interferon beta-1a therapy in relapsing multiple sclerosis: three-year data from the OWIMS study. *Mult Scler.* 2005; 11(1):41-45
- 20 48. Shiozawa S, y col. Single-blinded controlled trial of low-dose oral IFN-alpha for the treatment of xerostomia in patients with Sjogren's syndrome. *J Interferon Cytokine Res.* 1998; 18(4):255-262
- 25 49. Wandinger KP, y col. Diminished production of type-1 interferons and interleukin-2 in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1997; 149(1):87-93
50. Steegmann JL, y col. Interferon alpha for chronic myeloid leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23(5):483-488
- 30 51. Kirkwood JM, y col. High dose Interferon alfa 2b significantly prolongs relapse free survival compared with GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-111 melanoma: Results of Intergroup Trial E1694/S9512/C509081. *J Clin Oncol* 2001; 19:2370-2380
- 35 52. Bonnem EM. alpha Interferon: the potential drug of adjuvant therapy: past achievements and future challenges. *Eur J Cancer.* 1991; 27 Suppl 4:S2-6
- 40 53. Folkman J. Successful treatment of an angiogenic disease. *N Engl J Med.* 1989; 320:1211-1212
54. Clifford JL, y col. Retinoids and interferons as antiangiogenic cancer drugs. In: Teicher BA, ed. *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy.* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 1999; 355-370
- 45 55. Kaban LB, y col. Antiangiogenic therapy of a recurrent giant cell tumor of the mandible with interferon alfa-2a. *Pediatrics.* 1999; 103:1145-1149
56. Sleijfer S, y col. Side effects of interferon-alpha therapy. *Pharm World Sci.* 2005; 27(6):423-431
- 50 57. Bell L. y col. Structure and properties of modified Interferons. Patente de los Estados Unidos N°: 4914033. April 3, 1990
58. Meyer F. y col. Hybrid Interferons. Patente de los Estados Unidos N°: 5071761. 10 de diciembre de 1991
59. Streuli M, y col. Target cell specificity of two species derived from them. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78(5): 2848-2852
- 55 60. Zoon K. y col. interferon alpha hybrids. Patente de los Estados Unidos N°: 6685933. 3 de febrero de 2004
61. Gangemi JD. Antiviral combination, and method of treatment. Patente de los Estados Unidos N°: 5137720 11 de agosto de 1992
- 60 62. Johnson HM. y col. Hybrid interferon tau/type) I interferon polypeptides Patente de los Estados Unidos N°: 6174996. 16 de enero de 2001
63. Raj, NB, y col. Synthesis, anti-viral activity, and conformational characterization of mouse-human α -interferon hybrids. *J Biol Chem.* 1988; 263(18):8943-8952
- 65 64. Mark DF, y col. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;

- 81(18): 5662-5666
- 5 65. Bentzien J. y col. Recombinant interferon-beta mutants. Patente de los Estados Unidos N°: 651-4729. 4 de febrero de 2003
66. Stemmer WPC. Methods for in vitro recombination. Patente de los Estados Unidos N°: 5605793. 25 de febrero de 1997
67. Chang CC, y col. Evolution of a cytokine using DNA family shuffling. *Nat Biotechnol.* 1999; 17(8):793-797
- 10 68. Blatt LM, y col. The biologic activity and molecular characterization of a novel synthetic interferon-alpha species, consensus interferon. *J interferon cytokine Res.* 1996; 16:489-499
69. Tatusova TA y Madden TL. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 174(2): 247-250
- 15 70. Bowie JU, y col. Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino acid Substitutions. *Science* 1990; 247(4948):1306-1310
71. Creighton TE. Posttranslational covalent modification of polypeptide chains. In *Proteins: Structure and Molecular Properties*. Ed by Creighton TE. W. H. Freeman & Co. 1993; páginas 78-99. San Francisco, EE.UU.
- 20 72. Aplin JD y Wriston JC Jr. Preparation, properties, and applications of carbohydrate conjugates of proteins and lipids. *CRC Crit Rev Biochem.* 1981; 10(4):259-306
73. Edge AS, y col. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal Biochem.* 1981; 118(1):131-137
- 25 74. Thotakura NP y Bohl OP. Enzymatic deglycosylation of glycoproteins. *Meth Enzymol.* 1987; 138:350-359
75. Peck GE, y col. Pharmaceutical manufacturing. In *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st ed. Edited by University of the Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams y Wilkins. 2006, página: 691-1094. PA, EE.UU.
- 30 76. Shimizu K. y col. Plasminogen activator derivatives Patente de los Estados Unidos N°: 4640835. 3 de febrero de 1987
77. Mitra G. Covalently attached complex of alpha-1-proteinase inhibitor with a water soluble polymer. Patente de los Estados Unidos N°: 4496689. 29 de enero de 1985
- 35 78. Nakagawa Y. y col. Chemically modified protein with polyethyleneglycol Patente de los Estados Unidos N°: 4791192. 13 de diciembre de 1988
79. Davis F. y col. Non-immunogenic polypeptides Patente de los Estados Unidos N°: 41799337. 18 de diciembre de 1979
- 40 80. Field J, y col. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol.* 1988; 8(5):215921-2165
- 45 81. Evan GI, y col. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol.* 1985; 5(12):3610-3616
82. Paborsky LR, y col. Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen. *Protein Eng.* 1990; 3(6):547-553
- 50 83. Einhauer A y Jungbauer A. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods.* 2001; 49(1-3):455-465
84. Skinner H, y col. Use of the Glu-Glu-Phe C-terminal epitope for rapid purification of the catalytic domain of normal and mutant ras GTPase-activating proteins. *J Biol Chem.* 1991; 266(22):14163-14166
- 55

85. Lutz-Freyermuth C, y col. Quantitative determination that one of two potential RNA-binding domains of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein complex binds with high affinity to stem-loop II of U1 RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(16):6393-6397
- 5 86. Zhang ZQ, y col. Construction and application of a high level expression vector containing PRPL promoter. *Chinese J of Virol*. 1990; 2:18-23
87. Kingston RE, y col. Introduction of DNA into mammalian cells. In *Current Protocols In Molecular Biology* edited by Ausubel FM, y col. 2003; página: 9.0.1-9.15.20, Jhn Wiley & Sons, Inc. EE.UU.
- 10 88. McNeill TA. Interferon assay. *J Immunol Methods*. 1981; 46(2):121-127
89. Rubinstein S, y col. Convenient assay for interferon. 1. *Viral*. 1981; 37: 755-758
- 15 90. Horisberger MA y de Staritzky K. A recombinant human interferon- α B/D hybrid with a broad hostrange. *J Gen Virol*. 1987; 68:945-948
91. Stitz L y Schellekens H. Influence of input multiplicity of infection on the anti-viral activity of interferon. *J Gen Virol*. 1980; 46:205-210
- 20 92. Yeo EY, y col. Effect of short-term ethanol on the proliferative response of Swiss 3T3 cells to mitogenic growth factors, *Exp Mol Med*. 2000; 32: 161-169
93. Vignesh RC, y col. Effect of ethanol on human osteosarcoma cell proliferation, differentiation and mineralization. *Toxicology*. 2006; 220(1):63-70
- 25 94. Cavanaugh PF Jr, y col. A semi-automated neutral red based chemosensitivity assay for drug screening. *Investigational New Drugs*. 1990; 8(4):347-354
- 30 95. Raines EW y Ross R. Purification of human platelet-derived growth factor. *Methods Enzymol*. 1985; 109:749-773
96. Wahl AF, y col. Gene expression of human DNA polymerase alpha during cell proliferation and the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 1988; 8(11):5016-5025
- 35 97. Cook JA y Mitchel JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem*. 1989; 179(1):1-7
98. Porstmann T, y col. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods*. 1985; 82(1):169-179
- 40 99. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2):55-63
100. Scudiero DA, y col. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988; 48(17):4827-4833
- 45 101. Evinger M y Pestka S. Assay of growth inhibition in lymphoblastoid cell cultures. *Methods Enzymol*. 1981; 79(Pt B):362-368
102. Meister A, y col. Biological activities and receptor binding of two human recombinant interferons and their hybrids. *J Gen Virol*. 1986; 67(Pt 8):1633-43
- 50 103. Frincke J, y col. Interferon antibody compositions having an extended serum half-life. Patente de los Estados Unidos N°: 5055289. 8 de octubre de 1991
104. Chang T y Yu L. Hybrid with interferon-beta. and an immunoglobulin Fc joined by a peptide linker. Patente de los Estados Unidos N°: 5908626. 1 de junio de 1999
- 55 105. Nieforth KA, y col. Use of an indirect pharmacodynamic stimulation model of MX protein induction to compare in vivo activity of interferon alfa-2a and a polyethylene glycol-modified derivative in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 1996; 59(6):636-646
- 60 106. Ekwuribe NN. Conjugation-stabilized therapeutic agent compositions, deliven and diagnostic formulations comprising same. and method of making and using the same. Patente de los Estados Unidos N°: 5681811. 28 de octubre de 1997

107. Gilbert CW y Cho M-O. Interferon polymer conjugates. Patente de los Estados Unidos N°: 5711944. 27 de enero de 1998
- 5 108. Greenwald R y Gilbert CW. Interferon polymer conjugates and process for preparing the same. Patente de los Estados Unidos N°: 5738846. 14 de abril de 1998
109. Letsinger RL, y col. Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86(17): 6553-6556
- 10 110. Brower V. Naked DNA vaccines come of age. Nat Biotechnol. 1998; 16(13):1304-1305
111. Coen DM. The polymerase chain reaction. In Current Protocols in Molecular Biology. Edited by Ausubel FM. 2001, página: 15.01-15.7.8. Jhn Wiley & Sons, Inc. EE.UU.
- 15 112. Stemmer WP. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(22): 10747-10751
113. Annstrong JA. Cytopathic effect inhibition assay for interferon: microculture plate assay. Methods Enzymol. 1981; 78(pt A): 381-387
- 20 114. Sambrook J y Russell DW. in Molecular Cloning. 2001; página: 15.25-15.35, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.
115. Sambrook J y Russell DW. in Molecular Cloning. 2001; página: 15.51-15.52, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.
- 25 116. Sambrook J y Russell DW. in Molecular Cloning. 2001; página: 15.25-15.29 y 15-49-15-53, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.
117. Chou TC, y col. Reversal of anticancer multidrug resistance by the ardeemins. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(14): 8369-8374
- 30 118. Corbell T, y col. in vivo methods for screening and preclinical testing: use of rodent solid tumors for drug discovery. in Anticancer Drug Development Guide: preclinical screening, clinical trails, and approval. Edited by Teicher BA and Andrews PA. 2004; página: 79-124. Humana Press, New Jersey, US
- 35

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> Novagenetics Inc.
- <120> PROTEÍNAS DE TIPO INTERFERÓN HUMANO RECOMBINANTES
- 45 <130> N240 0005/TWB
- <160> 17
- <170> PatentIn versión 3.4
- 50 <210> 1
<211> 498
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada
- <400> 1

ES 2 586 398 T3

tgtaatctgt ctcaaaccca cagcctgggt agcaagagga ccttgatgct cctggcgag 60
atggggaaaa tctccctttt ctctgcctg aaggacagac atgactttga atttcccag 120
gaggaatttg atggcaacca gttccagaaa gctcaagcca tctctgtcct ccatgagctg 180
atccagcaga ccttcaatct cttcagcaca aaggaatcat ctgctgcttg ggatgagggc 240
ctcctagaca aattccgcac cgaactctac cggcagctaa atgacttggga agcctgtatg 300
atgcaggagg ttggggtgga agagactccc ctgatgaatg cggactccat cctggctgtg 360
aagaaatact tccaaagaat cactctttat ctgatggaga agaaatacag cccttgtgcc 420
tgggaggttg tcagagtaga aatcatgaga tccctctctt tttcaacaaa cttgcaaaaa 480
agattaaggg ggaaggat 498

5 <210> 2
<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos químicamente sintetizada

<400> 2

Cys Asn Leu Ser Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Lys Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Arg Gly Lys Asp
165

5 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada

<400> 3
 tggtgctcag ctrcaagtc 19

15 <210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada

<400>4

ES 2 586 398 T3

	aatcattcc atgttgracc ag	22
5	<210> 5 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
	<400> 5 aatcattcc cgggtgtacc ag	22
15	<210> 6 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
	<400> 6 aatcattcc atgttgaacc ag	22
25	<210> 7 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
	<400> 7 aatcattca agatgagccc ag	22
35	<210> 8 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial.	
40	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
	<400> 8 aatgatttc atgttgaacc ag	22
45	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
	<400> 9 aatcattss atgttgaacc ag	22
55	<210> 10 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
	<400> 10 gatcattcc atgttgaatg ag	22
65		

ES 2 586 398 T3

5	<210> 11 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
10	<400> 11 gagtcgtttc tgtgttgat cag	23
	<210> 12 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
20	<400> 12 atgccctgt cctttctt ac	22
	<210> 13 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
30	<400> 13 agggcagcat tcaaagcag	19
	<210> 14 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
40	<400> 14 tcagaccgct tctgcgttct g	21
	<210> 15 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
50	<400> 15 gaaggcttg ggggtgtg	19
	<210> 16 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
60	<400> 16 aatcttctct catccgc	17

ES 2 586 398 T3

	<210> 17	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia nucleotídica químicamente sintetizada	
10	<400> 17	
	accatgaagg tgacgctc	18

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido aislado que codifica para una proteína que tiene actividades biológicas de tipo interferón humano, seleccionándose dicho polinucleótido del grupo que consiste en polinucleótidos que comprenden cada uno una secuencia nucleotídica al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.
- 10 2. Una proteína que muestra actividades biológicas de tipo interferón humano, seleccionándose dicha proteína del grupo que consiste en proteínas que comprenden cada una una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. Una proteína que comprende una secuencia que difiere en 0 a 16 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, mostrando dicha proteína actividades biológicas de tipo interferón humano.
- 20 4. Una proteína que muestra actividades biológicas de tipo interferón humano, teniendo dicha proteína una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 y teniendo dicha proteína actividades anti-virales y anti-proliferativas aumentadas en comparación con HulfN- α 2b.
- 25 5. El polinucleótido tal como se define en la reivindicación 1, en el que dicha secuencia es al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.
- 30 6. El polinucleótido tal como se define en la reivindicación 1 o la proteína que se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, teniendo dicha proteína actividades anti-virales y anti-proliferativas aumentadas en comparación con interferón alfa 2b humano (HulfN- α 2b), teniendo preferiblemente la proteína una actividad antiviral al menos 2 veces mayor que HulfN- α 2b, o una actividad anti-proliferativa al menos 10 veces mayor que HulfN- α 2b.
- 35 7. La proteína tal como se define en la reivindicación 2, en la que dicha secuencia es al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.
- 40 8. Un polipéptido que comprende un fragmento de la proteína tal como se define en la reivindicación 2, en el que dicho fragmento muestra dichas actividades biológicas de tipo interferón humano.
- 45 9. Un constructo de proteína que comprende la proteína tal como se define en la reivindicación 2 acoplada a otro resto, mostrando dicho constructo dichas actividades biológicas de tipo interferón humano, y en el que preferiblemente:
- 50 (1) dicha proteína está glicosilada;
- (2) dicho resto es un polipéptido;
- (3) dicho resto es un no-polipéptido tal como una molécula de polímero, por ejemplo, un polietilenglicol lineal o ramificado; o
- (4) dicho resto es una molécula de marcaje.
- 55 10. Una composición que comprende la proteína tal como se define en la reivindicación 2 y un vehículo, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
11. La proteína tal como se define en la reivindicación 2, para su uso como agente anti-viral, agente anti-proliferativo, agente anti-cancerígeno o agente de inmunomodulación.
12. Uso de la proteína tal como se define en la reivindicación 2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, una enfermedad viral o una afección que responde a terapia con interferón.
13. Una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma que muestra actividades biológicas de tipo interferón humano.
14. Un polinucleótido que codifica para la proteína de las reivindicaciones 2, 4 o 13.

A

SEQ ID NO:1

TGTAATCTGTCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAAGAGGACCTTGATGCTCCTGGCGCAGATGGGGAAAATC
 TCCCTTTCTCCTGCCTGAAGGACAGACATGACTTGAATTTCCCAGGAGGAATTTGATGGCAACCACTTC
 CAGAAAGCTCAAGCCATCTCTGTCTCCATGAGCTGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGAA
 TCATCTGCTGCTTGGGATGAGGGCCTCCTAGACAAATTCGCACCGAACTCTACCGGCAGCTAAATGACTTG
 GAAGCCTGTATGATGCAGGAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCCTGATGAATGCCGACTCCATCCTGGCTGTG
 AAGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTTTATCTGATGGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTC
 AGAGTAGAAATCATGAGATCCCTCTCTTTTCAACAAACTTGCAAAAAAGATTAAGGGGGAAGGAT

B

SEQ ID NO:2

CNLSQTHSLGSKRTLMLLAQMGKISLFSCLKDRHDFEFPQEEFDGNQFQKA
 QAIISVLHELIQOTFNLFSKESAAWDEGLLDKFRTELYRQLNDLEACMMQ
 EVGVEETPLMNADSIKAVKQYFQRITLYLMEKKYSPCAWEVVRVEIMRSL
 FSTNLQKRLRGKD

C

Proteína de ADN	1	TGTAATCTGTCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAAGAGGACCTTGATGCTC
	1	C N L S Q T H S L G S K R T L M L
Proteína de ADN	52	CTGGCGCAGATGGGGAAAATCTCCCTTTTCTCCTGCCTGAAGGACAGACAT
	18	L A Q M G K I S L F S C L K D R H
Proteína de ADN	103	GACTTTGAATTTCCCAGGAGGAATTTGATGGCAACCACTTCCAGAAAGCT
	35	D F E F P Q E E F D G N Q F Q K A
Proteína de ADN	154	CAAGCCATCTCTGTCTCCATGAGCTGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTCTC
	52	Q A I S V L H E L I Q Q T F N L F
Proteína de ADN	205	AGCACAAAGGAATCATCTGCTGCTTGGGATGAGGGCCTCCTAGACAAATTC
	69	S T K E S S A A W D E G L L D K F
Proteína de ADN	256	CGCACCGAACTCTACCGGCAGCTAAATGACTTGGAGCCTGTATGATGCAG
	86	R T E L Y R Q L N D L E A C M M Q
Proteína de ADN	307	GAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCCTGATGAATGCCGACTCCATCCTGGCT
	103	E V G V E E T P L M N A D S I L A
Proteína de ADN	358	GTGAAGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTTTATCTGATGGAGAAGAAATAC
	120	V K K Y F Q R I T L Y L M E K K Y
Proteína de ADN	409	AGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTCAGAGTAGAAATCATGAGATCCCTCTCT
	137	S P C A W E V V R V E I M R S L S
Proteína de ADN	460	TTTTCAACAAACTTGCAAAAAAGATTAAGGGGGAAGGAT
	154	F S T N L Q K R L R G K D

Fig. 1

A

Novaferon	1	TGTAATCTGTCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAAGAGGACCTTGATGCTCCTGGCGCAG
IFN α 14	126	TGTAATCTGTCTCAAACCCACAGCCTGAATAACAGGAGGACTTTGATGCTCATGGCACAA
Novaferon	61	ATGGGGAAAATCTCCCTTTTCTCCTGCCTGAAGGACAGACATGACTTTGAATTTCCCCAG
IFN α 14	186	ATGAGGAGAAATCTCTCCTTTCTCCTGCCTGAAGGACAGACATGACTTTGAATTTCCCCAG
Novaferon	121	GAGGAATTTGATGGCAACCAGTTCCAGAAAGCTCAAGCCATCTCTGTCTCCTCCATGAGCTG
IFN α 14	246	GAGGAATTTGATGGCAACCAGTTCCAGAAAGCTCAAGCCATCTCTGTCTCCTCCATGAGATG
Novaferon	181	ATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGAATCATCTGCTGCTTGGGATGAGGGC
IFN α 14	306	ATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGAATCATCTGCTGCTTGGGATGAGACC
Novaferon	341	CTCCTAGACAAAATTCGACCCGAACCTTACCAGGAGCTAAATGACTTGAAGCCTGTATG
IFN α 14	366	CTCCTAGACAAAATTCACATTGAACCTTTCCAGCAAATGAATGACTTGAAGCCTGTGTG
Novaferon	301	ATGCAGGAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCCTGATGAATGCGGACTCCATCCTGGCTGTG
IFN α 14	426	ATGCAGGAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCCTGATGAATGAGGACTCCATCCTGGCTGTG
Novaferon	361	AAGAAATACTTCAAAGAATCACTCTTTATCTGATGGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCC
IFN α 14	486	AAGAAATACTTCAAAGAATCACTCTTTATCTGATGGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCC
Novaferon	421	TGGGAGGTTGTCAGAGTAGAAATCATGAGATCCCTCTCTTTTCAACAAACTTGCAAAAA
IFN α 14	546	TGGGAGGTTGTCAGAGTAGAAATCATGAGATCCCTCTCTTTTCAACAAACTTGCAAAAA
Novaferon	481	AGATTAAGGGGAAGGAT 498
IFN α 14	606	AGATTAAGGAGGAAGGAT 623

B

Novaferon	1	CNLSQTHSLGSKRTLMLLAQMGIKISLFSCLKDRHDFEFPQEEFDGNQFOK
IFN α 14	24NNR.....M...RR..P.....
Novaferon	51	AQAISVLHELIIQOTFNLFPSTKESSAAWDEGLLDKFRTELYRQLNDLEACM
IFN α 14	73MM.....N.....T..E..YI..FQ.M.....V
Novaferon	101	MQEVGVEETPLMNADSIKAVKQYQIRITLYLMEKKYSPCAWEVVRVEIMR
IFN α 14	123	I.....E.....A.....
Novaferon	151	SLSFSTNLQKRLRGK 166
IFN α 14	173R.. 189

Fig. 2

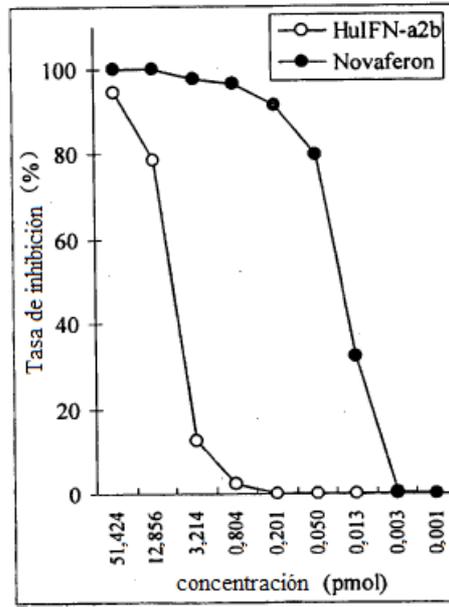


Fig. 4

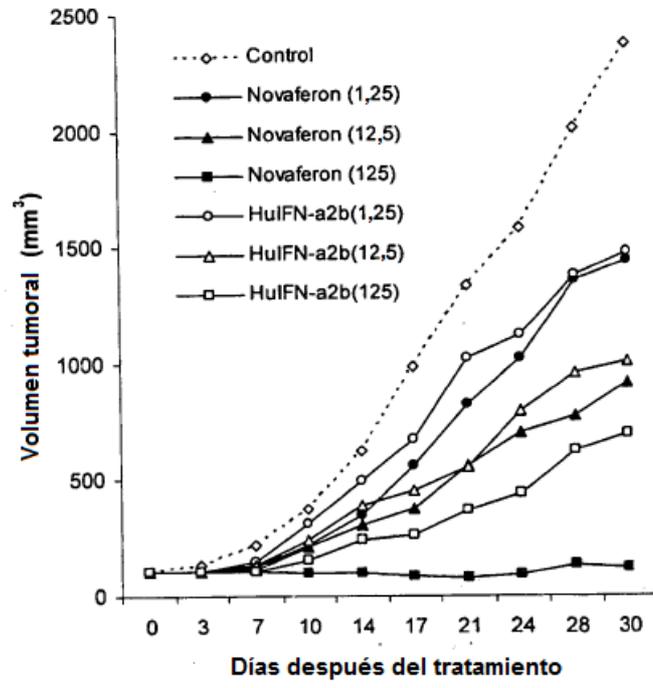


Fig. 5

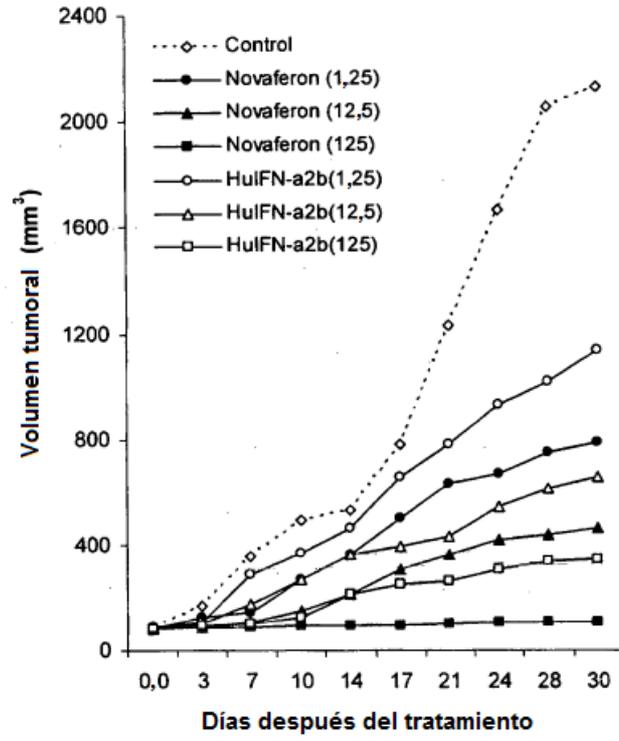


Fig. 6

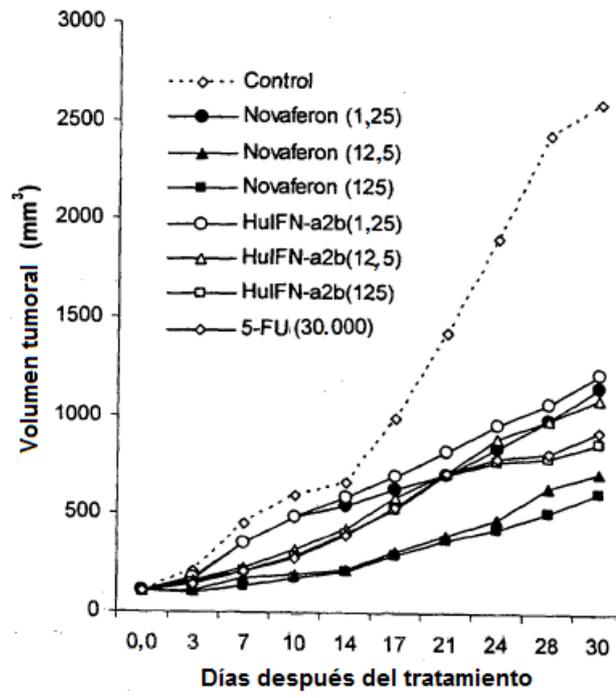


Fig. 7

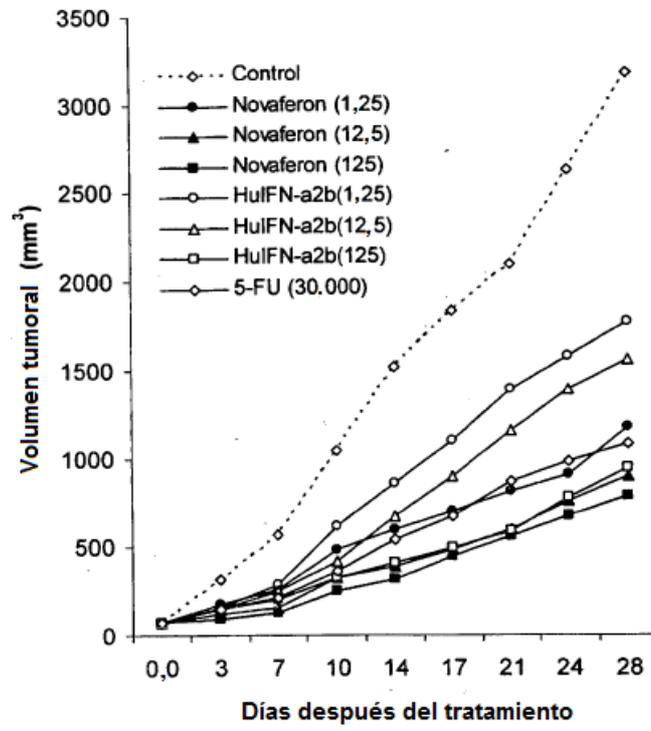


Fig. 8

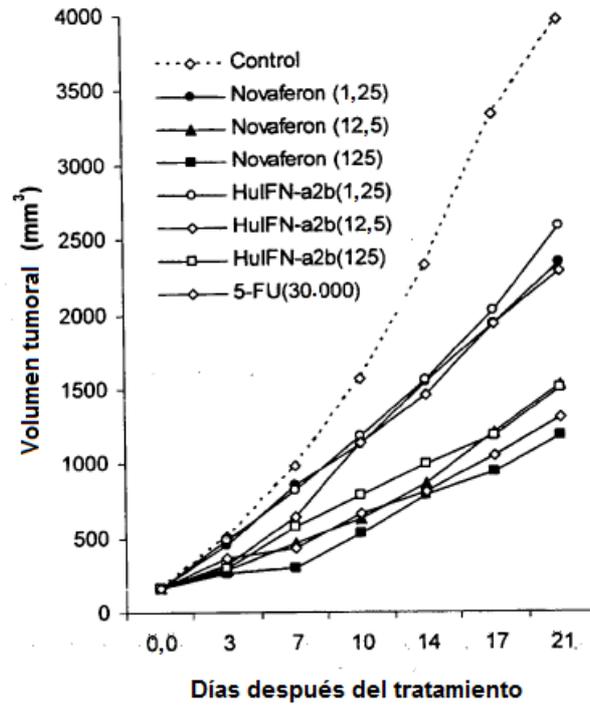


Fig. 9