

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 788**

51 Int. Cl.:

C07K 14/555 (2006.01)

C07K 14/56 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2014 PCT/IB2014/065004**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15056125**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2014 E 14796268 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 3057982**

54 Título: **Proteínas fusionadas de interferón alfa 5 con otra citocina y un proceso de producción de las mismas**

30 Prioridad:

15.10.2013 LT 2013118

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2018

73 Titular/es:

**UAB BIOTECHNOLOGINES FARMACIJOS
CENTRAS "BIOTECHPHARMA" (100.0%)
Mokslininku g. 4
08412 Vilnius, LT**

72 Inventor/es:

**BUMELIS, VLADAS ALGIRDAS y
SUDZIUVIENE, SAULE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 657 788 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 fusionadas de interferón alfa 5 con otra citocina y un proceso de producción de las mismas

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una proteína quimérica inmunomoduladora útil como agente antiviral y antitumoral. Preferentemente, la presente invención se refiere a un gen que codifica interferón alfa humano, fusionado con el mismo u otro interferón alfa (preferentemente interferón alfa 2b humano) o citocina (preferentemente la proteína oncostatina M madura nativa humana). La fusión quimérica puede incluir IFNa5 como miembro de extremo N o extremo C de la construcción. La presente invención también se refiere a insertar dicho gen quimérico en un hospedador adecuado; producir el cultivo de cepa recombinante y estimular la expresión del polipéptido heterólogo y su acumulación en cuerpos de inclusión insolubles. La invención también proporciona un método para el proceso de fermentación para la producción de la proteína fusionada anteriormente mencionada junto con un proceso de purificación de proteínas adecuado para las mismas. Particularmente, la presente invención se refiere a la preparación de proteína fusionada usando un gen correspondiente insertado en una cepa de *Escherichia coli* recombinante, proporcionando así la forma madura metionilada en N de proteína. La invención también se refiere a un proceso de aislamiento y purificación de dicha proteína a partir de la fracción insoluble de cepa bacteriana durante la solubilización, oxidación y sometimiento del material a cromatografía.

La preparación de proteína recuperada se formula para estabilidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los interferones, como participantes prominentes en la mayor parte de los tratamientos para enfermedades de cáncer y hepatitis, son proteínas importantes en el mercado farmacéutico. Estas citocinas tienen actividades antivirales, antitumorales e inmunomoduladoras y se expresan ampliamente durante diversos procesos inmunogénicos. IFNa2b y IFNa5 son interferones alfa que se unen al mismo complejo de receptor IFNAR1/2 con diferentes afinidades y pueden complementarse entre sí, por ejemplo, en el tratamiento de la hepatitis C. El uso de OSM en tumores malignos está comúnmente asociado a infecciones neutropénicas durante la terapia, tales como cáncer de mama, linfoma y leucemia.

Los interferones tienen actividades antivirales, antitumorales e inmunomoduladoras, además del efecto sobre el crecimiento celular y la diferenciación con actividad cruzada en funciones hormonales (epinefrina, adrenocorticotropina) (Dummer, R.; Mongana, J. 2009. Long term pegylated interferon- α and its potential in the treatment of melanoma. *Biologics: targets & therapy* 3: 169 - 182). Actualmente, los interferones pueden considerarse como un grupo importante de productos biofarmacéuticos en diversos tratamientos de enfermedades autoinmunitarias y cancerosas, además de preparados que estimulan la respuesta inmunitaria a patógenos virales. Preparaciones recombinantes de interferones están registradas en el mercado para su uso en el tratamiento de varias variedades de cáncer (interferones alfa, además de mezcla natural de interferones del plasma), hepatitis B y C (interferones alfa), esclerosis múltiple (interferón beta), artritis reumatoide (interferones gamma) y como adyuvantes o co-adyuvantes en vacunas profilácticas (Crommelin, D. J. A.; Sindelar, R. D. 1997. *Pharmaceutical biotechnology*. Harwood academic publishers. 369 p. ISBN 90-5702-249-4; Wang, H., et al. 2010. Recombinant human interferon-like proteins. Patente de EE.UU. N.º: 20100099612. Wang, W., et al. 2008. Effects of high-dose IFNa2b on regional lymph node metastases of human melanoma: modulation of STAT5, FOXP3, and IL-7. *Clinical cancer research* 14: 8314 - 8320). También se ha usado interferón alfa para el tratamiento de leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA, leucemia miélógena crónica y carcinoma de células renales.

Con sus actividades antivirales y antitumorales, acompañado de su influencia sobre las reacciones de inmunidad no específicas innatas, la mayoría de las terapias medicinales usan interferones alfa como proteínas recombinantes o mezclas naturales secretadas por cultivos celulares de linfocitos humanos infectados.

Muchas patentes describen diversas preparaciones de interferón recombinante en varios organismos hospedadores (documentos WO2004039996; WO 2007022799; WO 2011109556, etc.).

Sin embargo, estas preparaciones de proteína son principalmente de vida corta en el organismo, produciendo dosis de alta concentración en los usos terapéuticos, seguido de fuertes efectos secundarios adversos (Crommelin, D. J. A.; Sindelar, R. D. 1997. *Pharmaceutical biotechnology*. Harwood academic publishers. 369 p. ISBN 90-5702-249-4). Con el fin de reducir estos efectos, se construyen análogos quiméricos de interferones con niveles de toxicidad más bajos y términos de semivida más larga en plasma; así, la concentración de dosis puede ser reducida (documento WO2007002233).

Para mejorar la farmacocinética de los interferones y disminuir la frecuencia de dosificación, se han desarrollado varias estrategias estabilizantes, tales como la asociación con especies químicas tales como 2-sulfo-9-fluorenilmetoxycarbonilo, proteína de fusión recombinante de acción prolongada de albúmina humana, u otros enfoques tales como unir la proteína a estructuras más grandes tales como polietilenglicol.

El interferón alfa 2b es uno de los subtipos más ampliamente investigados de la familia anteriormente mencionada, dedicado a los tratamientos de diferentes variedades de cáncer y casos de hepatitis B y C (Crommelin, D. J. A.; Sindelar, R. D. 1997. Pharmaceutical biotechnology. Harwood academic publishers. 369 p. ISBN 90-5702-249-4). Se ha mostrado (documento WO9958143) que la proteína interferón alfa 5 tiene un gran potencial terapéutico en el caso de la hepatitis C debido a niveles reducidos de esta proteína durante esta infección.

Se conoce como construir diferentes análogos recombinantes de estas proteínas - fusiones con albúmina de suero humano, diversos fragmentos de interferón alfa o segmentos de receptor de Fc de Ig (documento WO0069913), fragmentos de combinación de polipéptido y polinucleótido para terapias y diagnósticos (documento WO03000896). Se ha arrojado mucha investigación en terapias de combinación de IFNa2b y IFNa5 - aunque queda por aclarar si la terapia de ambas proteínas produce o no mayor eficacia de la preparación.

La mayoría de los interferones, entre ellos IFNa2b y IFNa5 anteriormente mencionados, se expresan en sistemas bacterianos recombinantes debido a su alta productividad y naturaleza no glucosilada de proteínas (Loignon, M., et al. 2008. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells. BMC Biotechnology 8:65).

Tanto IFNa2b como IFNa5 se unen al mismo complejo de receptor IFNAR1/2, aunque lanzan cascadas ligeramente diferentes (Jaks E, Gavutis M, Uzé G, Martal J, Piehler J: Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. J Mol Biol 2007, 366(2):525-539). Aunque la co-vacunación de citocina para el desarrollo de vacunas virales eficaces ha mostrado potencial prometedor y específicamente ha mejorado la inmunidad proporcionada por las vacunas de ADN viral para el VIH, todavía, la terapia combinatoria para IFNa5 y IFNa6 en ratones transgénicos no ha sido lo suficiente significativa en la puntuación de enfermedad clínica.

Un complejo en una forma de una proteína de fusión, donde un IFN de tipo I está unido a receptor de interferón α/β humano por enlace covalente o conector peptídico, se desvela en el documento EP1037658 (prior. 19.12.1997).

Esta fusión imita una cierta situación metabólica cuando los interferones de tipo I circulan en el organismo unidos con sus receptores solubles. Cuando se alcanza cierta concentración de IFN y su receptor, puede reducir y ralentizar la respuesta inmunitaria debido a la unión competitiva de receptores solubles en plasma sanguíneo. Por tanto, tal proteína de fusión puede presentar tanto respuestas pro- como anti-inflamatorias dependiendo del paciente y la evolución de la enfermedad. El documento EP2412730 (prior. 27.03.2009) desvela una proteína de fusión que comprende proteína interferón-alfa fusionada con un péptido de transducción citoplásmico y comprende además polietilenglicol unido al mismo. Está permitiendo desarrollar medicinas basadas en proteína eficaces para prevenir o tratar diversas enfermedades del hígado, asociadas a infección viral, a bajas dosis.

Desde la introducción de tecnologías de PEGilación en la preparación de principios activos, esto llegó a ser una de las estrategias más importantes cuando se prolonga la actividad farmacocinética. Sin embargo, la PEGilación inhibe fuertemente la captación celular y el escape endosómico, que produce una pérdida significativa de actividad del sistema de administración. Los grandes grupos de PEG aumentan el volumen hidrodinámico de la molécula de forma que sea menos probable que sean eliminados por el riñón debido a los bajos niveles de permeabilidad a través de la membrana basal renal. Estas dos características de proteína pegilada pueden ser perjudiciales en ensayos clínicos a largo plazo, aún cuando tengan un modo de acción prolongado y de dosis baja.

Se conoce una proteína de fusión que tiene la actividad biológica de interferón-alfa y que es capaz de concentrar interferón-alfa en el hígado de la patente EP1187852 (prior. 19.05.1999). Tal proteína de fusión comprende en la dirección de extremo N a C una región Fc de inmunoglobulina que deriva de IgG1 o IgG3 y una proteína diana que comprende interferón-alfa, donde la región Fc y la proteína diana están unidas juntas directamente o por medio de conector polipeptídico. La proteína fusionada se usa para el tratamiento de enfermedades del hígado, especialmente hepatitis. La proteína de fusión anteriormente mencionada tiene dos desventajas principales. Dicha proteína de fusión se dirige al hígado y se usa solo para el tratamiento de hepatitis B y C. La incorporación de las regiones Fc de inmunoglobulina anteriormente mencionadas puede conducir a la formación de anticuerpos neutralizantes en terapias prolongadas, produciendo efecto terapéutico más bajo y resistencia del paciente a tratamiento largo. Sin embargo, esta proteína fusionada de la patente es más versátil - cuando IFN alfa 5 está fusionada con interferón alfa2b, puede ser dirigida para el tratamiento de melanoma recurrente. Fusiones de alfa 2b (tanto IFNa5-IFNa2b como IFNa2b-IFNa5) pueden ser dirigidas a la modulación de inmunidad y diversos tratamientos de cáncer (melanomas, linfomas y sarcomas), además de virus tales como coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio, o afecciones de la piel como lesiones de la piel/mucosa producidas por infecciones por VPH. Cuando se fusiona con la citocina OSM, esta proteína puede ser dirigida al tratamiento de hepatitis C crónica, cuando la terapia de IFNa5 individual fracasa. En general, las proteínas de fusión de los presentes inventores no eligen como diana un órgano humano particular, presentan características de terapia de combinación y pueden ser dirigidas para tratar una amplia variedad de enfermedades virales y de cáncer.

Es evidente de lo anterior que la necesidad de tener una velocidad de eliminación del plasma más lenta, que conduzca así a dosis más bajas y efectos secundarios reducidos, es un problema real y actual en la materia. Así, la creación de una proteína fusionada hecha de dos interferones de longitud completa permitiría probar esta proteína química para su actividad antiviral y velocidad de eliminación.

Otro problema técnico grave está relacionado con las dificultades en el aislamiento y especialmente en la purificación de tales proteínas fusionadas nuevas. Para vencer tal problema, debería inventarse el sistema sostenible del proceso completo para la eficaz obtención de producto diana y preservación cuando fuera posible del tipo de actividad de los componentes de fusión.

5 Definiciones

Por claridad, el significado de algunos términos y expresiones como se usan en el contexto de la presente invención se proporciona por este documento.

Como se usa en lo sucesivo, el término "interferón alfa 5" (o IFNa5) se refiere a una proteína producida por leucocitos que aparentemente participa principalmente en la respuesta inmunitaria innata contra infección viral, capaz de unirse a un complejo de receptor específico de la superficie celular conocido como el receptor de IFNa (IFNAR). IFNa5 incluye proteínas que tienen (i) una secuencia de aminoácidos que es al menos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de una proteína IFNa5 nativa y (ii) una actividad biológica que es común a IFNa5 nativa.

El término "interferón alfa 2b" (IFNa2b) se refiere a uno producido por leucocitos humanos normales, es predominantemente interferón-alfa 2b. El IFNa2b producido por leucocitos es un miembro de la familia de interferón y principalmente participa en la respuesta inmunitaria innata contra una amplia variedad de infecciones virales, tales como hepatitis B y C. Pacientes con melanomas recurrentes reciben IFN- α 2b recombinante, además de para funcionar en un modo inmunomodulador para promover una respuesta del sistema inmunitario innato a patógenos virales que actúan sobre los receptores celulares externos y que estimulan multitud de actividades intracelulares y extracelulares.

El término "oncostatina M" (OSM) se refiere a una proteína producida por linfocitos T activados, monocitos, microglía. Está estructuralmente y funcionalmente relacionada con la subfamilia de citocinas hematopoyéticas y neutróficas conocidas como la familia de citocinas de tipo interleucina 6 (IL6). La señalización de OSM humana está mediada por su unión a dos complejos de receptor: el complejo de receptor de OSM de tipo I (receptor de LIF) que consiste en el transductor de la señal de interleucina 6 (gp130) y subunidades de receptor del factor inhibidor de leucemia (LIFR), y el complejo de OSM de tipo II (receptor de OSM) que consiste en gp130 y subunidades del receptor beta de OSM (OSMR).

Como se usa en el presente documento, el término "proteína quimérica de IFNa5" se refiere a una proteína que se produce por un microorganismo que ha sido transformado con un gen fusionado, que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos, que es al menos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de IFNa5 humana nativa como cualquier miembro de extremo N o extremo C.

"Secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica" significa que las secuencias son idénticas o se diferencian por uno o más (hasta el 5 %) mutaciones o alteraciones de aminoácidos conservativas (es decir, delecciones, adiciones, sustituciones) que no producen una diferencia funcional adversa entre la proteína recombinante y IFNa5, IFNa2b u OSM humana nativa. El porcentaje de identidad de secuencia puede obtenerse usando el programa BLAST (blast2seq, parámetros por defecto) [Tatutsova y Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250 (1990)].

Como se usa en el presente documento, el término "microorganismo que produce proteína fusionada de IFNa5" se refiere a un microorganismo que ha sido genéticamente manipulado para producir una proteína que posee actividad biológica asociada a IFNa5 humana. Correspondientemente, el término "célula hospedadora de *E. coli* que produce proteína fusionada de IFNa5" se refiere a una célula hospedadora de *E. coli* que ha sido genéticamente manipulada para producir una proteína, que posee la actividad biológica asociada a un IFNa5. Los términos "plásmido", "sistema de vector" o "vector de expresión" significan una construcción capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*. En el contexto de la presente invención, estas construcciones pueden usarse para introducir genes que codifican proteínas diana fusionadas en células hospedadoras.

Preferentemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma de un organismo hospedador adecuado. El término "incorporado" cubre preferentemente la incorporación estable en el genoma. El término "secuencias reguladoras" incluye promotores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión. Una secuencia reguladora "operativamente unida" a una secuencia codificante se liga de tal forma que la expresión de la secuencia codificante se logra en condición compatibles con las secuencias de control.

El término "promotor" se usa en el sentido normal de la materia, por ejemplo un sitio de unión de ARN polimerasa.

El término "célula hospedadora", en relación con la presente invención, incluye cualquier célula que comprende cualquiera de la secuencia de nucleótidos o un vector de expresión como se ha descrito anteriormente y que se usa en la producción recombinante de una proteína diana fusionada que tiene las propiedades específicas como se define en el presente documento o en los métodos de la presente invención.

Por "aislado" y/o "purificado" se indica que la proteína fusionada en IFNa5 está en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente el 90 % de pureza, preferentemente al menos aproximadamente el 95 % de pureza, lo más preferentemente al menos aproximadamente el 98 % de pureza.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

5 Sumario de la invención

El principal objeto de la presente invención es la proteína fusionada, que comprende un interferón alfa 5 (IFNa5) de una fórmula general (I) o (II)



10 en las que el componente de fusión X es otro interferón alfa o citocina.

Más particularmente, la presente invención cubre proteínas fusionadas, en las que IFNa5 es interferón alfa 5 recombinante humano y X está seleccionado del grupo que consiste en IFNa5, INFa2b y oncostatina. Los objetos de la presente invención cubren proteínas tales como:

15 Homodímero IFNa5-IFNa5 con secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o al menos el 95 % de secuencia idéntica;

Heterodímero IFNa2b-IFNa5 con secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o al menos el 95 % de secuencia idéntica;

Heterodímero IFNa5-IFNa2b con secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o al menos el 95 % de secuencia idéntica;

20 Heterodímero IFNa5-OSM con secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 4 o al menos el 95 % de secuencia idéntica;

Heterodímero OSM-IFNa5, que secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 5 o al menos 95 % de secuencia idéntica.

25 En la realización preferida, la proteína fusionada de la presente invención presenta una actividad biológica, característica para IFNa5, junto con velocidad de eliminación prolongada en muestras de suero de rata. El fragmento de ADN, que codifica dicha proteína fusionada, tiene una secuencia codificante, seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o es la secuencia que codifica la misma proteína. Un vector adecuado, que comprende el fragmento de ADN, que codifica la proteína fusionada según la presente invención, está seleccionado del grupo, que consiste en pET21b+, pET28a+, pUC57/T y pT7, preferentemente es pET21b+.

30 Otro aspecto de la presente invención es un proceso de producción de una proteína fusionada de la invención por expresión en una célula hospedadora apropiada, que comprende:

a) proporcionar la célula hospedadora, que produce dicha proteína fusionada de IFNa5;

35 b) cultivar células hospedadoras en condiciones eficaces para expresar dicha proteína fusionada de IFNa5 en un medio de fermentación adecuado;

c) aislar y purificar la proteína fusionada de IFNa5 expresada.

El proceso según invención se caracteriza por que:

- dicho aislamiento es el aislamiento de la mezcla obtenida en la etapa b), que comprende la proteína fusionada diana en una forma de cuerpos de inclusión, sometidos a solubilización y seguido de renaturalización por oxidación; y

40 - dicha purificación es el tratamiento cromatográfico de 3 etapas que comprende:
someter dicha mezcla que comprende proteína fusionada de IFNa5 renaturalizada a una cromatografía de interacción hidrófoba;

seguido de someter la disolución obtenida en la etapa previa a una cromatografía de intercambio aniónico;

45 y además someter la disolución obtenida en la etapa previa a una cromatografía de intercambio catiónico.

Las condiciones efectivas para expresar dicha proteína fusionada de IFN comprenden inducción, preferentemente con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a concentración de 0,1 mM a 1 mM, lo más preferentemente 0,5 mM, y la inducción se desplaza opcionalmente a la etapa de crecimiento temprano.

5 En una de las realizaciones, la célula hospedadora está seleccionada del grupo que consiste en *E. coli*, *S. cerevisiae*, *K. lactis*, preferentemente *E. coli*, más preferentemente cepa deficiente en proteasa de *E. coli*, tal como BL21 y Rosetta gami-2 de *E. coli*, lo más preferentemente BL21 de *E. coli*, y en las que el medio de fermentación adecuado es cualquier medio complejo que contiene extracto de levadura como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono, preferentemente medio M9m.

10 En la otra realización, la etapa de solubilización se realiza en disolución caotrópica y desnaturizante, que comprende urea 6-8 M o clorhidrato de guanidina 4-6 M, preferentemente clorhidrato de guanidina 6 M, opcionalmente con DTT 20 mM.

15 La renaturalización oxidante según la realización preferida de la presente invención se realiza en tampón glicina/NaOH a pH en el intervalo de 7,0 - 9,6 y par de glutatión reducido/oxidado GSH/GSSG en la relación 5-20:1 con aditivos de tamponamiento, seleccionados del grupo que comprende cloruro sódico, sulfato de sodio y sulfato de amonio.

20 En dicha purificación cromatográfica de 3 etapas según la presente invención, el sorbente de cromatografía de interacción hidrófoba está seleccionado del grupo que consiste en Butyl-Sepharose, Octyl-Sepharose, Phenyl-Sepharose, preferentemente Phenyl-Sepharose en el intervalo de pH de 8,2-9,2; el sorbente de cromatografía de intercambio aniónico está seleccionado del grupo que consiste en ANX Sepharose, Q-Sepharose, DEAE-Sepharose, QAE-Sepharose, preferentemente Q-Sepharose o DEAE-Sepharose en el intervalo de pH de 8,6-9,0; y el sorbente de cromatografía de intercambio catiónico está seleccionado del grupo que consiste en S-Sepharose, SP-Sepharose y CM-Sepharose, preferentemente SP-Sepharose o CM-Sepharose en el intervalo de pH de 5,2-5,6.

25 Los aspectos adicionales de la presente invención son proteína fusionada, obtenida por el proceso de la invención y preparación, que comprende la proteína fusionada según la presente invención en forma de disolución estable. Tanto la proteína fusionada como la preparación según la presente invención son para su uso en terapia.

La composición farmacéutica según la invención comprende la cantidad terapéuticamente eficaz de dicha proteína fusionada o dicha preparación y vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente y/o sustancias auxiliares.

La invención se describe a continuación en más detalle y con referencia a los dibujos y ejemplos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS:

30 La preparación de proteínas IFNa5 fusionadas según la presente invención se ilustra por las Figuras 1-9.

La Fig. 1 es el esquema de clonación del homodímero IFNa5-IFNa5.

La Fig. 2 muestra el esquema de clonación del heterodímero IFNa2b-IFNa5.

La Fig. 3 es el mapa de IFNa2b-IFNa5/pET21b+ con endonucleasas de restricción usadas para el análisis de patrones de restricción de clones.

35 La Fig. 4 representa curvas de crecimiento y características de parámetros de biosíntesis en diferentes medios de crecimiento en el ejemplo de la cepa IFNa2b-IFNa5/pET21b+/E.coliBL21(DE3).

40 La Fig. 5 representa una imagen de SDS-PAGE y análisis de transferencia Western de IFNa2b-IFNa5 expresada en E.coliBL21(DE3)/pET21b+. Carril 1 - marcador de proteína de peso molecular; carril 2 - fracción total de proteína (antes de la inducción); carril 3 - fracción total de proteína (2,5 h después de la inducción); carril 4 - fracción de proteína soluble (2,5 h después de la inducción); carril 5 - fracción de proteína insoluble (2,5 h después de la inducción); carril 6 - disolución de referencia de IFNa5.

La Fig. 6 representa SE-HPLC de la proteína purificada IFNa2b-IFNa5.

45 La Fig. 7 ilustra patrones de 15 % de SDS-PAGE teñidos con plata en condiciones reducidas para la sustancia de fusión IFNa2b-IFNa5 formulada. Carril 2 - muestra de columna de SP-Sepharose FF, fr. A6 10 µg, carril 3 - muestra de columna de SP-Sepharose FF, fr. A6 1 µg, carril 4 - muestra de columna de SP-Sepharose FF, fr. A6 0,1 µg. Carriles 1 y 5 - Marcador de proteína de peso molecular (Fermentas, N.º 26616, lote N.º 00079685).

La Fig. 8 es la vista de HPLC del mapeo de péptidos de IFNa5-IFNa2b.

Descripción detallada de la invenciónObjetos de la invención

- 5 La presente invención tiene como objetivo proporcionar un método de producción de ADN recombinante que codifique una proteína fusionada de IFNa5 que muestra propiedades fisicoquímicas similares a IFNa5 nativa madura. Otro objetivo de la presente invención es producir cualquiera de las proteínas fusionadas de IFNa5 por fermentación controlada. Otro objetivo más de la presente invención es obtener proteína fusionada de IFNa5 en una forma pura. Un objeto adicional de la presente invención es preparar una composición farmacéutica que comprende dicha proteína fusionada de IFNa5.
- 10 Como se ha mencionado anteriormente, los principales objetos de la presente invención son proteínas IFNa5 fusionadas de fórmulas generales (I) o (II), obtenibles por el proceso de la presente invención, donde ambos componentes están directamente fusionados, sin el conector. Secuencias de aminoácidos de conector adicionales no son siempre deseables por su toxicidad impredecible, influencia en los procesos de plegamiento y proteólisis y cuestiones de biosimilitud.
- 15 En realizaciones particulares de la invención, las proteínas IFNa5 fusionadas adecuadas son aquellas enumeradas en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Secuencia ID NO:	Proteína fusionada	Peso molecular	Secuencia de aminoácidos
1	IFNa5-IFNa5	39161,7	MCDLPQTHSLSNRRTLMIMAQMGRISPFSC KDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMI QQTFNLFSTKDSSATWDETLLDKFYTELYQQ LNDLEACMMQEVGVEDTPLMNVDSILTVRK YFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSL SANLQERLRRKECDLPQTHSLSNRRTLMIMA QMGRISPFSCDKDRHDFGFPQEEFDGNQFQ KAQAISVLHEMIQQTFNLFSTKDSSATWDET LLDKFYTELYQQ LNDLEACMMQEVGVEDTP LMNVDSILTVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWE VVRAEIMRSFSLSANLQERLRRKE
2	IFNa2b-IFNa5	38906,5	MCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRLSFSC KDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ QIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQ NDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYF QRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSL TNLQESLRSKECDLPQTHSLSNRRTLMIMAQ MGRISPFSCDKDRHDFGFPQEEFDGNQFQK AQQAISVLHEMIQQTFNLFSTKDSSATWDETLL DKFYTELYQQ LNDLEACMMQEVGVEDTPLM NVDSILTVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVV RAEIMRSFSLSANLQERLRRKE
3	IFNa5-IFNa2b	38906,5	MCDLPQTHSLSNRRTLMIMAQMGRISPFSC KDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMI QQTFNLFSTKDSSATWDETLLDKFYTELYQQ LNDLEACMMQEVGVEDTPLMNVDSILTVRK YFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSL
			SANLQERLRRKECDLPQTHSLGSRRTLMLLA QMRRLSFSCDKDRHDFGFPQEEFGNQFQK AETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLL DKFYTELYQQ LNDLEACVIQGVGTETPLMK EDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVR AEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

Secuencia ID NO:	Proteína fusionada	Peso molecular	Secuencia de aminoácidos
4	IFNa5-OSM	41788,7	MCDLPQTHSLSNRRTLMIMAQMGRISPFSCS KDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMI QQTFNLFSTKDSSATWDETLDDKIFYTELYQQ LNDLEACMMQEVGVEDTPLMNVDSILT VRK YFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSL SANLQERLRRKEAAIGSCSKEYRVLLGQLQK QTDLMQDTSRLLDPYIRIQGLDVPKLREHCR ERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGC VLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKL QMARPNILGLRNNIYCMQAQLLDNSDTAEPTK AGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHG YHRFMHSGRVFSKWGESPNRSRR
5	OSM-IFNa5	41788,7	MAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSR LLDPYIRIQGLDVPKLREHCRERPGAFPSEET LRGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRL PKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRN NIYCMQAQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPT PASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHSGRVF SKWGESPNRSRRCDLPQTHSLSNRRTLMIM AQMGRISPFSCSCLKDRHDFGFPQEEFDGNQF QKAQAISVLHEMIQQTFNLFSTKDSSATWDE TLDDKIFYTELYQQ LNDLEACMMQEVGVEDT PLMNVDSILT VRKYFQRITLYLTEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSANLQERLRRKE

Puede generarse un microorganismo que produce la proteína fusionada de IFNa5 introduciendo un fragmento de ADN / molécula de ácido nucleico, que codifica una proteína química.

- 5 En realizaciones particulares de la invención, las secuencias adecuadas que codifican las proteínas fusionadas de IFNa5 de la presente invención son las enumeradas en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

SEQ ID NO:	Proteína fusionada	Secuencia codificante			
6	IFNa5-IFNa5	ATGTGTG	ATCTGCCGCA	GACCCACTCC	CTGTCTAACC
		GTCGTA CTCT	GATGATCATG	GCACAGATGG	GTCGTATCTC
		TCCTTTCTCC	TGCCTGAAGG	ACAGACATGA	CTTTGGATTT
		CCTCAGGAGG	AGTTTGATGG	CAACCAGTTC	CAGAAGGCTC
		AAGCCATCTC	TGTCTCCAT	GAGATGATCC	AGCAGACCTT
		CAATCTCTTC	AGCACAAAGG	ACTCATCTGC	TACTTGGGAT
		GAGACACTTC	TAGACAAATT	CTACACTGAA	CTTTACCAGC
		AGCTGAATGA	CCTGGAAGCC	TGTATGATGC	AGGAGGTTGG
		AGTGGAAGAC	ACTCCTCTGA	TGAATGTGGA	CTCTATCCTG
		ACTGTGAGAA	AATACTTTCA	AAGAATCACT	CTCTATCTGA

SEQ ID NO:	Proteína fusionada	Secuencia codificante			
		CAGAGAAGAA AGCAGAAATC CAAGAACGTT GACCCACTCC GCACAGATGG ACAGACATGA CAACCAGTTC GAGATGATCC ACTCATCTGC CTACACTGAA TGTATGATGC TGAATGTGGA AAGAATCACT TGTGCATGGG TCTCTTTATC GGAATAA	ATACAGCCCT ATGAGATCCT TACGTCGTAA CTGTCTAACC GTCGTATCTC CTTTGGATTT CAGAAGGCTC AGCAGACCTT TACTTGGGAT CTTTACCAGC AGGAGGTTGG CTCTATCCTG CTCTATCTGA AGGTTGTCAG AGCAAACTTG	TGTGCATGGG TCTCTTTATC GGAATGTG GTCGTACTCT TCCTTTCTCC CCTCAGGAGG AAGCCATCTC CAATCTCTTC GAGACACTTC AGCTGAATGA AGTGGAAAGAC ACTGTGAGAA CAGAGAAGAA AGCAGAAATC CAAGAACGTT	AGGTTGTCAG AGCAAACTTG ATCTGCCGCA GATGATCATG TGCCTGAAGG AGTTTGATGG TGTCCTCCAT AGCACAAAGG TAGACAAATT CCTGGAAGCC ACTCCTCTGA AATACTTTCA ATACAGCCCT ATGAGATCCT TACGTCGTAA
8	IFNa5-IFNa2b	ATGTGTG GTCGTACTCT TCCTTTCTCC CCTCAGGAGG AAGCCATCTC CAATCTCTTC GAGACACTTC AGCTGAATGA AGTGGAAAGAC ACTGTGAGAA CAGAGAAGAA AGCAGAAATC CAAGAACGTT GACTCACTCT GCTCAGATGC ACCGTCATGA CCAGTTCAG ATGATCCAGC CTTCTGCTGC CACTGAACTG GTTATTCAGG AAGAGGATAG TATCACTCTT GCTTGGGAAG CCCTGTCTAC	ATCTGCCGCA GATGATCATG TGCCTGAAGG AGTTTGATGG TGTCCTCCAT AGCACAAAGG TAGACAAATT CCTGGAAGCC ACTCCTCTGA AATACTTTCA ATACAGCCCT ATGAGATCCT TACGTCGTAA CTGGGTTCTC GTCGTATCTC CTTCGGTTTC AAAGCTGAAA TTGGGACGAA TACCAGCAAC GCGTTGGTGT CATCCTGGCT TACCTGAAGG TTGTTCTGTC TAACCTGCAG	GACCCACTCC GCACAGATGG ACAGACATGA CAACCAGTTC GAGATGATCC ACTCATCTGC CTACACTGAA TGTATGATGG TGAATGTGGA AAGAATCACT TGTGCATGGG TCTCTTTATC GGAA TGTG GTCGTACTCT TCTTTTCTCT CCGCAGGAAG CTATCCCTGT CCTGTTCTCT ACCCTGCTGG TCAACGACCT TACCGAAACT GTTTCGCAAGT AAAAGAAGTA TGAGATCATG	CTGTCTAACC GTCGTATCTC CTTTGGATTT CAGAAGGCTC AGCAGACCTT TACTTGGGAT CTTTACCAGC AGGAGGTTGG CTCTATCCTG CTCTATCTGA AGGTTGTCAG AGCAAACTTG ATCTGCCGCA GATGCTGCTG TGCCTGAAAG AGTTTCGGTAA TCTGCATGAA ACTAAAGACT ACAAATTCTA CGAGGCTTGT CCGCTGATGA ATTTCCAGCG TAGCCCGTGT CGTTCCTTCT GTTCTAAGGAA
7	IFNa2b-IFNa5	ATGTGTG GTCGTACTCT TCTTTTCTCT CCGCAGGAAG CTATCCCTGT CCTGTTCTCT ACCCTGCTGG TCAACGACCT TACCGAAACT GTTTCGCAAGT AAAAGAAGTA TGAGATCATG GAATCTCTGC CTGTCTAACC GTCGTATCTC	ATCTGCCGCA GATGCTGCTG TGCCTGAAAG AGTTTCGGTAA TCTGCATGAA ACTAAAGACT ACAAATTCTA CGAGGCTTGT CCGCTGATGA ATTTCCAGCG TAGCCCGTGT CGTTCTTCT GTTCTAAGGAA GTCGTACTCT TCCTTTCTCC	GACTCACTCT GCTCAGATGC ACCGTCATGA CCAGTTCAG ATGATCCAGC CTTCTGCTGC CACTGAACTG GTTATTCAGG AAGAGGATAG TATCACTCTT GCTTGGGAAG CCCTGTCTAC TGATGATCATG GATGATCATG TGCCTGAAGG	CTGGGTTCTC GTCGTATCTC CTTCGGTTTC AAAGCTGAAA AAATCTTCAA TTGGGACGAA TACCAGCAAC GCGTTGGTGT CATCCTGGCT TACCTGAAGG TTGTTCTGTC TAACCTGCAG GACCCACTCC GCACAGATGG ACAGACATGA

SEQ ID NO:	Proteína fusionada	Secuencia codificante			
		CTTTGGATTT CAGAAGGCTC AGCAGACCTT TACTTGGGAT CTTTACCAGC AGGAGGTTGG CTCTATCCTG CTCTATCTGA AGGTTGTCAG AGCAAACTTG	CCTCAGGAGG AAGCCATCTC CAATCTCTTC GAGACACTTC AGCTGAATGA AGTGAAGAC ACTGTGAGAA CAGAGAAGAA AGCAGAAATC CAAGAACGTT	AGTTTGATGG TGTCCTCCAT AGCACAAAGG TAGACAAATT CCTGGAAGCC ACTCCTCTGA AATACTTTCA ATACAGCCCT ATGAGATCCT TACGTCGTAA	CAACCAGTTC GAGATGATCC ACTCATCTGC CTACACTGAA TGTATGATGC TGAATGTGGA AAGAATCACT TGTGCATGGG TCTCTTTATC GGAATAA
9	IFNa5-OSM	ATGTGTG GTCGTA CTCT TCCTTTCTCC CCTCAGGAGG AAGCCATCTC CAATCTCTTC GAGACACTTC AGCTGAATGA AGTGAAGAC ACTGTGAGAA CAGAGAAGAA AGCAGAAATC CAAGAACGTT GCTGCTCGAA GAAGCAGACA GACCCCTATA TGAGAGAGCA TGAGGAGACC CAGACCCCTCA TGGCCGACTT GGAGAGGTCT CAGATGGCGA TCTACTGCAT TGAGCCCACG ACCCCCACCC AGGGCTGCAG CTCAGTGGGG AACCGGAGCC	ATCTGCCGCA GATGATCATG TGCCCTGAAGG AGTTTGATGG TGTCCTCCAT AGCACAAAGG TAGACAAATT CCTGGAAGCC ACTCCTCTGA AATACTTTCA ATACAGCCCT ATGAGATCCT TACGTCGTAA AGAGTACCGC GATCTCATGC TACGTATCCA CTGCAGGGAG CTGAGGGGGC ATGCCACACT AGAGCAGCGC GGGCTGAACA GGCCGAACAT GGCCCAGCTG AAGGCTGGCC CTGCCTCGGA GTTCTGCAT CGGGTCTTCA GGAGATAA	GACCCACTCC GCACAGATGG ACAGACATGA CAACCAGTTC GAGATGATCC ACTCATCTGC CTACACTGAA TGTATGATGC TGAATGTGGA AAGAATCACT TGTGCATGGG TCTCTTTATC GGAAGCG GTGCTCCTTG AGGACACCAG AGGCCTGGAT CGCCCCGGGG TGGGCAGGCG GGGCTGCGTC CTCCCCAAGG TCGAGGACTT CCTCGGGCTC CTGGACAAC GGGGGGCCTC TGCTTTTCAG GGCTACCATC GCAAGTGGGG	CTGTCTAACC GTCGTATCTC CTTTGGATTT CAGAAGGCTC AGCAGACCTT TACTTGGGAT CTTTACCAGC AGGAGGTTGG CTCTATCCTG CTCTATCTGA AGGTTGTCAG AGCAAACTTG GCTATAGGCA GCCAGCTCCA CAGACTCCTG GTTCCCTAAAC CCTTCCCCAG GGGCTTCCTG CTGCACAGAC CCCAGGATTT GGAGAACTG AGGAACAACA CAGACACGGC TCAGCCGCCC CGCAAGCTGG GCTTCATGCA GGAGAGCCCG
10	OSM-IFNa5	ATGGCG GTGCTCCTTG AGGACACCAG AGGCCTGGAT CGCCCCGGGG TGGGCAGGCG GGGCTGCGTC CTCCCCAAGG TCGAGGACTT CCTCGGGCTC CTGGACAAC GGGGGGCCTC TGCTTTTCAG GGCTACCATC GCAAGTGGGG ATCTGCCGCA GATGATCATG TGCCCTGAAGG	GCTATAGGCA GCCAGCTCCA CAGACTCCTG GTTCCCTAAAC CCTTCCCCAG GGGCTTCCTG CTGCACAGAC CCCAGGATTT GGAGAAGCTG AGGAACAACA CAGACACGGC TCAGCCGCCC CGCAAGCTGG GCTTCATGCA GGAGAGCCCG GACCCACTCC GCACAGATGA	GCTGCTCGAA GAAGCAGACA GACCCCTATA TGAGAGAGCA TGAGGAGACC CAGACCCCTCA TGGCCGACTT GGAGAGGTCT CAGATGGCGA TCTACTGCAT TGAGCCCACG ACCCCCACCC AGGGCTGCAG CTCAGTGGGG AACCGGAGCC CTGTCTAACC GTCGTATCTC CTTTGGATTT	AGAGTACCGC GATCTCATGC TACGTATCCA CTGCAGGGAG CTGAGGGGGC ATGCCACACT AGAGCAGCGC GGGCTGAACA GGCCGAACAT GGCCCAGCTG AAGGCTGGCC CTGCCTCGGA GTTCCCTGCAT CGGGTCTTCA GGAGA TGTC GTCGTA CTCT TCCTTTCTCC CCTCAGGAGG

SEQ ID NO:	Proteína fusionada	Secuencia codificante
		AGTTTGATGG CAACCAGTTC CAGAAGGCTC AAGCCATCTC TGTCCTCCAT GAGATGATCC AGCAGACCTT CAATCTCTTC AGCACAAAGG ACTCATCTGC TACTTGGGAT GAGACACTTC TAGACAAATT CTACACTGAA CTTTACCAGC AGCTGAATGA CCTGGAAGCC TGTATGATGC AGGAGGTTGG AGTGGAAGAC ACTCCTCTGA TGAATGTGGA CTCTATCCTG ACTGTGAGAA AATACTTTCA AAGAATCACT CTCTATCTGA CAGAGAAGAA ATACAGCCCT TGTGCATGGG AGGTTGTCAG AGCAGAAATC ATGAGATCCT TCTCTTTATC AGCAAACCTG CAAGAACGTT TACGTCGTAA GGAATAA

- 5 Adecuadamente, la secuencia codificante puede ser parte de un vector de expresión. Las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento que incluyen la secuencia de nucleótidos de la presente invención pueden estar presentes en un vector en el que la secuencia de nucleótidos está operativamente unida a secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos por un organismo hospedador adecuado.
- Los vectores para su uso en la presente invención pueden transformarse en una célula hospedadora adecuada como se describe a continuación para proporcionar la expresión de un polipéptido fusionado de la presente invención.
- 10 La elección del vector, por ejemplo un plásmido, cósmido, o vector de fago, dependerá frecuentemente de la célula hospedadora en la que va a introducirse. Vectores adecuados incluyen pET21b+, pET28a+, pUC57/T y pT7, siendo preferido pET21b+.
- Los vectores para su uso en la presente invención pueden contener uno o más genes marcadores de selección tales como un gen que confiere resistencia a antibióticos, por ejemplo, resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección puede llevarse a cabo por co-transformación.
- 15 Los vectores pueden usarse *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN, o usarse para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula hospedadora.
- Así, en una realización adicional, la invención proporciona un método de preparación de secuencias de nucleótidos de la presente invención introduciendo una secuencia de nucleótidos (fragmento de ADN) de la presente invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible, y cultivando la célula hospedadora en condiciones que provocan la replicación del vector.
- 20 El vector puede comprender además una secuencia de nucleótidos que permite que el vector se replique en la célula hospedadora en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de plásmidos pUC19, pACYC177, pUBHO, pE194, pAMBI, pIJ702 y pBR322.
- 25 También puede lograrse la expresión potenciada de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína fusionada en IFNa5 por la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo, regiones de promotor, conductor de la secreción y de terminador.
- Preferentemente, la secuencia de nucleótidos según la presente invención está operativamente unida a al menos un promotor. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos en células hospedadoras bacterianas adecuadas son muy conocidos en la técnica.
- 30 Las realizaciones de la presente invención proporcionan células hospedadoras transformadas o transfectadas con una secuencia de nucleótidos que expresa la proteína quimérica como se describe en el presente documento. Las células se elegirán por ser compatibles con dicho vector y pueden ser, por ejemplo, células procariotas (por ejemplo, bacterianas), fúngicas, de levadura o vegetales. Preferentemente, las células hospedadoras son células procariotas.
- 35 Ejemplos de organismos hospedadores bacterianos adecuados son especies bacterianas Gram-positivas o Gram-negativas.
- Células hospedadoras bacterianas adecuadas incluyen *Escherichia coli*. Adecuadamente, las cepas de *E. coli* incluyen BL21, BL21(DE3), Rosetta gami-2, JMI09, K12 y K802, preferentemente BL21(DE3) y Rosetta gami-2.
- 40 El genotipo de la célula hospedadora puede modificarse para mejorar la expresión. Ejemplos de modificaciones de la célula hospedadora incluyen deficiencia de proteasa, suplemento de ARNt raros, y modificación del potencial reductor en el citoplasma para potenciar la formación de enlaces disulfuro, tal como mutaciones de tiorredoxina reductasa (trxB) y glutatión oxidoreductasa (gor).

Por ejemplo, la célula hospedadora de *E. coli* puede expresar en exceso ARNt raros para mejorar la expresión de proteínas heterólogas como se ejemplifica/describe en Kane [Curr Opin Biotechnol (1995), 6, 494-500 "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *E. coli*"]. La célula hospedadora puede ser deficiente en varias enzimas reductoras, favoreciéndose así la formación de enlaces disulfuro estables como se ejemplifica/describe en Bessette [Proc Natl Acad Sci USA (1999), 96, 13703-13708 "Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm"].

En una realización particular, la célula hospedadora de *E. coli* es una cepa deficiente en proteasa de *E. coli*, tal como la cepa hospedadora deficiente en las proteasas Lon/Omp T de *E. coli*, preferentemente una cepa BL21 de *E. coli*, lo más preferentemente una cepa BL21(DE3) de *E. coli*.

El hospedador de *E. coli* transformado de la presente invención contuvo un vector de expresión preparado a partir de pET21b+ (Novagene).

Según la presente invención, dicho gen fusionado se clona en el vector pET21b+ en la dirección 3' con respecto al promotor temprano T7 de bacteriófago. Se dice que el gen está en un marco de lectura del promotor, el operón lac debe estar en la dirección 5' del promotor T7, y la expresión de la construcción fusionada deseada, que contiene el marco de lectura abierto, está rigurosamente controlada y terminada por el terminador T7.

En el principal aspecto, la invención se refirió a un proceso de producción de una proteína fusionada de IFNa5 por expresión en una célula hospedadora de *E. coli* productora de IFNa5, que comprende:

a) proporcionar una célula hospedadora de *E. coli*, que produce dicha proteína fusionada de IFNa5;

b) cultivar células hospedadoras de *E. coli* que producen la proteína fusionada de IFNa5 en condiciones eficaces para expresar dicha proteína fusionada de IFNa5 por dicha célula hospedadora de *E. coli* recombinante en un medio de fermentación adecuado, en el que dicho medio de fermentación comprende componentes de origen animal u origen de levadura;

c) aislar y purificar la proteína fusionada de IFNa5 expresada.

En una realización particular, dicha proteína fusionada de IFNa5 recombinante que puede producirse según el proceso de la invención es una proteína fusionada de IFNa5 de la que uno de los componentes es sustancialmente idéntico a una IFNa5 nativa, es decir, una proteína que se produce por célula hospedadora de *E. coli* que ha sido transformada con gen, que codifica proteína fusionada de IFNa5 quimérica, o una modificación de la misma, que codifica una proteína, que tiene (1) secuencia de aminoácidos que es al menos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de IFNa5 nativa fusionada con cualquier otra citocina y (2) una actividad biológica que es común a IFNa5 nativa. En una realización preferida, dicha IFNa5 es hIFNa5.

En una realización más particular, la proteína fusionada de IFNa5 recombinante producida según la invención es una proteína quimérica que tiene cualquier secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 (Tabla 2, anteriormente).

La célula hospedadora de *E. coli*, que produce la proteína fusionada de IFNa5, puede obtenerse por métodos convencionales y protocolos para clonar y expresar [por ejemplo, Sambrook et al. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Segunda ed., CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1-3 (Ausubel F.M. et al., ed.) John Wiley & Sons, Inc., Brooklyn, New York, 1994-1998].

En una realización particular, la clonación y expresión de un gen que codifica IFNa5 y la construcción de la cepa bacteriana que produce la proteína IFNa5 recombinante (es decir, la célula hospedadora de *E. coli* que produce la IFNa5) puede realizarse según un método que comprende clonación del gen quimérico que codifica el gen de ADNc, modificación de la secuencia de ADN de dicho gen para optimizar su expresión en la construcción de *E. coli* del plásmido de expresión, transformación del plásmido seleccionado en la cepa de *E. coli* adecuada y selección de las condiciones de expresión/inducción. Los Ejemplos 1, 2, 3 y 4 desvelan los detalles de construcción de la célula hospedadora de *E. coli*, que produce la proteína fusionada de hIFNa5 quimérica.

En una realización particular, cuando la célula hospedadora de *E. coli* es una cepa deficiente en proteasa de *E. coli*, tal como la cepa BL21(DE3) de *E. coli*, dicha célula hospedadora se transforma con un vector, que comprende una secuencia que codifica la proteína fusionada de IFNa5 bajo el control de un promotor inducible. En ese caso, la expresión de la proteína, como se ha mencionado anteriormente, requiere la adición de un inductor, tal como, por ejemplo, isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Así, según una realización particular, cuando la célula hospedadora de *E. coli* es una cepa BL21 de *E. coli*, tal como una cepa BL21(DE3) de *E. coli*, las condiciones de la etapa b) comprenden inducción. Se induce la expresión de proteína fusionada de IFNa5 recombinante después de alcanzar la formación de biomasa apropiada usando inductor del operón lac adecuado, tal como lactosa y similares, preferentemente IPTG a la concentración de 0,1 mM a 1 mM, lo más preferentemente 0,5 mM.

El medio de cultivo de la etapa b) del proceso de la invención está seleccionado de medios complejos tales como LB, YPD, TB, M9 o M9m, en el que dicho medio de cultivo comprende una o más fuentes de nitrógeno,

seleccionadas del grupo que consiste en sales de amonio, nitratos, triptona, extracto de levadura e hidróxido de amonio, y una fuente de carbono, seleccionada del grupo que consiste en glicerol, glucosa, fructosa y similares, preferentemente glucosa.

5 La formación de biomasa está en un intervalo de 10 a 50 g/l, preferentemente 25-40 g/l para medios de medio complejo basados en el peso de células húmedas, en el que dicho medio de cultivo tiene los siguientes parámetros:

- pH en el intervalo de 3,0 a 8,0, preferentemente 6,0 a 6,8 para medio complejo;
- temperatura en el intervalo de 25 a 45 °C, preferentemente 37 a 42 °C, y
- oxígeno disuelto: 20-80 % de saturación, preferentemente 20-40 % de saturación;

y dicho cultivo se lleva a cabo durante una duración de 4 a 10 horas, preferentemente 6 horas.

10 El aislamiento y la purificación de la proteína fusionada de IFNa5 diana de un microorganismo que produce la proteína, es decir, la etapa c) del proceso de la presente invención, comprende:

- lisar el microorganismo y separar material insoluble que comprende proteína fusionada del material celular proteináceo soluble;
- solubilizar la proteína fusionada presente en el material insoluble;

15 - oxidar la proteína fusionada en presencia de un par agente oxidante / reductor;

- someter la disolución a cromatografía; y

- recuperar la proteína fusionada purificada.

Más específicamente, la etapa de aislar y purificar la proteína fusionada de IFNa5 de un microorganismo productor comprende:

- 20 - lisar el microorganismo y separar material insoluble que contiene proteína fusionada de IFNa5 recombinante de material proteináceo soluble;
- solubilizar la proteína recombinante presente en el material insoluble;
- oxidar la proteína fusionada de IFNa5 usando glutatión oxidado en presencia de glutatión reducido;
- separar la proteína diana replegada del agente caotrópico;
- 25 - combinación de métodos de purificación por cromatografía adecuados.

En una realización preferida de la presente invención, en la etapa c), la proteína fusionada de IFNa5 en el material insoluble se solubiliza usando un agente caotrópico, preferentemente a una concentración intermedia de un agente caotrópico, a pH en el intervalo 8,00-9,00. La solubilización podría realizarse usando clorhidrato de guanidinio, siendo la concentración de clorhidrato de guanidinio de 3,0 a 7,0, preferentemente 6,0 - 6,2 M.

30 En una de las realizaciones preferidas de la presente invención, el par agente oxidante / reductor es un par de glutationes oxidados / reducidos, en el que la relación molar de glutatión oxidado y reducido es de 1:5 a 1:20, preferentemente 1:20.

La realización de la presente invención comprende además la separación de la proteína fusionada de IFNa5 replegada del caótro, en la que la proteína fusionada de IFNa5 replegada se separa del caótro por cromatografía de interacción hidrófoba.

35

La cromatografía de la etapa c) es preferentemente combinación de purificación por cromatografía de 3 etapas, que comprende cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico.

40 Podrían usarse diversos soportes de cromatografía de interacción hidrófoba, seleccionados del grupo que consiste en BioBeads SM-2, Butyl-S-Sepharose, Capto-Octyl, Octyl-Sepharose, Phenyl-Sepharose, Capto-Butyl, Butyl-Sepharose.

Podrían usarse diversos soportes de cromatografía de intercambio aniónico, seleccionados del grupo, que consiste en UnoSphere Q, Macro-Prep High Q, Macro-Prep DEAE, Macro-Prep 25 Q, DEAE Sephacel, ANX Sepharose 4, Q Sepharose HP.

45 Pueden usarse diversos soportes de cromatografía de intercambio catiónico y pueden seleccionarse del grupo que comprende: SP Sepharose FF, SP Sepharose HP, CM Sepharose FF, TSK gel SP-5PW, TSK gel SP-5PW-HR,

Toyopearl SP-650M, Toyopearl SP-650S, Toyopearl SP-650C, Toyopearl CM-650M, Toyopearl CM-650S, soporte Macro-Prep High S, soporte Macro-Prep S, soporte Macro-Prep CM, etc.

Se formula disolución estable de proteína de fusión diana para su uso en terapia y estudios de estabilidad. Vehículos farmacéuticamente aceptables para esta proteína de fusión son agua, solución salina, acetato o solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, y similares, además de combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares (manosa o ramnosa), polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o compuestos pequeños tales como cloruro sódico o glicina en la composición. Se considera que en todos los casos se preparan disoluciones estériles: se incorpora la molécula de fusión en disolvente apropiado después del proceso de purificación y se esteriliza por filtración.

Posibles indicaciones están relacionadas con indicaciones de los componentes de fusión: hepatitis B y C aguda y crónica, enfermedades cancerosas tales como melanomas, linfomas y sarcomas, amplia variedad de infecciones virales (coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio, o condiciones de la piel como lesiones de la piel/mucosa producidas por infecciones por VPH) y tratamientos antiinflamatorios de artritis reumatoide.

Descripción de las realizaciones de la invención

Como se ha mencionado, la estrategia clave de la presente invención para fusionar genes es mantener la misma secuencia de aminoácidos - sin usar conectores entre los genes. Esto se hace con el fin de evitar cierta inmunogenicidad de las secuencias de conector. Los experimentos generalmente consistieron en secuencia simple - fusión de genes por métodos de ingeniería de genes, transformación de ADN en *E. coli* recombinante y selección de clones, optimización de la biosíntesis en medio complejo y, finalmente, selección de un esquema apropiado para la purificación de proteína recombinante.

Todas las alteraciones genéticas se realizaron introduciendo mutaciones en secuencias sin alterar la secuencia de aminoácidos principal. La principal estrategia para los procedimientos de clonación por fusión fueron optimización de PCR, fusión de genes mediante extremos cohesivos y extracción de producto génico de tamaño y orientación adecuados, su ligamiento en plásmido transitorio o de expresión y transformación en diversas cepas de *E. coli*. Todos los clones obtenidos se comprobaron para su tamaño de inserción, orientación, niveles de expresión; los análisis de restricción y secuenciación se realizaron en clones seleccionados. Para la fusión del dímero de interferón alfa 5, se realizó una secuencia de clonación específica y única (descripción detallada en el Ejemplo 1 y Fig. 1).

La proteína fusionada se introdujo en varios plásmidos diferentes que esperaban encontrar el productor con las mejores cualidades. Los plásmidos probados fueron pET21b+ y pET28+, ambos designados para el fuerte control y expresión de alto nivel de las proteínas recombinantes. También se transformaron clones prometedores con patrones de restricción apropiados y tamaño de inserción correcto en dos cepas de *E. coli* diferentes para la expresión estable - BL21(DE3) y Rosetta gami-2 de *E. coli*. La mejor velocidad de expresión y relación de estabilidad de plásmidos para el clon seleccionado fueron los criterios principales con los que seguir avanzando con optimización de la biosíntesis.

La biosíntesis se realizó en biorreactores Biorad con aire suministrado, temperatura y pH mantenidos. El cultivo se realizó en medio complejo, optimizando su composición, aditivos, regímenes de temperatura, concentración de IPTG y tiempo de inducción. En el experimento más satisfactorio realizado (véase el Ejemplo 4), se expresó la proteína fusionada de IFNa5 en forma de cuerpos de inclusión y se acumuló hasta el 40 % de fracción de proteína celular insoluble. La biosíntesis de proteínas fusionadas de interferón alfa 5 puede describirse como biosíntesis discontinuas en medio rico con extracto de levadura y glucosa como principal fuente de carbono. Durante la optimización del proceso de biosíntesis, se tuvieron en cuenta varios criterios. El rendimiento de proteína recombinante es el principal criterio cuando se evalúa el proceso de biosíntesis, sin embargo, la baja estabilidad del plásmido puede ser el parámetro clave para cambiar las condiciones de biosíntesis y para sacrificar el rendimiento de proteína. La baja estabilidad del plásmido, que se observó en las etapas de optimización de la biosíntesis iniciales, puede conducir a la acumulación de células de *E. coli* no productoras que cargarán el proceso de purificación y reducirán los posteriores rendimientos. El uso de la cepa Rosetta gami-2 de *E. coli* autoriza a producir proteína fusionada en la fracción de proteína soluble de la célula. Esto puede desearse cuando la proteína IFNa5 está fusionada con una citocina con impedimentos de plegamiento. Después de la optimización del proceso de biosíntesis, se estableció una tecnología para producir una proteína recombinante con los máximos mejores valores de parámetros del proceso de biosíntesis. Más detalles se describen en el Ejemplo 5.

La purificación se realizó por combinación y optimización de diversos sorbentes de intercambio iónico y de interacción hidrófoba. El proceso de purificación se ajusta finamente para un proceso específico de purificación de proteínas fusionadas. El proceso de plegamiento de proteínas después de la etapa de desnaturalización se basa fuertemente en la tendencia de los fragmentos de péptido a plegarse en ciertas formas. En el caso de proteínas de fusión se ha observado durante todas las etapas de purificación y su análisis con RP-HPLC que una familia de proteína erróneamente plegada se está formando alrededor del pico principal de la proteína diana. Se realizaron ensayos iniciales para el aislamiento por fusión de cuerpos de inclusión y purificación. El inconveniente principal surgió de la posible interacción por solapamiento de los enlaces -S-S- expuestos al disolvente (localizados dentro del bucle) de ambos componentes de fusión que conduce a la formación de especies desconocidas (detectadas por RP-

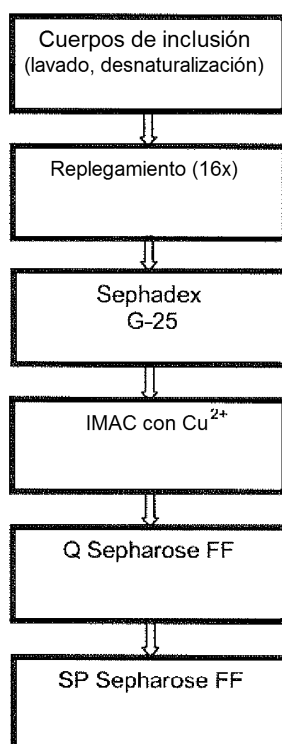
HPLC) que son difícilmente separadas de la principal forma de fusión. Para evitar estas formas, se seleccionó un esquema de plegamiento y purificación con rendimientos más bajos de proteína total, sacrificando parte del rendimiento para retener la mayoría de la fracción correctamente plegada.

En todos los casos estudiados, el replegamiento se realizó por 16x dilución total de disolución IB. Para este fin, se vertieron 56 ml de disolución IB en tampón de replegamiento mezclando suavemente la disolución final durante la duración definida a +4 °C. El tampón de replegamiento normalmente estuvo compuesto de tampón glicina 25 mM/NaOH de valor de pH definido que contenía NaCl 1,2 M, L-Arg 0,5 M y par seleccionado de glutatión reducido/oxidado, o glutatión oxidado para complementar el DTT residual como agente reductor. Las condiciones de replegamiento se optimizaron estudiando la influencia del pH: 7,0; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5 a relación molar y concentración de GSH/GSSG = 2,5 mM/0,25 mM, y relación molar y concentración de GSH/GSSG = 2,5 mM/0,25 mM; 5,0 mM/0,25 mM; 5,0 mM/0,5 mM; 10 mM/1,0 mM a valor de pH 9,6. Se controló la eficiencia de replegamiento por RP-HPLC. Como optimizadas se seleccionaron aquellas condiciones de replegamiento que dieron el porcentaje más alto de forma de fusión correctamente plegada: relación molar y concentración de GSH/GSSG = 2,5 mM/0,25 mM.

Para la proteína de fusión IFNa2b-IFNa5, se redujeron cuerpos de inclusión aislados con DTT y se realizó el replegamiento introduciendo 0,5 mM de glutatión oxidado mientras que los otros aditivos del tampón de replegamiento (NaCl 1,2 M, L-Arg 0,5 M) siguieron iguales. Sin embargo, los intentos de los presentes inventores por producir la mayor cantidad de las fusiones no fueron apropiados en términos de rendimiento del proceso. Los presentes inventores encontraron que los aditivos de sulfato de amonio añadidos en el tampón de replegamiento en lugar de NaCl permiten aumentar aproximadamente dos veces el contenido de proteína de fusión correctamente plegada. Con respecto a este proceso de fusión adicional, se realizó el proceso con inclusión en tampón de replegamiento de sulfato de amonio 0,5 M. Tales cambios de sal durante el procedimiento de replegamiento evocan los cambios de las etapas de cromatografía de fusión iniciales, ya que la primera etapa de purificación por cromatografía en columna de Phenyl-Sepharose FF ha sido anteriormente ajustada usando NaCl. La columna de Phenyl-Sepharose FF está dedicada para la separación de disolución de proteína replegada de clorhidrato de guanidinio (GdmCl) residual. Por tanto, para operar la columna de Phenyl-Sepharose FF, es decir, cargar la proteína replegada en la columna equilibrada con NaCl 1,5, fue necesario realizar intercambio de sulfato de amonio a NaCl o encontrar condiciones apropiadas para esta operación de columna usando tampón de equilibrio que contiene concentración seleccionada apropiada de sulfato de amonio. Se realizó la prueba de la operación de la columna de Phenyl-Sepharose FF usando diversa concentración de sulfato de amonio añadida a tampón de equilibrio. Los datos mostraron que es posible realizar cromatografía de proteína replegada en la columna de Phenyl-Sepharose FF usando sulfato de amonio 1,25 M. En tal caso, realizando la etapa de renaturalización usando aditivos de sulfato de amonio 0,5 M puede realizarse la posterior etapa de cromatografía en la columna de Phenyl-Sepharose FF omitiendo la columna de Sephadex G-25. Es suficiente añadir sulfato de amonio en disolución de proteína replegada y tampón de equilibrio hasta su concentración de 1,25 M y realizar la cromatografía análogamente como en presencia de NaCl. Para la cromatografía en Phenyl-Sepharose, la columna se equilibró con Tris-HCl 20 mM, NaCl 1,5 M, pH=8,2, conductividad 115,1 mS/cm. Se cargaron 2500 ml de disolución de proteína de fusión IFNa2b-IFNa5 después de Sephadex G25 en la columna con caudal de elución 20 ml/min y se eluyó con Tris-HCl 10 mM, pH= 9,2, conductividad 1196 µS/cm.

Después de Phenyl-Sepharose, se realizó cromatografía en Q-Sepharose: con equilibrado con Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,05 M, pH 8,8. El conjunto de proteína de Phenyl-Sepharose se ajustó a pH con HCl 6 M a 8,8, conductividad 8 mS/cm y se cargó en columna. El gradiente de desorción se realizó como Tris-HCl 20 mM, gradiente lineal NaCl 0,05 a 0,25 M, pH 8,8. La fracción recogida se sometió a cromatografía en SP-Sepharose. La columna de SP-Sepharose se equilibró con CH₃COONa 20 mM, NaCl 100 mM, pH 5,4. La muestra se cargó después del ajuste del pH con HCl 6 M a 5,4, conductividad 9,5 mS/cm. La desorción de la columna fue con gradiente de CH₃COONa 20 mM, de NaCl 50 mM a 0,25 M, pH 5,4. Después de la cromatografía en SP-Sepharose FF las fracciones reunidas que contenían fusión se añadieron a 1 parte (10:1 volumen) de tampón fosfato concentrado (fosfato 250 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0), el pH se corrigió a 7,0 y la disolución se concentró usando filtros centrífugos de Millipore Ultracel (10MWCO). Después de la concentración, el tampón se intercambió a PBS (fosfato 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0). Después del intercambio de tampón, el contenido de proteína total se determinó usando el ensayo de proteína Pierce 660. La disolución de proteína se filtró usando el filtro Mustang E y se separó en alícuotas en viales para 1 ml (concentración final 1,005 mg/ml) en entorno estéril (campana de flujo de aire laminar). Los viales se congelaron y se mantuvieron a -80 °C de temperatura. Las muestras se tomaron para RP-, SEC-HPLC, proteína total y determinación de endotoxina.

Para las proteínas de fusión IFNa5-OSM y OSM-IFNa5, los presentes inventores han evaluado el impacto del sulfato de amonio sobre el rendimiento de renaturalización de la fusión. Todos los tampones de renaturalización consistieron en tampones glicina 25 mM/NaOH, que contenían L-Arg 0,5 M, pH 9,6, glutatión reducidos 5 mM (GSH) y oxidados 0,25 mM (GSSG). El aumento de la concentración de sulfato de amonio en el tampón de replegamiento dio el rendimiento más alto de proteína renaturalizada en comparación con el aditivo usado antes de NaCl 1,2 M. El esquema optimizado de proteínas de fusión de IFNa5 y OSM se presenta a continuación:



Se suspendieron 50 g de biomasa en 500 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 7,4 que contenía EDTA 2 mM, DTT 25 mM, PMSF 250 mM, 0,1 % de Triton X-100 y se rompieron usando ultra-sonicación. La rotura se llevó a cabo usando impulso 1:1, amplitud 40 % y tiempo para la rotura de 25 min durante 10 g. La suspensión obtenida se centrifugó a 12000 rpm durante 30 min y los sedimentos que contenían los cuerpos de inclusión (IB) se congelaron a -20 °C. El lavado de los cuerpos de inclusión se realizó de tal manera:

Dos veces con tampón de lavado I: Tris-HCl 10 mM, NaCl 1 M, 0,1 % de polisorbato-80, pH 7,4, cada uno con 500 ml

Tampón de lavado II: Tris-HCl 10 mM, urea 6 M, pH 8,0, 500 ml

Tampón de lavado III: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, 500 ml

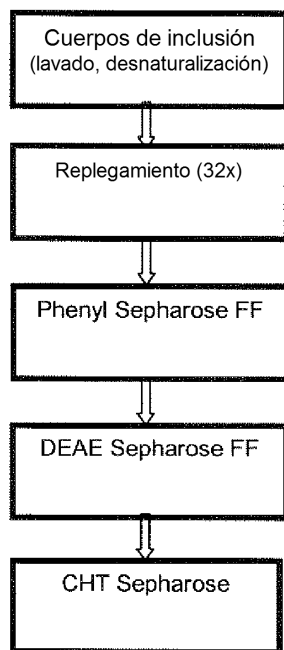
Después de cada etapa de lavado se centrifugaron los IB a 10000 rpm con la centrifugadora Beckman.

Los IB pre-lavados se solubilizaron en 300 ml de tampón Gly 25 mM/NaOH a pH 8,7 que contenía EDTA 2 mM, GdmCl 6 M, DTT 20 mM (297 mS/cm, +4 °C) durante 2 horas y se centrifugaron a partir de aquí a 9500 rpm durante 30 min con la centrifugadora Beckman.

El replegamiento se llevó a cabo en vasos de precipitados Duran de tipo 2L, cubiertos por Parafilm. Los cuerpos de inclusión solubilizados se diluyeron 10x con tampón de replegamiento Gly 25 mM/NaOH, arginina 0,5 M, (NH₄)₂SO₄ 0,25 M, GSH 2,5 mM, GSSG 0,25 mM, pH 9,6, al volumen final de 3000 ml. El replegamiento se llevó a cabo aproximadamente durante 64 h. Después del replegamiento, la disolución de proteína se centrifugó durante 30 min, 9500 rpm +4 °C en la centrifugadora Beckman. Para Sephadex G-25, toda la disolución obtenida después del replegamiento se cargó en la columna y se lavó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 9,0, para 1,2 volúmenes de columna. Después de la desalación, la disolución de proteína se sometió a cromatografía en Sepharose quelante. El medio de Sepharose FF quelante se lavó con disolución 50 mM de EDTA, 2 VC, disolución 0,1 M de HCl, 2 VC, agua hasta el valor de pH por encima de 5 y se cargó con iones Cu(II) cargando disolución 0,2 M de Cu₂SO₄, 2 VC. La columna se lava con agua y se equilibra con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, que contiene NaCl 0,5 M a un caudal de 10 ml/min. Se cargaron 3250 ml de disolución de proteína desalada, pH 7,0, en la columna. El lavado de las proteínas no unidas se realizó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,0, 2 VC. La elución empezó con gradiente de Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, 15 VC a imidazol 100 mM, pH 7,0. Las fracciones recogidas se comprobaron para la presencia de proteína de fusión y se sometieron a medios de Q-Sepharose FF. Esta columna se equilibró con Tris-HCl 20 mM, NaCl 70 mM, pH 9,0, 10 VC. Lavado de las proteínas no unidas: Tris-HCl 20 mM, NaCl 70 mM, pH 9,0, 2 VC; y elución con gradiente de Tris-HCl 20 mM, 10 VC a NaCl 300 mM, pH 9,0. Para la etapa final de purificación, se selecciona CM Sepharose. El equilibrado de la columna se realiza con acetato sódico 20 mM, NaCl 50 mM, pH 5,5, 10 VC. Elución de la proteína final con gradiente de acetato sódico 20 mM, 15 VC a NaCl 500 mM, pH 5,5. Las fracciones reunidas que contenían la fusión se añadieron a 1 parte (10:1 volumen) de tampón fosfato concentrado (fosfato 250 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0), el pH se corrigió a 7,0 y la disolución se concentró usando

5 filtros de ultracentrífuga Millipore Ultracel (10MWCO). Después de la concentración, el tampón se intercambió a PBS (fosfato 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0). Después del intercambio de tampón, el contenido de proteína total se determinó usando el ensayo de proteína Pierce 660. Se filtró la disolución de proteína usando el filtro Mustang E y se separó en alícuotas en viales para 1 ml (concentración final 1,005 mg/ml) en entorno estéril (campana de flujo de aire laminar). Los viales se congelaron y se mantuvieron a -80 °C de temperatura. Se tomaron muestras para RP-, SEC-HPLC, proteína total y determinación de endotoxina.

Para la proteína de fusión IFNa5-IFNa5, se optimizó un tercer esquema de purificación.



10 Se realizó el pre-lavado de cuerpos de inclusión (IB) aislados por un procedimiento de cuatro etapas consecutivas usando: tampón de lavado I: tampón Tris-HCl 10 mM, que contenía NaCl 1 M, 0,1 % de polisorbato-80, pH 7,4; tampón de lavado II: tampón Tris-HCl 10 mM, que contenía urea 6 M, pH 8,0 y tampón de lavado III: tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.

15 El tampón de solubilización consiste en tampón Gly 25 mM/NaOH que contenía EDTA 2 mM, GdmHCl 6 M, DTT 20 mM, pH 9,6, 0-10 °C. Relación de solubilización: se solubilizaron cuerpos de inclusión (IB) aislados de 1 g de biomasa en 6 ml de tampón de solubilización durante 2 horas, a +4 °C, y se centrifugaron a partir de aquí a 9500 rpm durante 30 min después de esta etapa.

El lavado de los cuerpos de inclusión (IB) se realizó de tal manera:

- a) Se lavaron dos veces los cuerpos de inclusión con tampón de lavado I (que contenía aditivos de NaCl 1 M, 0,1 % de polisorbato-80);
- 20 b) El tercer lavado con tampón II (que contenía aditivo de urea 6 M);
- c) El cuarto lavado con tampón III, tampón Tris-HCl 10 mM (sin aditivos, pH 8,0). Fue la etapa de pre-lavado de IB final;
- d) Los cuerpos de inclusión después de cada una de estas etapas de lavado se centrifugaron en el rotor Beckman J-10, 9500 rpm, 30 min, 4 °C.

25 Relación de pre-lavado: 10 ml de tampón para IB aislados de 1 g de biomasa húmeda.

30 Se eligió el replegamiento de la fusión con los aditivos de sulfato de amonio 0,5 M a un factor de dilución de 32x como el principal procedimiento para el desarrollo del esquema de purificación adicional. Aunque los aditivos de sulfato de sodio permiten obtener una mayor recuperación de la proteína de la columna Phenyl-Sepharose FF, se pospuso el uso de sulfato de sodio debido a su tendencia a la cristalización en condiciones de sala fría. Se realizó el proceso de cromatografía en Phenyl-Sepharose FF como antes, en la descripción de la purificación de IFNa2b-IFNa5. La cromatografía DEAE usó un sistema de dos tampones: tampón A: Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, conductividad 243 µS/cm; y tampón B: Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,8, conductividad 84,4 mS/cm. La columna se equilibró con Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,05 M, pH 8,8, conductividad 7 mS/cm, 25 °C, 5 VC. La elución se realizó con Tris-HCl 20 mM, gradiente de NaCl 0,05 a 0,4 M, pH 8,8. Lavado: Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,05 M, pH 8,8, conductividad

7 mS/cm, 25 °C, 2 VC. La etapa de cromatografía final fue el uso de sorbente de hidroxiapatita tipo I CHT Ceramic. En esta cromatografía, el tampón A fue agua desionizada y el tampón B: H₃PO₄ 500 mM, pH 6,4. El equilibrado de la columna se realizó con H₃PO₄ 5 mM, pH 6,4. Las fracciones después de la cromatografía DEAE se diluyeron a una concentración final de fosfato 5 mM con tampón fosfato 500 mM (60:0,6), el pH se ajustó a pH 6,4. La desorción se realizó con gradiente de fosfato de 5 mM a 250 mM, pH 6,4. Las fracciones reunidas que contenían la fusión se añadieron a 1 parte (10:1 volumen) de tampón acetato concentrado (acetato 150 mM, NaCl 150 mM, pH 5,2), el pH se corrigió a 5,2 y la disolución se concentró usando filtros centrífugos de Millipore Ultracel (10MWCO). La disolución de proteína se filtró usando el filtro Mustang E y se separó en alícuotas en viales para 1 ml (concentración final 1,005 mg/ml) en entorno estéril (campana de flujo de aire laminar). Los viales se congelaron y se mantuvieron a -80 °C de temperatura. Se tomaron muestras para RP-, SEC-HPLC, proteína total y determinación de endotoxina.

El análisis consistió en métodos de control en el proceso (tales como SDS-PAGE, transferencia Western, RP-HPLC) y caracterización del producto final (tales como RP-HPLC, SE-HPLC, mapeo de péptidos y secuenciación de aminoácidos con espectrometría de masas TOF y actividad biológica).

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Esquema de clonación de homodímeros IFNA5-IFNA5

Hay varios inconvenientes en los esquemas de clonación regulares usados para la fusión génica cuando el objeto es el gen homodimérico. No pueden utilizarse diferentes propiedades del gen A y gen B en este caso particular, y la mayoría de las estrategias producirán la pérdida del fragmento de gen particular. En este ejemplo, se presenta el esquema de clonación (Fig. 1) y puede usarse para casos similares en fusiones de genes homodiméricos.

La preparación de gen IFNa5 para fusión como parte del extremo N consistió en varias etapas. Primera, amplificación génica con PCR, adición del sitio NdeI en su extremo 5' y eliminación del codón de terminación TAG de su extremo 3' (con los cebadores IFNA5-FOR-NDE e IFNA5-REV-(-parada)). Segunda, entonces se digirió el gen IFNA5/N amplificado y purificado con endonucleasa de restricción AclI, eliminando 22 pb del extremo 3' del gen. Se usó el sitio AclI para el ligamiento de extremos cohesivos con el gen IFNa5/C del extremo 3'.

La preparación del gen IFNa5 para la fusión como parte del extremo C consistió en la amplificación génica con PCR, adición del sitio HindIII en su extremo 3' y eliminación del codón de iniciación ATG de su extremo 5' (con los cebadores IFNA5-FOR-A5 e IFNA5-REV-HIND). Se añadió secuencia de 30 pb adicional con extremo 3' complementario de la secuencia del gen IFNa5/N en la dirección 5' del marco de lectura usando el mismo par de cebadores (véase la Tabla 4). Entonces se digirió el gen IFNa5/C amplificado y purificado con endonucleasa de restricción AclI. Su primera diana está en la secuencia de IFNa5/N añadida y la segunda diana está en su cola de 3'. Ambos genes digeridos por AclI se ligaron juntos con relaciones equimolares para obtener una construcción de gen fusionado, después de extraerla del gel de agarosa.

Tabla 3

Cebador	Secuencia (5'→3')	Sitio de endonucleasa de restricción	Tm
IFNA5-FOR-NDE	ATTATCATATGTGTGATCTGCCGCAGA	NdeI (CATATG)	63,9 °C
IFNA5-REV-(-parada)	TTCCTTACGACGTAAACGTTCTTGC	AclI (AACGTT)	60,8 °C
IFNa5-A5-FOR	TTCCTTACGACGTAAACGTTCTTGC TGTGATCTGCCGCAGA	AclI (AACGTT)	>75,0 °C
IFNa5-REV-HIND	GACGTAAACGTTCTTGCTAAAAGCTTTTAA	AclI, HindIII	>75,0 °C

Las secuencias subrayadas en la Tabla 4 son el sitio de reconocimiento y escisión NdeI para el cebador directo (CA[^]ATG) y HindIII para el inverso (A[^]AGCTT), se usaron sitios AclI (AA[^]ACGTT) para la conexión de genes. La secuencia en negrita tiene 24 bases que codifican el extremo del gen IFNa5/N añadido delante del gen IFNa5/C.

Después del ligamiento, si se eliminan concatámeros durante la etapa de selección de clones, se obtiene un producto génico fusionado que carece de 22 pb (7 aminoácidos y sin codón de parada). Para restaurar una secuencia completa, se realizó una segunda etapa que consiste en secuencia de digestión-ligamiento. Se digirió un plásmido pET21b+ que ya llevaba un gen IFNa5 con endonucleasa de restricción única dentro del gen IFNa5 - Bsu36I. Asimismo, también se digirió un ligado de IFNa5-AclI-IFNa5 con Bsu36I y se purificó un fragmento de gen interno de 500 pb del gel. El esqueleto de IFNa5/pET21b+ se liga entonces con el fragmento Bsu36I IFNa5-IFNa5 de 500 pb y se transforma en la cepa JM109 transitoria de *E. coli*. Como puede observarse en el esquema de clonación (Figura 1), esta vía recrea la longitud completa del dímero de gen con codones de inicio y parada. Se probaron adicionalmente clones positivos realizando análisis de patrones de restricción completos. Los clones confirmados

volvieron a transformarse en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* y se verificaron para su expresión, además de secuenciarse.

Ejemplo 2. Esquema de clonación de la construcción heterofusionada IFNA2B-IFNA5

- 5 La preparación de gen IFNa2b para la fusión consistió en amplificación génica con PCR, adición del sitio NdeI en su extremo 5' y eliminación del codón de terminación TAA de su extremo 3'. Esta PCR se realiza con cebadores IFNA2b-FOR-NDE e IFNa2B-REV-(-parada). El esquema de clonación se presenta en la Figura 2. Entonces se digirió el gen IFNA2b amplificado y purificado con la endonucleasa de restricción PstI, eliminando 10 pb del extremo 3' del gen. Se usó el sitio PstI para el ligamiento de extremos cohesivos con el gen IFNa5. Asimismo, la preparación de gen IFNa5 para fusión consistió en amplificación génica con PCR, adición del sitio HindIII en su extremo 3' del gen y un fragmento flanqueante de 22 pb de longitud del extremo del gen IFNa2b con la diana PstI (con los cebadores IFNa5-FOR-A2b e IFNa5-REV-HIND). El gen IFNa5 amplificado y purificado se digirió posteriormente con PstI diana en la secuencia de IFNa2b añadida.

Tabla 4

Cebador	Secuencia (5'→3')	Sitio de endonucleasa de restricción	Tm
IFNA2b-FOR-NDE	TTA <u>ACATATG</u> TGTGATCTGCCGCA	NdeI (CATATG)	61,8 °C
IFNa2B-REV-(-parada)	TTCCTTAGAACGCAGAGATTCCTGCAGGT T	PstI (CTGCAG)	67,0 °C
IFNa5-FOR-A2b	TTTCTGCAGGAATCTCTGCGTTCTAAGGA ATGTGATCTGCCGCAGACC	PstI (CTGCAG)	75,8 °C
IFNa5-REV-HIND	AATTAAGCTTTTATTCCTTACGAC	HindIII (AAGCTT)	51,3 °C

- 15 En la Tabla 5, las secuencias subrayadas son sitio de reconocimiento y escisión NdeI para el cebador directo (CA[^]TATG) y HindIII para el inverso (A[^]AGCTT), se usaron los sitios PstI (CTGCA[^]G) para la conexión de genes. La secuencia en negrita tiene 30 bases que codifican el extremo del gen IFNa2b añadido delante del gen IFNa5.

- 20 Se ligaron los productos digeridos por PstI junto con T4 ADN ligasa en relaciones equimolares. La mezcla resultante se purificó, cortando el fragmento de 1000 pb de longitud del gel. Este fragmento es de extremos romos y así se clonó en el vector intermedio pJET1.2 y posteriormente se clonó en la cepa JM109 de *E. coli*. Esta combinación de plásmido y cepa permitió obtener clones positivos en el plásmido pJET que luego se digirieron doblemente con NdeI-HindIII. El producto génico fusionado doblemente digerido se volvió a purificar con el kit de purificación por PCR y luego se preparó para clonar en el plásmido de expresión digerido y desfosforilado seleccionado pET21b+. La primera ronda de transformación de productos ligados se realizó en la cepa JM109 de *E. coli* para garantizar la estabilidad del clon. Después de la primera clonación, se comprobó el tamaño de la inserción digiriendo el ADN de plásmido con endonucleasas de restricción NdeI-HindIII. Se probaron adicionalmente clones positivos realizando análisis de patrones de restricción completos. Los clones confirmados volvieron a transformarse en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* y se verificaron para su nivel de expresión. Se secuenciaron los clones confirmados.

Ejemplo 3. Esquema de clonación de la construcción heterofusionada IFNA5-IFNA2B

- 30 La preparación de gen IFNa5 para la fusión consistió en amplificación génica con PCR, adición del sitio NdeI en su extremo 5' y eliminación del codón de terminación de su extremo 3' con cebadores IFNA5-FOR-NDE e IFNA5-REV-(-parada). Asimismo, la preparación de gen IFNa2b para la fusión consistió en amplificación génica con PCR, adición del HindIII sitio en su extremo 3' del gen y un fragmento flanqueante de 14 pb de longitud del gen IFNa5 (cebadores IFNa2b-FOR-A5 e IFNa2b-REV-HIND). En este caso, se realizó una PCR de solapamiento mediante la región de 14 pb indicada que produjo el producto génico fusionado. Los cebadores se presentan en la tabla a continuación.

Tabla 5

Cebador	Secuencia (5'→3')	Sitio de endonucleasa de restricción	Tm
IFNA5-FOR-NDE	ATTATCATATG <u>TGTGATCTGCCGC</u> AGA	NdeI (CATATG)	63,9 °C
IFNA5-REV-(-parada)	TTCCTTACGACGTAAACGTTCTTGC	AclI (AACGTT)	60,8 °C
IFNA2B-FOR-A5	TACGTCGTAAGGAATGTGATCGCCGCA	ninguno	68,9 °C

Cebador	Secuencia (5'→3')	Sitio de endonucleasa de restricción	Tm
IFNA2B-REV-HIND	AAAAAGCTTCTATTCCTTAGAAC	HindIII (AAGCTT)	50,2 °C

Se realizó PCR de solapamiento en dos etapas: una etapa de PCR de bajo rendimiento, cuando la reacción se realiza sin cebadores (la región de solapamiento actúa de donante de grupos 3'-OH libres) y solo están incluidos productos de PCR de IFNa5 y IFNa2b. Después de la extracción en gel del producto génico fusionado, se reamplifica usando los cebadores IFNA5-FOR-NDE e IFNA2B-REV-HIND. Después de esta segunda etapa de PCR, el producto se digiere con endonucleasas de restricción NdeI y HindIII y se clona en el plásmido de expresión digerido y desfosforilado pET21b+. La primera ronda de transformación de productos ligados se realizó en la cepa JM109 de *E. coli* para garantizar la estabilidad del clon. Después de la primera clonación, se comprobó el tamaño de la inserción digiriendo el ADN de plásmido con endonucleasas de restricción NdeI-HindIII. Se probaron adicionalmente clones positivos realizando análisis de patrones de restricción completos. Los clones confirmados volvieron a transformarse en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* y se verificaron para su nivel de expresión. Se secuenciaron los clones confirmados.

Ejemplo 4. Esquema de clonación de la construcción heterofusionada IFNa5-OSM

La preparación de gen IFNa5 para la fusión consistió en amplificación génica con PCR, adición del NdeI sitio en su extremo 5' y eliminación del codón de terminación TAG de su extremo 3' (con los cebadores IFNA5-FOR-NDE e IFNA5-REV-(-parada)). Entonces se digirió el gen IFNa5 amplificado y purificado con la endonucleasa de restricción AclI, eliminando los 10 pb del extremo 3' del gen. Se usó el sitio AclI para el ligamiento de extremos cohesivos con el gen OSM(196).

La preparación de gen OSM(196) para la fusión consistió en amplificación génica con PCR, adición del sitio HindIII en su extremo 3' del gen y un fragmento flanqueante de 22 pb de longitud del extremo de gen IFNa5 con AclI diana. Entonces se digirió el gen OSM(196) amplificado y purificado con AclI diana en la secuencia de IFNa5 añadida.

Tabla 6

Cebador	Secuencia (5'→3')	Sitio de endonucleasa de restricción	Tm
IFNA5-FOR-NDE	ATTATCATATGTGTGATCTGCCGCAGA	NdeI (CATATG)	63,9 °C
OSM-RSRR-REV-HIND	TTTAAGCTTCTATCTCCGGCTCCGGTT	HindIII (AAGCTT)	65,1 °C
IFNA5-REV-(-parada)	TTCCTTACGACGTAACGTTCTTGC	AclI (AACGTT)	60,8 °C
OSM-AAI-ACL	TTAACGTTTACGTCGTAAGGAAGCGGCTATAGGCAGCT	AclI (AAGCTT)	71,5 °C

Las secuencias subrayadas son sitio de reconocimiento y escisión NdeI para el cebador directo (CA[^]TATG) y HindIII para el inverso (A[^]AAGCTT), se usaron los sitios AclI (AA[^]CGTT) para la conexión de genes. La secuencia en negrita tiene 24 bases que codifican el extremo del gen IFNa5 añadido delante del gen OSM(196).

Se ligaron los productos digeridos por AclI junto con T4 ADN ligasa en relaciones equimolares. La mezcla resultante se purificó, cortando un fragmento de 1100 pb de longitud del gel de agarosa. La principal diferencia del Ejemplo 2 es que, debido a los diferentes tamaños de genes a fusionar, pueden separarse construcciones concataméricas (IFNa5-IFNa5 y OSM-OSM reflejadas) de la forma correcta. Así, no es necesaria la etapa de clonación de pJET1.2 intermedia y puede ser omitida. Se digirió el fragmento de ADN extraído del gel de agarosa con NdeI y HindIII y se clonó en un plásmido pET21b+ por consiguiente digerido y se transformó en la cepa JM109 de *E. coli*. Clones resistentes a ampicilina se sometieron a análisis del tamaño de la inserción. Se retransformaron clones seleccionados en cepas BL21(DE3) de *E. coli* y se realizó un análisis de patrones de restricción completos en su ADN de plásmido. Se secuenciaron los clones confirmados.

Ejemplo 5. Esquema de clonación de la construcción heterofusionada OSM-IFNa5

La preparación de gen OSM para la fusión consistió en amplificación génica con PCR, adición del sitio NdeI en su extremo 5' y eliminación del codón de terminación TAG de su extremo 3'. La amplificación del producto de PCR se realizó con el cebador directo OSM-FOR-NDE y el cebador inverso OSM-REV-(-parada). Entonces se digirió el gen OSM amplificado y purificado con endonucleasa de restricción BsaWI, eliminando 10 pb del extremo 3' del gen. Se usó el sitio BsaWI para el ligamiento de extremos cohesivos con el gen IFNa5.

La preparación de gen IFNa5 para la fusión consistió en amplificación génica con PCR, adición del sitio HindIII en su extremo 3' del gen y un fragmento flanqueante de 25 pb de longitud del extremo del gen OSM con BsaWI diana. La amplificación del producto de PCR se realizó con el cebador directo IFNA5-FOR-BSA y el cebador inverso IFNA5-REV-HIND. Entonces se digirió el gen IFNA5 amplificado y purificado con BsaWI diana en la secuencia de OSM añadida.

Tabla 7

Cebador	Secuencia (5'→3')	Sitio de endonucleasa de restricción	Tm
OSM-FOR-NDE	AAACATATGGCGGCTATAGGCAGC	NdeI (CATATG)	66,2 °C
OSM-REV-(-parada)	TCTCCGGCTCCGGITCGG	BsaWI (ACCGGA)	65,7 °C
IFNA5-FOR-BSA	AGAGCCCGAACCGGAGCCGGAGAT GTGATCTGCCGCAGA	BsaWI (ACCGGA)	>75 °C
IFNA5-REV-HIND	AATTAAGCTTTTATTCCTTACGAC	HindIII (AAGCTT)	51,3 °C

Se ligaron los productos digeridos por BsaWI junto con T4 ADN ligasa en relaciones equimolares. La mezcla resultante se purificó, cortando un fragmento de 1100 pb de longitud del gel de agarosa. El fragmento de ADN extraído del gel de agarosa se digirió con NdeI y HindIII y se clonó en un pET21b+ plásmido por consiguiente digerido y se transformó en la cepa JM109 de *E. coli*. Clones resistentes a ampicilina se sometieron a análisis del tamaño de la inserción. Se retransformaron clones seleccionados en cepas BL21(DE3) de *E. coli* y se realizó un análisis de patrones de restricción completos en su ADN de plásmido. Se secuenciaron los clones confirmados.

Ejemplo 6. BIOSÍNTESIS DE IFNA2B-IFNA5/PET21B+/E.COLI BL21(DE3) EN FERMENTADOR

En todos los casos estudiados, se realizó la biosíntesis de modo discontinuo de E.coliBL21(DE3)/pET21b+/IFNa2b-IFNa5 en un fermentador de 1,4 l de volumen de trabajo "Biostat M" a pH 6,8-7,0, pO₂ - 30 % con variables en línea automáticamente controladas (temperatura, agitación, pH, pO₂) y variable fuera de línea - densidad óptica (abr. DO, medida a 600 nm de longitud de onda con espectrofotómetro de Eppendorf).

Se usaron dos medios para el cultivo de células - M9 y M9m modificado. Composición del medio M9 (para la fermentación) (g/l): extracto de levadura - 20,0, cloruro de amonio - 5,0, sulfato de magnesio heptahidratado - 0,5, hidrogenofosfato de disodio - 4,7, dihidrogenofosfato de potasio - 4,5, glucosa monohidratada - 22. Composición del medio M9m (para el inóculo) (g/l): extracto de levadura - 10, cloruro de amonio - 1, sulfato de magnesio heptahidratado - 0,5, hidrogenofosfato de disodio - 6,6, dihidrogenofosfato de potasio - 2,7, glucosa monohidratada - 5. Composición del medio M9m (para la fermentación) (g/l): extracto de levadura - 20,0, cloruro de amonio - 5,0, sulfato de magnesio heptahidratado - 0,5, hidrogenofosfato de disodio - 7, dihidrogenofosfato de potasio - 6,8, glucosa monohidratada - 15.

La comparación de los procesos de fermentación en estos dos medios se presenta en la Tabla 8 a continuación y la Figura 4. Puede observarse que el medio M9 modificado es significativamente superior en todos los parámetros controlados cuando se compara con el medio M9. La duración inicial del experimento de biosíntesis fue 5,5 horas, con inducción en la 3ª hora de cultivo.

Tabla 8

Parámetros controlados	Medio M9	Medio M9m
Volumen de trabajo, l	1,4	1,4
Concentración de IPTG final, mM	0,5	0,5
Duración de la fermentación, h	5,5	5,5
Tiempo de inducción, h	3,0	3,0
Inducción a DO	1,5	8,9
DO final	2,9	23,9
Rendimiento de biomasa húmeda, g/l	4,6	39,3
Proteínas totales, mg/g de biomasa húmeda	86,6	99,6

Parámetros controlados	Medio M9	Medio M9m
IFNa2b-IFNa5, % de proteínas totales	66,0	62,5
IFNa2b-IFNa5, mg/g de biomasa (calculada según proteínas totales)	57,1	62,2
IFNa2b-IFNa5, mg/l de suspensión de células (según proteínas totales)	262,8	2445,9

Sin embargo, la duración de 5,5 horas de la biosíntesis produjo la disminución de la estabilidad del plásmido en la última hora del periodo (la estabilidad del plásmido fue solo del 60 % en el momento final). No se desea la acumulación de las células sin plásmido debido a que aumenta la carga de proteína durante la purificación. Para evitar este problema, se cambió el proceso de biosíntesis en los programas de tiempo – el punto de inducción se desplazó a la segunda hora de cultivo, dejando solo 2 horas de cultivo después de la inducción. La biosíntesis optimizada en medio M9m produjo los siguientes resultados en las analíticas de control del proceso:

Tabla 9

Parámetros controlados	Valor
Rendimiento de biomasa húmeda, g/l	28,5 ± 0,9
Proteínas totales, mg/g de biomasa húmeda	73,4 ± 7,6
IFNa2b-IFNa5, % de proteínas totales (SDS-PAGE)	65,1 ± 10,2
IFNa2b-IFNa5, mg/g de biomasa (calculada según proteínas totales)	47,7 ± 8,5
IFNa2b-IFNa5, mg/l de suspensión de células (según proteínas totales)	1364,1 ± 72,8

Ejemplo 7. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA FUSIÓN IFN ALFA-2B-IFN ALFA-5

Las etapas de purificación por cromatografía fueron del siguiente modo: cromatografía de interacción hidrófoba en Phenyl-Sepharose, adicionalmente cromatografía de intercambio catiónico e iónico; sin embargo, cada una de estas etapas también se ajustó apropiadamente con respecto al comportamiento de la proteína de fusión.

Para los fines de desarrollo del proceso, se usaron 10 g de biomasa como material de partida. Se suspendieron 10 g de biomasa en una disolución de tampón compuesta de 89,6 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M a pH 8,0, EDTA 2 mM y DTT 25 mM, 400 µl de PMSF 250 mM y 10 ml de 0,1 % TritonX-100. El valor de pH se ajusta a 7,5 añadiendo HCl 6 M. Las células se rompen con el sonicador de células Sonics Vibra durante 30 min con impulsos de 1 segundo - encendido, 2 segundos - apagado, con 40 % de potencia y a partir de aquí se separaron por centrifugación proteínas insolubles y solubles a 12000 rpm durante 30 min a +4 °C. Se lavan los cuerpos de inclusión dos veces con tampón-I frío (+4 °C) que contiene aditivos de NaCl 1 M y 0,1 % de polisorbato-80. Para el tercer lavado se usa tampón-II que contiene urea 6 M, y el procedimiento de lavado se acaba con un tampón-III. Después de cada ciclo de prelavado, los IB se suspendieron en 100 ml del tampón respectivo a una relación 10 ml de tampón para IB aislados de 1 g de biomasa y se centrifugaron. Composición de los tampones de lavado: tampón-I: Tris-HCl 10 mM, NaCl 1 M, 0,1 % de polisorbato-80, pH 7,4, tampón-II: Tris-HCl 10 mM, urea 6 M, pH 8,0, tampón-III: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Se suspendieron los cuerpos de inclusión prelavados en 60 ml de tampón Gly 25 mM/NaOH a pH 9,6 que contenía clorhidrato de guanidina 6 M (GdmCl); y DTT 20 mM. La solubilización se realizó por agitación continua durante 2 horas a +4 °C. Después de eso, el solubilizado de IB se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 min a +4 °C

En todos los casos estudiados, el replegamiento se realizó por 16x dilución total de disolución de IB. Para este fin, se vertieron 56 ml de disolución IB en tampón de replegamiento mezclando suavemente la disolución final durante la duración definida (40-120 horas) a +4 °C. El tampón de replegamiento estuvo compuesto de tampón glicina 25 mM/NaOH de valor de pH 9,6 que contenía NaCl 1,2 M, L-Arg 0,5 M, y par seleccionado de glutatión reducido/oxidado GSH/GSSG = 5,0 mM:0,25 mM.

La primera etapa de purificación por cromatografía fue cromatografía de fusión replegada sobre columna de Phenyl-Sepharose FF. Esta etapa de cromatografía está principalmente dedicada para la separación de proteína correctamente plegada de GdmCl residual (0,375 M) cuya presencia restringió las posibilidades de usar otro procedimiento de purificación por cromatografía convencional de proteínas recombinantes. Así, la disolución de la proteína de fusión después de la etapa de replegamiento se cargó sobre la columna de Phenyl-Sepharose FF en tampón Tris-HCl 20 mM a pH 8,2 que contenía NaCl 1,5 M y se eluyó de la columna con tampón Tris-HCl 10 mM a pH 9,2 sin sales añadidas. La proteína eluida se cromatografió adicionalmente sobre intercambiadores aniónicos. Aquí, los presentes inventores probaron medios de Q-Sepharose FF y el intercambiador aniónico DEAE-Sepharose FF. Para la tercera purificación por cromatografía se eligió la columna SP-Sepharose FF con pH 5,5. La fusión

recuperada de esta columna se dividió en dos partes, una de las cuales estaba en el sistema de tampón acetato y la otra se cambió de tampón a PBS y ambas partes de proteína se concentraron hasta 1 mg/ml, se esterilizaron por filtración y se separaron en alícuotas para la evaluación de la estabilidad durante la congelación a -80 °C y el ciclo de congelación-descongelación. Ambas formulaciones demostraron ser estables.

- 5 Los datos del espectrómetro de masas demostraron que la fusión compuesta de los componentes IFN alfa-2b y IFN alfa-5 contuvo la cadena de polipéptidos correcta conteniendo el extremo N la secuencia de IFN alfa-2b. La masa molecular determinada de la fusión está en buena concordancia con la masa molecular calculada. Ambos componentes de la fusión reconocieron anticuerpos específicos respectivos (Figura 5) como una indicación de que ambos componentes están correctamente plegados. En resumen, los datos presentados en este ejemplo demostraron que la fusión genética de IFN alfa-2b con IFN alfa-5 da la nueva entidad que puede producirse con atributos de calidad aceptables para los estudios de prueba de concepto.

Ejemplo 8. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE QUIMERAS POR SE-HPLC

Se determinó semicuantitativamente el nivel de monómero de quimera en la muestra purificada usando el método de SE-HPLC. No se llevaron a cabo preparaciones de muestras.

- 15 Se evaluó la cantidad de inyección de muestra según la media de absorción de la fracción de cromatografía. El pico principal de la quimera se identificó usando análisis de EM.

Detalles experimentales de SE-HPLC:

Fase móvil: A - Fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, cloruro sódico 0,4 M

Columna: Tosoh TSKgel30WXL 7,8 x 300 mm, tamaño de partícula 5 µm

- 20 Sistema de cromatografía: Sistema Alliance de HPLC, Waters

Longitud de onda de detección: 280 nm

Caudal: 1 ml/min

Los resultados de SE-HPLC de la proteína de fusión IFN α 2b-IFN α 5 purificada se presentan en la Fig. 6. Puede observarse de esta vista cromatográfica que un contenido monomérico de proteína de fusión es superior al 98 %.

Ejemplo 9. MAPEO DE PÉPTIDOS

- Se añadieron 25 µl de disolución de prueba (1 mg/ml) a tubo de ensayo de 200 µl con 2,8 µl de 1,0 mg/ml de disolución de tripsina. Se añadieron 1,6 µl de tampón fosfato de potasio 1,0 M, pH 8,0; luego 3,6 µl de agua y el contenido del tubo de ensayo se agitó minuciosamente. La centrifugación a 6000 rpm durante 5 segundos fue seguida de incubación de las disoluciones en Thermomixer Comfort a 37 °C de temperatura durante 18 horas. Después de la incubación se añadieron 100 µl de disolución 6,0 M de Gu-HCl al tubo de ensayo, seguido de la adición de 7 µl de disolución 1,0 M de DTT. El tubo de ensayo se puso en agua hirviendo durante 1 minuto, y luego se dejaron enfriar las muestras preparadas a la temperatura ambiente.

Tabla 10

Parámetro	Valor (notas)	
Detector de UV	Longitud de onda	214 nm
Temperatura	Columna	30 °C
	Almacenamiento de muestras	6 °C
Solvent Manager	Canal de fase móvil A	Fase móvil A (agua desionizada con 0,1 % de TFA)
	Canal de fase móvil B	Fase móvil B (acetonitrilo con 0,1 % de TFA)
	Caudal de fase móvil	1 ml/min

Tabla 11

Programa del sistema de HPLC				
N.º	Tiempo, min	A, %	B, %	Notas
1	0,01	100,0	0,0	Fuerte
2	8,00	100,0	0,0	Isocrático
3	68,00	40,0	60,0	Gradiente lineal
4	72,00	40,0	60,0	Isocrático
5	75,00	100,0	0,0	Gradiente lineal
6	90,00	100,0	0,0	Equilibrado
Columna de HPLC: Waters Symmetry 3000 C18 4,6 x 250 mm				

Los resultados del mapeo de péptidos se presentan en la Figura 8. De los cromatogramas de HPLC es obvio que una nueva entidad de proteína de fusión presenta todos los picos presentes en el mapeo de péptidos de sus componentes individuales.

Ejemplo 10. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PROTEÍNAS FUSIONADAS DE IFNA-5 SELECCIONADAS

Se obtuvieron células de carcinoma de cuello uterino negroide humano Hep2c y virus de la encefalomiocarditis murina (VEMC) de la colección ATCC. Se cultivaron células Hep2c en RPMI 1640 complementado con 10 % de suero de ternero neonatal inactivado por calor y 1,5 g/l de bicarbonato sódico. Las células se mantuvieron a una densidad de $(5-6) \times 10^5$ células. El VEMC se propagó en células L-929 de fibroblasto de ratón.

Se establecieron la actividad antiviral biológica de interferón alfa 5 y sus proteínas fusionadas realizando ensayo del efecto citopático (ECP) de VEMC. El virus se valoró por formación de placas en células Hep2c. Se describe el principio del método (Armstrong, 1971). Todas las diluciones virales se hicieron en medio RPMI 1640 complementado con 2 % de suero bovino fetal inactivado por calor. Se sembraron células Hep2c en una placa de 96 pocillos 1 día antes de la infección a una concentración de $5-6 \times 10^5$ células/ml; simultáneamente, las células se trataron por triplicado con 50 µl de medio de cultivo que contenía diversas concentraciones de preparaciones de IFNα quimérico. Después de la incubación a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 20-24 h, se infectaron Hep2c con 20 unidades formadoras de placa de VEMC. Se trataron pocillos de control con VEMC y Hep2c sin IFN, Hep2c solas y medio solo. Después de 24 h de incubación, los controles de virus deben mostrar del 90 al 100 % de ECP como se observa microscópicamente, y puede terminarse la incubación. Ocasionalmente, puede necesitarse una incubación más larga. Se aspiró el medio de cada pocillo, y las células se tiñeron con 0,05 % (peso/volumen en 20 % de etanol) de disolución de cristal violeta. Después de 30 min, se decantó la disolución de cristal violeta y los pocillos se aclararon suavemente con agua, se secaron y se añadió disolución de elución (50 % de etanol con 0,05 % de ácido acético). Se determinó la absorbancia de los pocillos teñidos con cristal violeta en un lector de microplacas (µQuant, BioTek) a 570 nm.

Se calculó la actividad biológica de las diversas preparaciones de IFNa5 basándose en el patrón internacional de interferón alfa-2b (derivado de ADN humano), producto de NIBSC N.º 95/566, 70000 UI/ampolla y se expresó en unidades internacionales (UI). Los controles (sin IFN, sin VEMC) fueron valores de protección asignados del 0 % y 100 %, respectivamente. Se puntuó el efecto de interferón en copas que tenían 50 % menos de degeneración que los controles de virus.

Los resultados del ensayo de reducción del efecto citopático generalmente se ajustaron a una curva de dosis-respuesta sigmoide, cuando la concentración de interferón (el logaritmo del recíproco de la dilución de interferón) se representó frente a la absorbancia de la tinción. La concentración de interferón (logaritmo recíproco de la dilución) se representó frente a la absorbancia de la tinción para la preparación de referencia de interferón calibrada en unidades internacionales y para las disoluciones de prueba de interferón. Usando la porción lineal de la curva, se calculó la concentración de interferón en la muestra comparando las respuestas para las disoluciones de prueba y de referencia. Se usó el programa estadístico PLA versión 2.0 para un ensayo de línea paralelo para los cálculos de potencia biológica de todas las muestras experimentales. Todos los cálculos se realizaron basándose en los resultados de prueba obtenidos por 2 días $\times$ 2 placas por día (valoración de disoluciones estándar y de prueba realizada por triplicado). Los resultados se presentan en la tabla a continuación. Puede observarse que las tres variantes fusionadas presentaron una actividad biológica que es característica de IFNa5.

Tabla 12

Preparación de interferón- α	Concentración, mg /ml	Bioactividad antiviral, $\times 10^8$ UI/mg
IFNa2b	8,11	1,77
IFNa5	8,79	0,72
Mezcla de IFNa5 y IFNa2b	8,45	1,24
IFNa2b-IFNa5	1,30	0,07
IFNa5-IFNa5	1,53	0,29
IFNa5-OSM	0,98	0,21

Además de la actividad biológica mantenida de proteínas IFNa5 fusionadas, se probaron proteínas fusionadas para actividad como agentes antivirales en ratas infectadas. En estos ensayos, una unidad se define como la cantidad de interferón requerida por mililitro para reducir el efecto citopático de la infección viral el 50 %. Por ejemplo, IFNa5 en suero de rata, se observan UI/ml durante 6 horas, con intervalo de 208 UI/ml después de 0,5 horas después de inyección a 61,22 UI/ml después de seis horas. La proteína fusionada IFNa2b-IFNa5 oscila de 191 UI/ml (0,5 h) a 54 UI/ml (6 h), y el homodímero IFNa5-IFNa5 se observa durante 2 horas más, hasta 8 horas, con actividad constante de 40-46 UI/ml durante todo el periodo de 0,5-8 horas probado.

De este estudio, los presentes inventores pueden ver que algunas de las proteínas fusionadas de IFNa5 tienen propiedades incluso mejores cuando se compara con IFNa5. Por ejemplo, IFNa2b-IFNa5 tiene la misma actividad antiviral en ratas aún cuando presente actividad biológica *in vitro* bastante baja. IFNa5-IFNa5 presenta acción antiviral prolongada en ratas.

Aplicabilidad industrial

En esta patente, los presentes inventores presentan una plataforma versátil para el tratamiento de infección viral y enfermedad cancerosa: proteínas fusionadas de IFNa5. Dependiendo de la citocina componente, estas proteínas pueden ser reclutadas para un tratamiento de enfermedad de amplio espectro, que incluye infecciones virales, enfermedades del hígado y cánceres. Una invención presentada cubre la entidad de métodos que son adecuados para clonar, cuantificar, purificar y formular una proteína que puede ser entonces usada para estudios basados en animales y ensayos preclínicos de amplio espectro.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UAB Biotechnologines farmacijos centras "BIOTECHPHARMA"

<120> PROTEÍNAS FUSIONADAS DE INTERFERÓN ALFA 5 CON OTRA CITOCINA Y UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LAS MISMAS

<130> 2830

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 333

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 657 788 T3

<400> 1

```

Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu
1          5          10          15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
          165          170          175

```

ES 2 657 788 T3

Ser Asn Arg Arg Thr Leu Met Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser
180 185 190

Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
195 200 205

Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu
210 215 220

His Glu Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser
225 230 235 240

Ser Ala Thr Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu
245 250 255

Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly
260 265 270

Val Glu Asp Thr Pro Leu Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg
275 280 285

Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser
290 295 300

Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser
305 310 315 320

Leu Ser Ala Asn Leu Gln Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
325 330

<210> 2

<211> 332

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
1 5 10 15

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

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

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

10

ES 2 657 788 T3

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
 65 70 75 80
 Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95
 Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
 100 105 110
 Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
 115 120 125
 Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140
 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Leu Arg Ser Lys Glu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser
 165 170 175
 Asn Arg Arg Thr Leu Met Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro
 180 185 190
 Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu
 195 200 205
 Phe Asp Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His
 210 215 220
 Glu Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
 225 230 235 240
 Ala Thr Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
 245 250 255
 Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly Val
 260 265 270
 Glu Asp Thr Pro Leu Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys
 275 280 285
 Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
 290 295 300
 Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Ala Asn Leu Gln Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 325 330

<210> 3

5

<211> 332

<212> PRT

ES 2 657 788 T3

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu
1          5          10          15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
165         170         175

Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
180         185         190

Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
195         200         205

```

ES 2 657 788 T3

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
 210 215 220

Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
 225 230 235 240

Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
 245 250 255

Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
 260 265 270

Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
 275 280 285

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
 290 295 300

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
 325 330

<210> 4

<211> 363

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

10

ES 2 657 788 T3

Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly Val Glu Asp Thr Pro Leu
 100 105 110
 Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
 115 120 125
 Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
 130 135 140
 Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ala Asn Leu Gln
 145 150 155 160
 Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu Ala Ala Ile Gly Ser Cys Ser Lys Glu
 165 170 175
 Tyr Arg Val Leu Leu Gly Gln Leu Gln Lys Gln Thr Asp Leu Met Gln
 180 185 190
 Asp Thr Ser Arg Leu Leu Asp Pro Tyr Ile Arg Ile Gln Gly Leu Asp
 195 200 205
 Val Pro Lys Leu Arg Glu His Cys Arg Glu Arg Pro Gly Ala Phe Pro
 210 215 220
 Ser Glu Glu Thr Leu Arg Gly Leu Gly Arg Arg Gly Phe Leu Gln Thr
 225 230 235 240
 Leu Asn Ala Thr Leu Gly Cys Val Leu His Arg Leu Ala Asp Leu Glu
 245 250 255
 Gln Arg Leu Pro Lys Ala Gln Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu Asn Ile
 260 265 270
 Glu Asp Leu Glu Lys Leu Gln Met Ala Arg Pro Asn Ile Leu Gly Leu
 275 280 285
 Arg Asn Asn Ile Tyr Cys Met Ala Gln Leu Leu Asp Asn Ser Asp Thr
 290 295 300
 Ala Glu Pro Thr Lys Ala Gly Arg Gly Ala Ser Gln Pro Pro Thr Pro
 305 310 315 320
 Thr Pro Ala Ser Asp Ala Phe Gln Arg Lys Leu Glu Gly Cys Arg Phe
 325 330 335
 Leu His Gly Tyr His Arg Phe Met His Ser Val Gly Arg Val Phe Ser
 340 345 350
 Lys Trp Gly Glu Ser Pro Asn Arg Ser Arg Arg
 355 360

<210> 5

5

<211> 363

ES 2 657 788 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

5

```

Met Ala Ala Ile Gly Ser Cys Ser Lys Glu Tyr Arg Val Leu Leu Gly
 1           5           10           15

Gln Leu Gln Lys Gln Thr Asp Leu Met Gln Asp Thr Ser Arg Leu Leu
      20           25           30

Asp Pro Tyr Ile Arg Ile Gln Gly Leu Asp Val Pro Lys Leu Arg Glu
      35           40           45

His Cys Arg Glu Arg Pro Gly Ala Phe Pro Ser Glu Glu Thr Leu Arg
 50           55           60

Gly Leu Gly Arg Arg Gly Phe Leu Gln Thr Leu Asn Ala Thr Leu Gly
65           70           75           80

Cys Val Leu His Arg Leu Ala Asp Leu Glu Gln Arg Leu Pro Lys Ala
      85           90           95

Gln Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu Asn Ile Glu Asp Leu Glu Lys Leu
      100          105          110

Gln Met Ala Arg Pro Asn Ile Leu Gly Leu Arg Asn Asn Ile Tyr Cys
      115          120          125

Met Ala Gln Leu Leu Asp Asn Ser Asp Thr Ala Glu Pro Thr Lys Ala
      130          135          140

Gly Arg Gly Ala Ser Gln Pro Pro Thr Pro Thr Pro Ala Ser Asp Ala
      145          150          155          160

Phe Gln Arg Lys Leu Glu Gly Cys Arg Phe Leu His Gly Tyr His Arg
      165          170          175

Phe Met His Ser Val Gly Arg Val Phe Ser Lys Trp Gly Glu Ser Pro
      180          185          190

Asn Arg Ser Arg Arg Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn

```

ES 2 657 788 T3

195	200	205
Arg Arg Thr Leu Met Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe 210 215 220		
Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe 225 230 235 240		
Asp Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu 245 250 255		
Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala 260 265 270		
Thr Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln 275 280 285		
Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly Val Glu 290 295 300		
Asp Thr Pro Leu Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys Tyr 305 310 315 320		
Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys 325 330 335		
Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser 340 345 350		
Ala Asn Leu Gln Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu 355 360		

<210> 6

<211> 1002

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante sintética

10

<400> 6

ES 2 657 788 T3

```

atgtgtgata tgcgcagac ccactccctg tctaaccgtc gtactctgat gatcatggca    60
cagatgggtc gtatctctcc tttctcctgc ctgaaggaca gacatgactt tggatttcct    120
caggaggagt ttgatggcaa ccagtccag aaggctcaag ccatctctgt cctccatgag    180
atgatccagc agaccttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctac ttgggatgag    240
acacttctag acaaattcta cactgaactt taccagcagc tgaatgacct ggaagcctgt    300
atgatgcagg aggttgaggt ggaagacact cctctgatga atgtggactc tatcctgact    360
gtgagaaaat actttcaaag aatcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt    420
gcatgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatccttct ctttatcagc aaacttgcaa    480
gaacgtttac gtctgaagga atgtgatctg ccgcagaccc actccctgtc taaccgtcgt    540
actctgatga tcatggcaca gatgggtcgt atctctcctt tctcctgcct gaaggacaga    600
catgactttg gatttcctca ggaggagttt gatggcaacc agttccagaa ggctcaagcc    660
atctctgtcc tccatgagat gatccagcag accttcaatc tottcagcac aaaggactca    720
tctgctactt gggatgagac acttctagac aaattctaca ctgaacttta ccagcagctg    780
aatgacctgg aagcctgtat gatgcaggag gttggagtgg aagacactcc tctgatgaat    840
gtggactcta tcctgactgt gagaaaatac tttcaaagaa tcaactctcta tctgacagag    900
aagaaataca gcccttgtgc atgggaggtt gtcagagcag aaatcatgag atccttctct    960
ttatcagcaa acttgcaaga acgtttacgt cgtaaggaat aa                        1002

```

<210> 7

5

<211> 999

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Secuencia codificante sintética

<400> 7

ES 2 657 788 T3

```

atgtgtgatac tgccgcagac ccactccctg tctaaccgtc gtactctgat gatcatggca      60
cagatgggtc gtatctctcc tttctcctgc ctgaaggaca gacatgactt tggatttcct      120
caggaggagt ttgatggcaa ccagttccag aaggctcaag ccatctctgt cctccatgag      180
atgatccagc agaccttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctac ttgggatgag      240
acacttctag acaaattcta cactgaactt taccagcagc tgaatgacct ggaagcctgt      300
atgatgcagg aggttggagt ggaagacact cctctgatga atgtggactc tatcctgact      360
gtgagaaaat actttcaaag aatcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt      420
gcatgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatccttct ctttatcagc aaacttgcaa      480
gaacgtttac gtctgaagga atgtgatctg ccgcagactc actctctggg ttctcgtcgt      540
actctgatgc tgctggctca gatgcgtcgt atctctcttt tctcttgctt gaaagaccgt      600
catgacttcg gtttcccgca ggaagagttc ggtaaccagt tccagaaagc tgaaactatc      660
cctgttctgc atgaaatgat ccagcaaatc ttcaacctgt tctctactaa agactcttct      720
gctgcttggg acgaaaccct gctggacaaa ttctacactg aactgtacca gcaactcaac      780
gacctcgagg ctgtgttat tcagggcggtt ggtgttaccg aaactccgct gatgaaagag      840
gatagcatcc tggtgttcg caagtatttc cagcgtatca ctctttacct gaaggaaaag      900
aagtatagcc cgtgtgcttg ggaagttggt cgtgctgaga tcatgcgttc cttctccctg      960
tctactaacc tgcaggaatc tctgcgttct aaggaatag      999

```

<210> 8

5

<211> 999

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Secuencia codificante sintética

<400> 8

ES 2 657 788 T3

```

atgtgtgata tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct      60
cagatgcgtc gtatctctct tttctcttgc ctgaaagacc gtcatactt cggtttcccg      120
caggaagagt tcggtaacca gttccagaaa gctgaaacta tccctgttct gcatgaaatg      180
atccagcaaa tcttcaacct gttctctact aaagactctt ctgctgcttg ggacgaaacc      240
ctgctggaca aattctacac tgaactgtac cagcaactca acgacctcga ggcttgtgtt      300
attcagggcg ttggtgttac cgaaactccg ctgatgaaag aggatagcat cctggctgtt      360
cgcaagtatt tccagcgtat cactctttac ctgaaggaaa agaagtatag cccgtgtgct      420
tggaagtgtg ttcgtgctga gatcatgcgt tccttctccc tgtctactaa cctgcaggaa      480
tctctgcgtt ctaaggaatg tgatctgccg cagaccact ccctgtctaa ccgtcgtact      540
ctgatgatca tggcacagat gggctgatat tctcctttct cctgcctgaa ggacagacat      600
gactttggat ttcctcagga ggagtgtgat ggcaaccagt tccagaaggc tcaagccatc      660
tctgtcctcc atgagatgat ccagcagacc ttcaatctct tcagcacaaa ggactcatct      720
gctacttggg atgagacact tctagacaaa ttctacactg aactttacca gcagctgaat      780
gacctggaag cctgtatgat gcaggagggt ggagtggaag acactcctct gatgaatgtg      840
gactctatcc tgactgtgag aaaatacttt caaagaatca ctctctatct gacagagaag      900
aaatacagcc cttgtgcatg ggaggttgtc agagcagaaa tcatgagatc cttctcttta      960
tcagcaaact tgcaagaacg ttacgtcgt aaggaataa      999

```

<210> 9

<211> 1092

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante sintética

10

<400> 9

```

atgtgtgata tgccgcagac ccactccctg tctaaccgtc gtactctgat gatcatggca      60
cagatgggtc gtatctctcc tttctcctgc ctgaaggaca gacatgactt tggatttcct      120
caggaggagt ttgatggcaa ccagttccag aaggetcaag ccatctctgt cctccatgag      180

```

ES 2 657 788 T3

```

atgatccagc agaccttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctac ttgggatgag      240
acacttctag acaaattcta cactgaactt taccagcagc tgaatgacct ggaagcctgt      300
atgatgcagg aggttggagt ggaagacact cctctgatga atgtggactc taccctgact      360
gtgagaaaat actttcaaag aatcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt      420
gcatgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatccttct ctttatcagc aaacttgcaa      480
gaacgtttac gtctgaagga agcggctata ggcagctgct cgaaagagta ccgcgtgctc      540
cttggccagc tccagaagca gacagatctc atgcaggaca ccagcagact cctggacccc      600
tatatacgta tccaaggcct ggatgttctt aaactgagag agcactgcag ggagcgcccc      660
ggggccttcc ccagtgagga gaccctgagg gggctgggca ggcggggctt cctgcagacc      720
ctcaatgcc aactgggctg cgtcctgcac agactggcgg acttagagca gcgcctcccc      780
aaggcccagg atttgagag gtctgggctg aacatcgagg acttgagaa gctgcagatg      840
gcgaggccga acatcctcgg gctcaggaac aacatctact gcatggccca gctgctggac      900
aactcagaca cggctgagcc cacgaagggt gccggggggg cctctcagcc gccaccccc      960
accctgcct cggatgcttt tcagcgcaag ctggagggct gcaggttctt gcatggctac     1020
catcgcttca tgcactcagt ggggcgggtc ttcagcaagt ggggggagag cccgaaccgg     1080
agccggagat aa                                                                1092

```

<210> 10

<211> 1092

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante sintética

10

<400> 10

ES 2 657 788 T3

```

atggcgggcta taggcagctg ctgaaagag taccgcgtgc tccttggcca gctccagaag      60
cagacagatc tcatgcagga caccagcaga ctccctggacc cctatatacg tatccaaggc      120
ctggatgttc ctaaactgag agagcactgc agggagcgcc ccggggcctt cccagtgag      180
gagaccctga gggggctggg caggcggggg ttccctgcaga ccctcaatgc cacactgggc      240
tgcgctctgc acagactggc cgacttagag cagcgcctcc ccaaggccca ggatttggag      300
aggtctgggc tgaacatcga ggacttggag aagctgcaga tggcgaggcc gaacatcctc      360
gggctcagga acaacatcta ctgcatggcc cagctgctgg acaactcaga cacggctgag      420
cccacgaagg ctggccgggg ggctctcag ccgccacccc ccaccctgc ctccgatgct      480
tttcagcgca agctggaggg ctgcaggttc ctgcatggct accatcgctt catgcaactca      540
gtggggcggg tcttcagcaa gtggggggag agcccgaacc ggagccggag atgtgatctg      600
ccgcagaccc actccctgtc taaccgtcgt actctgatga tcatggcaca gatgggtcgt      660
atctctcctt tctcctgcct gaaggacaga catgactttg gatttcctca ggaggagttt      720
gatggcaacc agttccagaa ggctcaagcc atctctgtcc tccatgagat gatccagcag      780
accttcaatc tcttcagcac aaaggactca tctgctactt gggatgagac acttctagac      840
aaattctaca ctgaacttta ccagcagctg aatgacctgg aagcctgtat gatgcaggag      900
gttgagtggt aagacactcc tctgatgaat gtggactcta tcctgactgt gagaaaatac      960
tttcaaagaa tcaactctta tctgacagag aagaaataca gcccttgtgc atgggagggt      1020
gtcagagcag aaatcatgag atccttctct ttatcagcaa acttgcaaga acgtttacgt      1080
cgtaaggaat aa                                                                1092

```

<210> 11

5

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Cebador sintético

<400> 11

attatcatatgtgtgatctgccgcaga 27

15

<210> 12

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

<400> 12

5 ttcttacgacgtaaacgttcttgc 25

<210> 13
 <211> 41
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

15 <400> 13
 ttcttacgacgtaaacgttcttgctgtgatctgccgcag a 41

<210> 14
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

25 <400> 14
 gacgtaaacgttcttgctaaaagctttaa 30

<210> 15
 30 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Cebador sintético

<400> 15

	ttaacatatgtgtgatctgccgca	24
	<210> 16	
	<211> 30	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
10	<400> 16	
	ttccttagaacgcagagattcctgcaggtt	30
	<210> 17	
15	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador sintético	
	<400> 17	
	tttctgcaggaatctctgcgttctaaggaatgtgatctgccgcagacc	48
25	<210> 18	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 18	
	tttaagcttctatctccggctccggtt	27
35	<210> 19	
	<211> 38	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador sintético

 <400> 19
 ttaacgtttacgtcgttaaggaagcggctataggcagct 38

 10 <210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 20
 aaacatatggcggctataggcagc 24
 20
 <210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 21
 30 tctccggctccggttcgg 18

 <210> 22
 <211> 39
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>

<223> Cebador sintético

<400> 22

agagcccggaaccggagccggagatgtgatctgccgcaga 39

5

<210> 23

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 23

15 tacgtcgtaaaggaatgtgatcgccgca 28

<210> 24

<211> 23

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

25 <400> 24

aaaaagcttctattccttagaac 23

REIVINDICACIONES

1. Proteína fusionada, que comprende un interferón alfa 5 (IFNa5), de una fórmula general (I) o (II)

IFNa5 - X

X - IFNa5

(I)

(II)

5 en las que el componente de fusión X es otro interferón alfa o citocina.

2. Proteína fusionada según la reivindicación 1, en la que IFNa5 es interferón alfa 5 recombinante humano y X está seleccionado del grupo que consiste en IFNa5, INFa2b y oncostatina.

3. Proteína fusionada según la reivindicación 1 o 2, que es el homodímero IFNa5-IFNa5 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o al menos el 95 % de secuencia idéntica.

10 4. Proteína fusionada según la reivindicación 1 o 2, que es el heterodímero IFNa2b-IFNa5 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o al menos el 95 % de secuencia idéntica.

5. Proteína fusionada según la reivindicación 1 o 2, que es el heterodímero IFNa5-IFNa2b con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o al menos el 95 % de secuencia idéntica.

15 6. Proteína fusionada según la reivindicación 1 o 2, que es el heterodímero IFNa5-OSM con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o al menos el 95 % de secuencia idéntica.

7. Proteína fusionada según la reivindicación 1 o 2, que es el heterodímero OSM-IFNa5, cuya secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o al menos el 95 % de secuencia idéntica.

8. Proteína fusionada según cualquier reivindicación de 1-7, que presenta una actividad biológica, característica de IFNa5 junto con velocidad de eliminación prolongada.

20 9. Fragmento de ADN que codifica proteína fusionada como se define en las reivindicaciones 1-8, en el que la secuencia codificante está seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o es la secuencia que codifica la misma proteína.

25 10. Vector que comprende el fragmento de ADN según la reivindicación 9, que codifica la proteína fusionada como se define en las reivindicaciones 1-8, en el que dicho vector está seleccionado del grupo que consiste en pET21b+, pET28a+, pUC57/T y pT7, preferentemente es pET21b+.

11. Un proceso de producción de una proteína fusionada como se define en las reivindicaciones 1-8 por expresión en una célula hospedadora apropiada, que comprende:

a) proporcionar la célula hospedadora, que produce dicha proteína fusionada de IFNa5;

30 b) cultivar células hospedadoras en condiciones eficaces para expresar dicha proteína fusionada de IFNa5 en un medio de fermentación adecuado;

c) aislar y purificar la proteína fusionada de IFNa5 expresada, caracterizado por que:

- dicho aislamiento es el aislamiento de la mezcla obtenida en la etapa b), que comprende la proteína fusionada diana en una forma de cuerpos de inclusión, sometiéndolos a solubilización y seguido de renaturalización por oxidación; y

35 - dicha purificación es el tratamiento cromatográfico de 3 etapas que comprende:

someter dicha mezcla que comprende proteína fusionada de IFNa5 renaturalizada a una cromatografía de interacción hidrófoba;

seguido de someter la disolución obtenida en la etapa previa a una cromatografía de intercambio aniónico;

y además someter la disolución obtenida en la etapa previa a una cromatografía de intercambio catiónico.

40 12. El proceso según la reivindicación 11, en el que la célula hospedadora está seleccionada del grupo que consiste en *E. coli*, *S. cerevisiae*, *K. lactis*, preferentemente *E. coli*, más preferentemente cepa deficiente en proteasa de *E. coli*, tal como BL21 y Rosetta gami-2 de *E. coli*, lo más preferentemente BL21 de *E. coli*, y en el que el medio de fermentación adecuado es cualquier medio complejo que contiene extracto de levadura como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono, preferentemente medio M9m.

45 13. El proceso según las reivindicaciones 11-12, en el que dichas condiciones eficaces para expresar dicha proteína fusionada de IFN comprende inducción, preferentemente con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido, preferentemente

IPTG a concentración de 0,1 mM a 1 mM, lo más preferentemente 0,5 mM, y la inducción se desplaza opcionalmente a la etapa de crecimiento temprana.

5 14. El proceso según las reivindicaciones 11-13, en el que dicha solubilización se realiza en disolución caotrópica y desnaturizante, que comprende urea 6-8 M o clorhidrato de guanidina 4-6 M, preferentemente clorhidrato de guanidina 6 M, opcionalmente con DTT 20 mM.

15. El proceso según las reivindicaciones 11-14, en el que dicha renaturalización oxidante se realiza en tampón glicina/NaOH a pH en el intervalo de 7,0 - 9,6 y par de glutatión reducido/oxidado GSH/GSSG en la relación 5-20:1 con aditivos de tamponamiento, seleccionados del grupo que comprende cloruro sódico, sulfato de sodio y sulfato de amonio.

10 16. El proceso según las reivindicaciones 11-15, en el que en dicha purificación cromatográfica de 3 etapas el sorbente de cromatografía de interacción hidrófoba está seleccionado del grupo que consiste en Butyl-Sepharose, Octyl-Sepharose, Phenyl-Sepharose, preferentemente Phenyl-Sepharose en el intervalo de pH de 8,2-9,2;

15 el sorbente de cromatografía de intercambio aniónico está seleccionado del grupo que consiste en ANX Sepharose, Q-Sepharose, DEAE-Sepharose, QAE-Sepharose, preferentemente Q-Sepharose o DEAE-Sepharose en el intervalo de pH de 8,6-9,0; y

el sorbente de cromatografía de intercambio catiónico está seleccionado del grupo que consiste en S-Sepharose, SP-Sepharose y CM-Sepharose, preferentemente SP-Sepharose o CM-Sepharose en el intervalo de pH de 5,2-5,6.

17. Proteína fusionada como se define en las reivindicaciones 1-7, obtenida por el proceso según las reivindicaciones 11-16.

20 18. Preparación, que comprende la proteína fusionada según la reivindicación 17 en forma de disolución estable.

19. Proteína fusionada según la reivindicación 17 o preparación según la reivindicación 18 para su uso en terapia.

20. Composición farmacéutica, que comprende cantidad terapéuticamente eficaz de proteína fusionada según las reivindicaciones 1-8 o 17 o preparación según la reivindicación 18, y vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente y/o sustancias auxiliares.

25

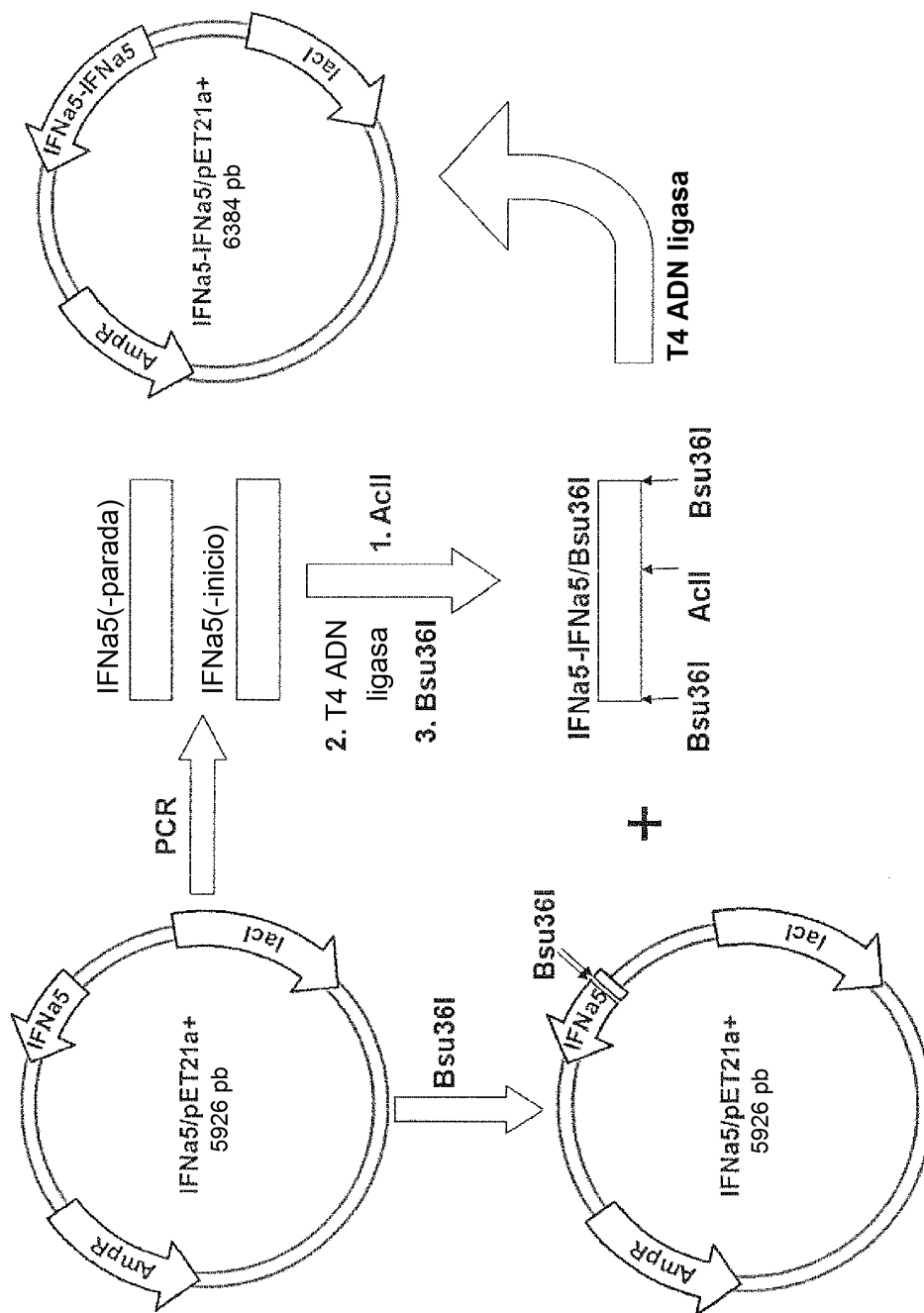


Fig. 1

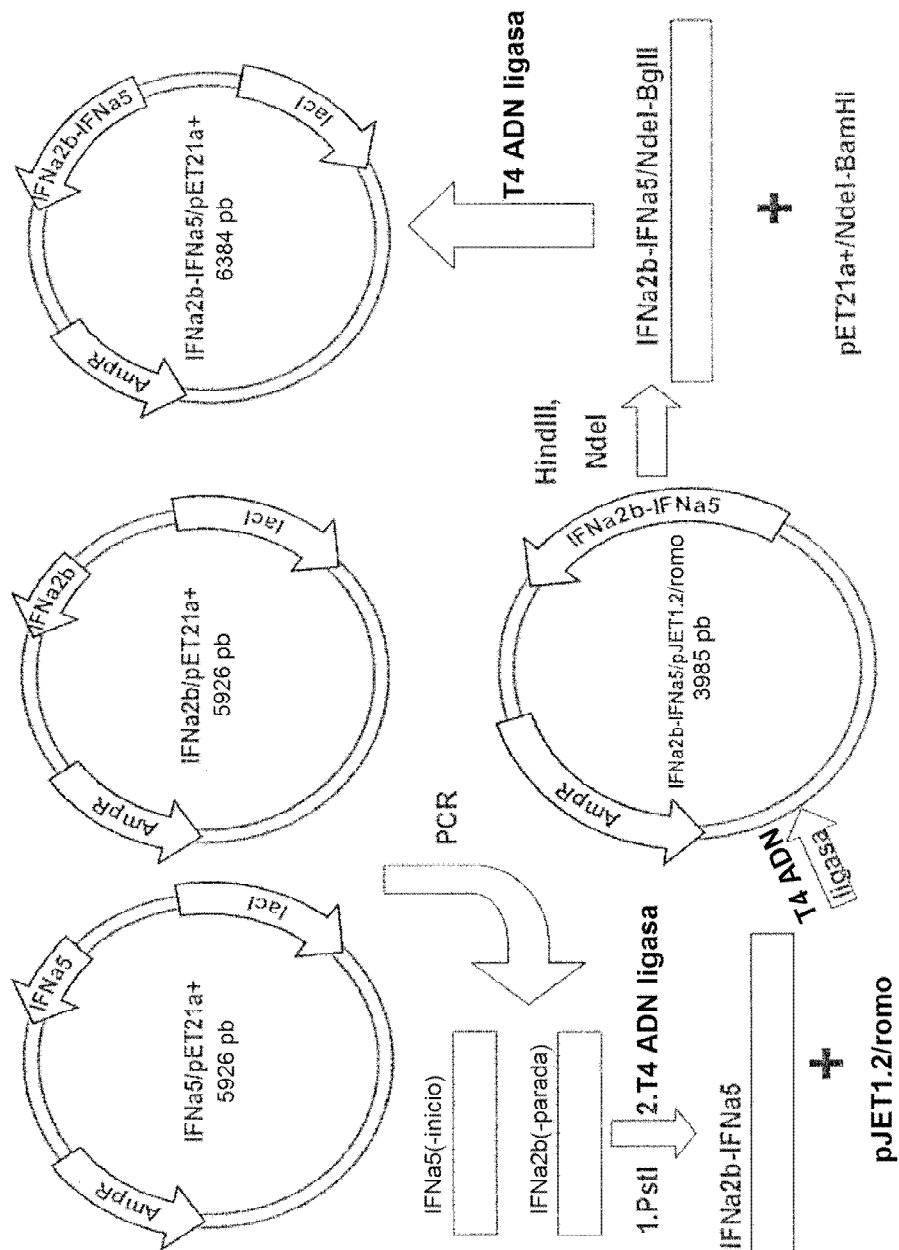


Fig. 2

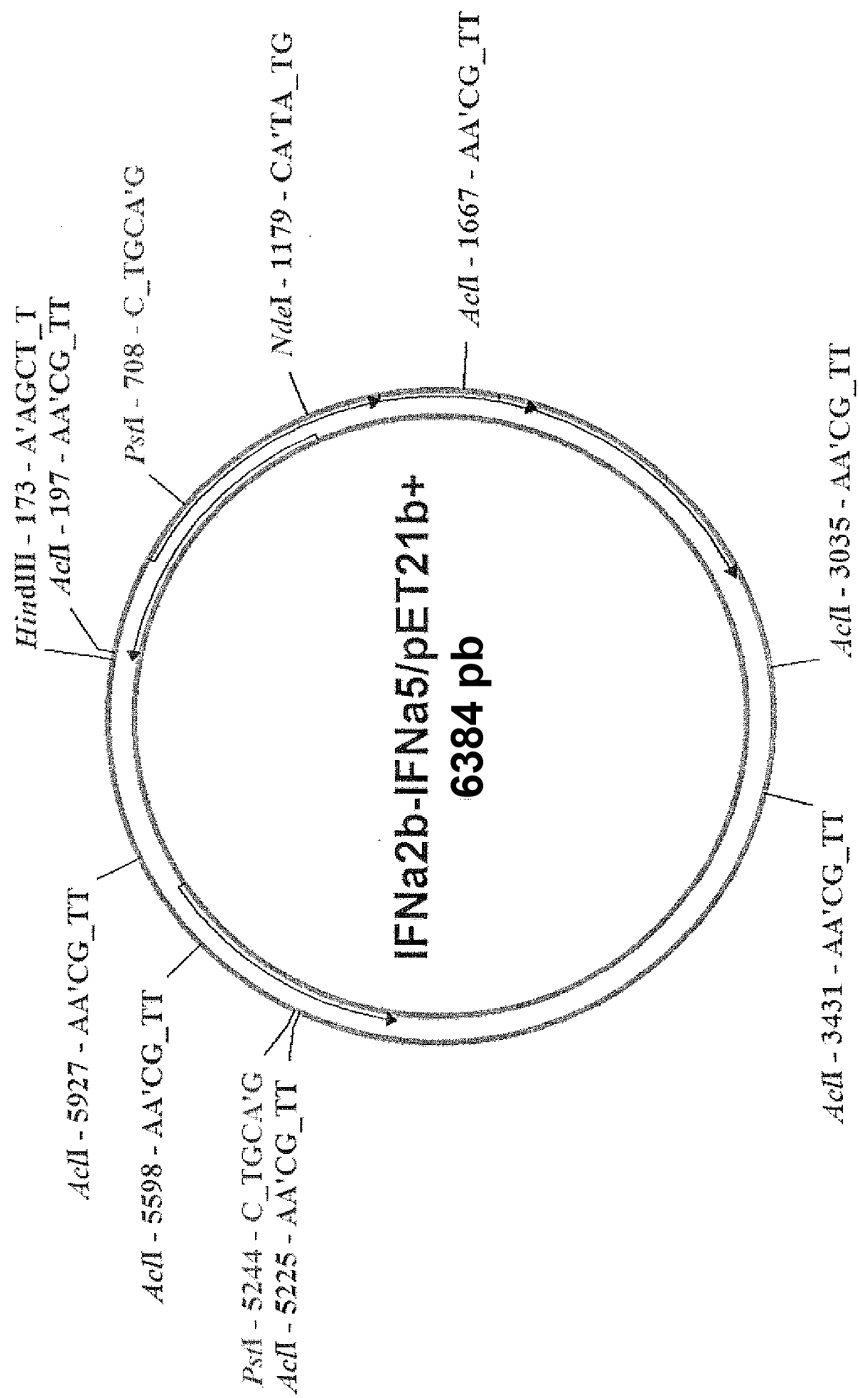


Fig. 3

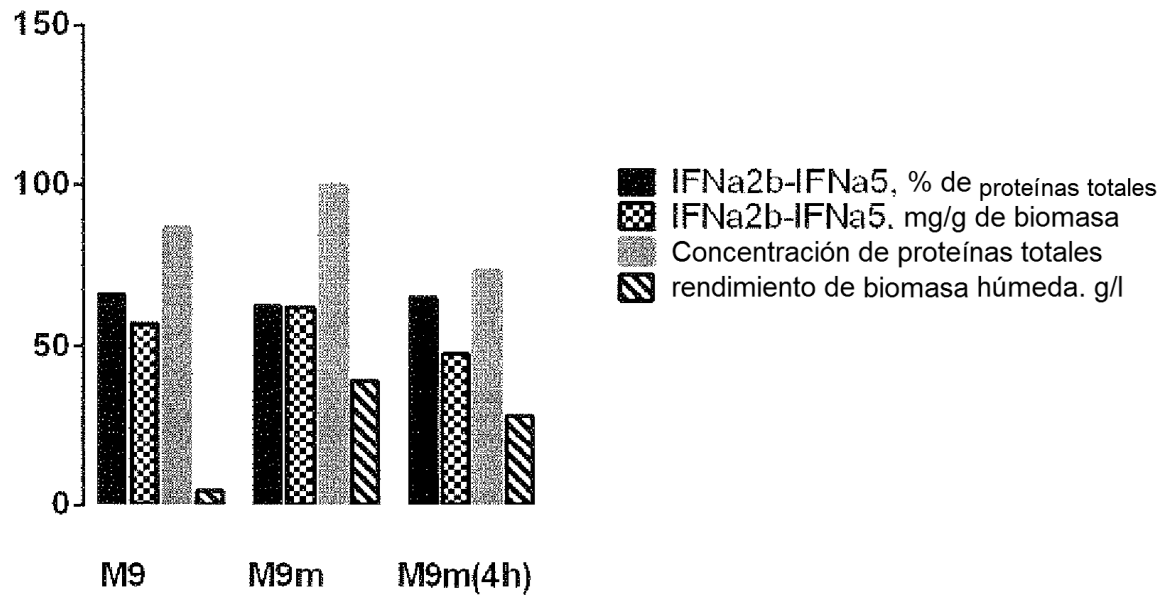
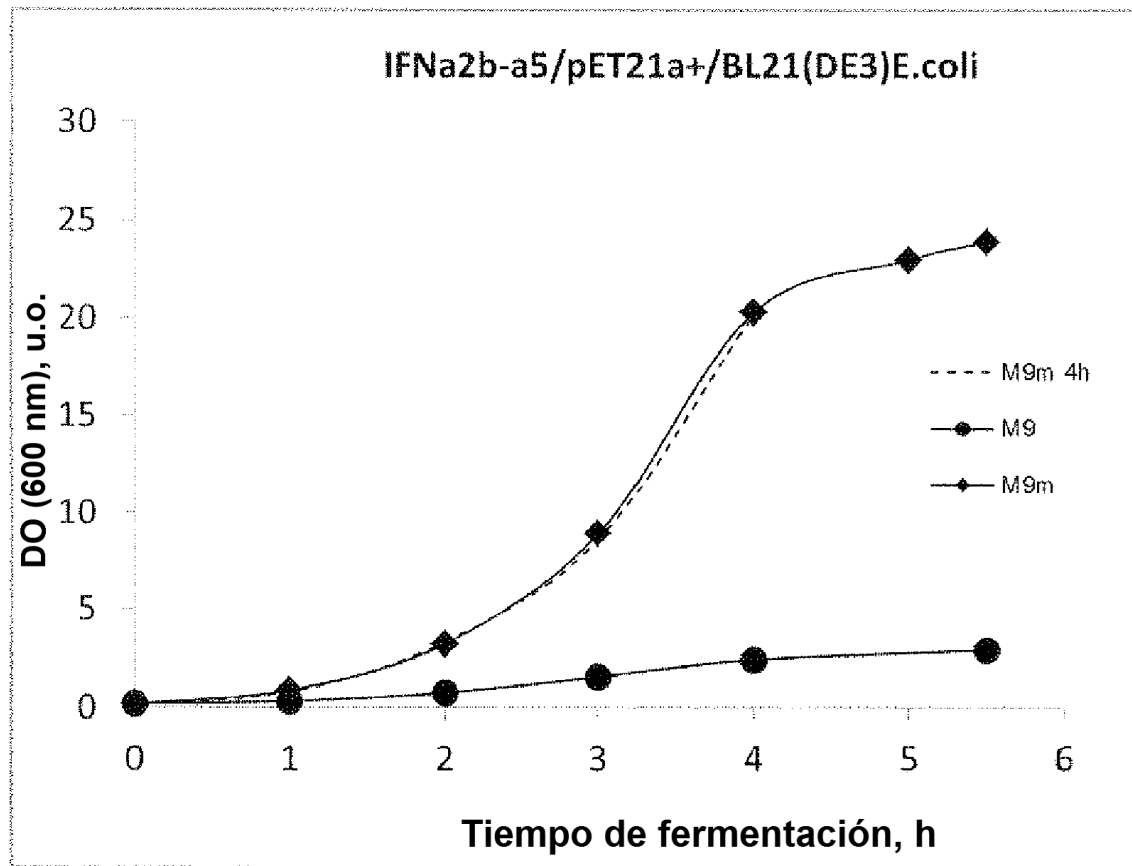


Fig. 4

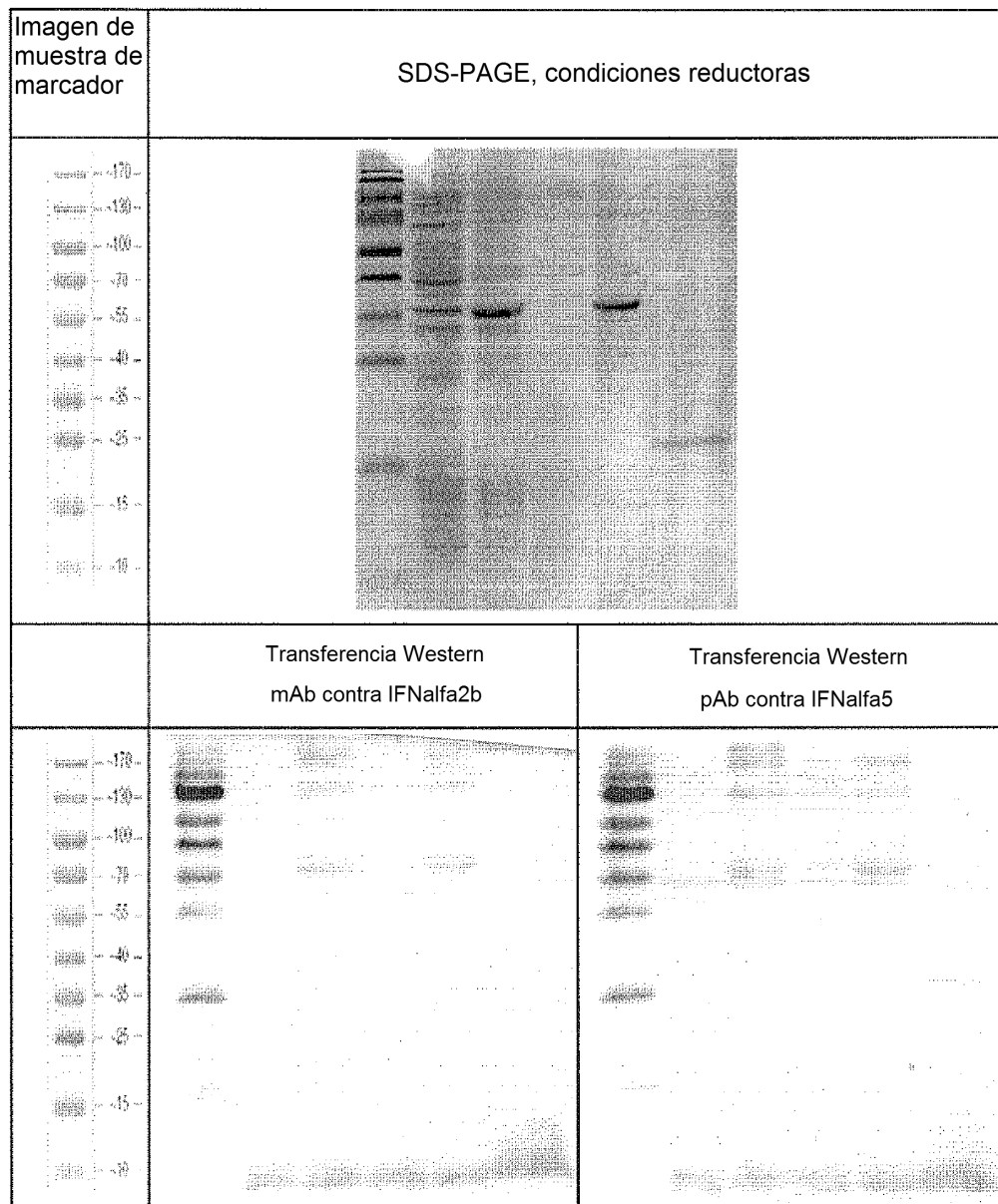


Fig. 5

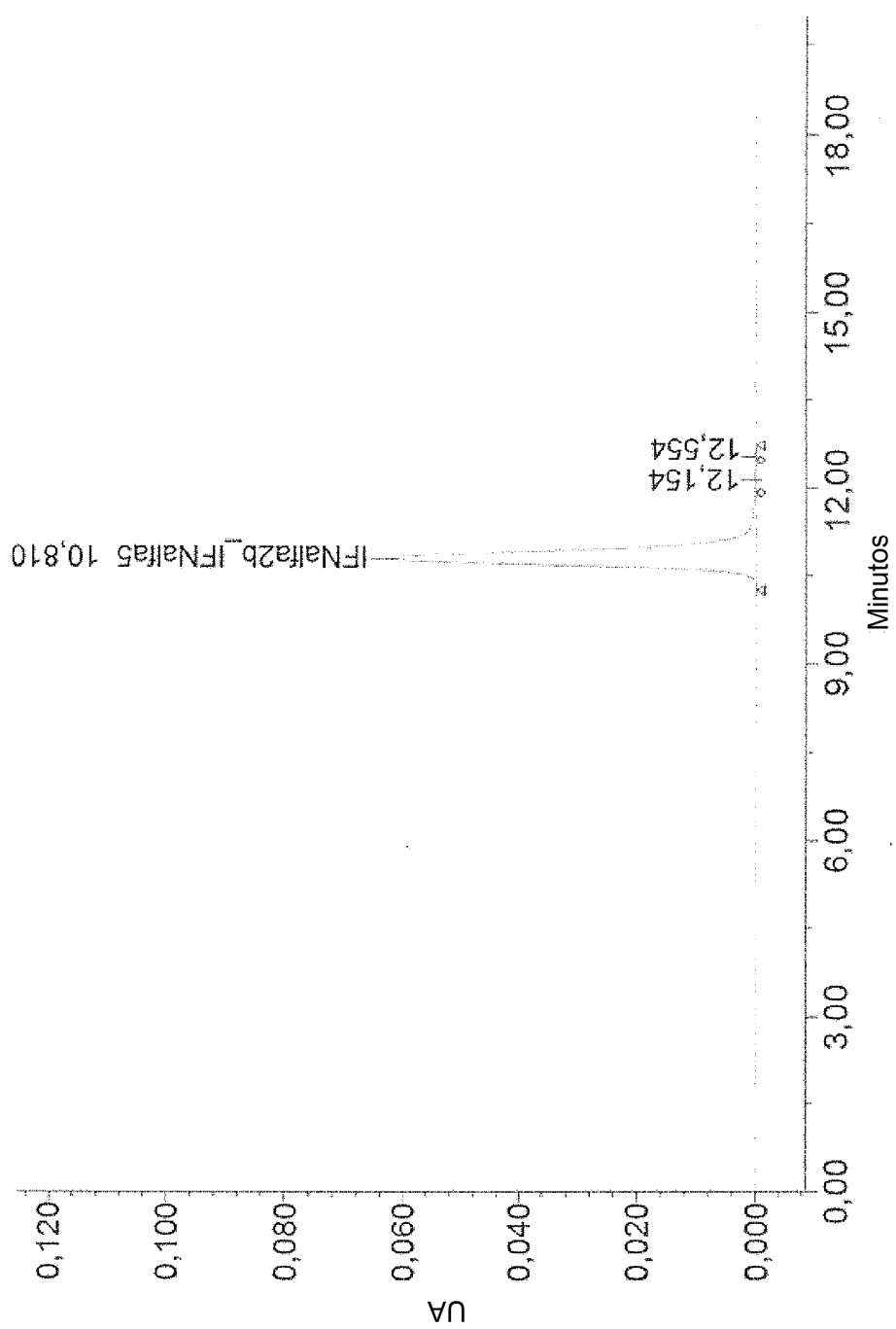


Fig. 6

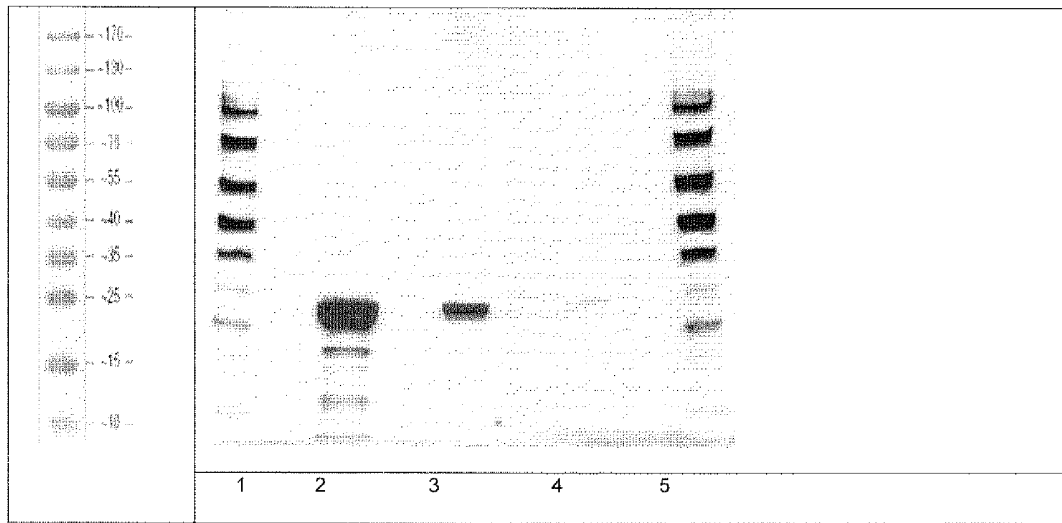


Fig. 7

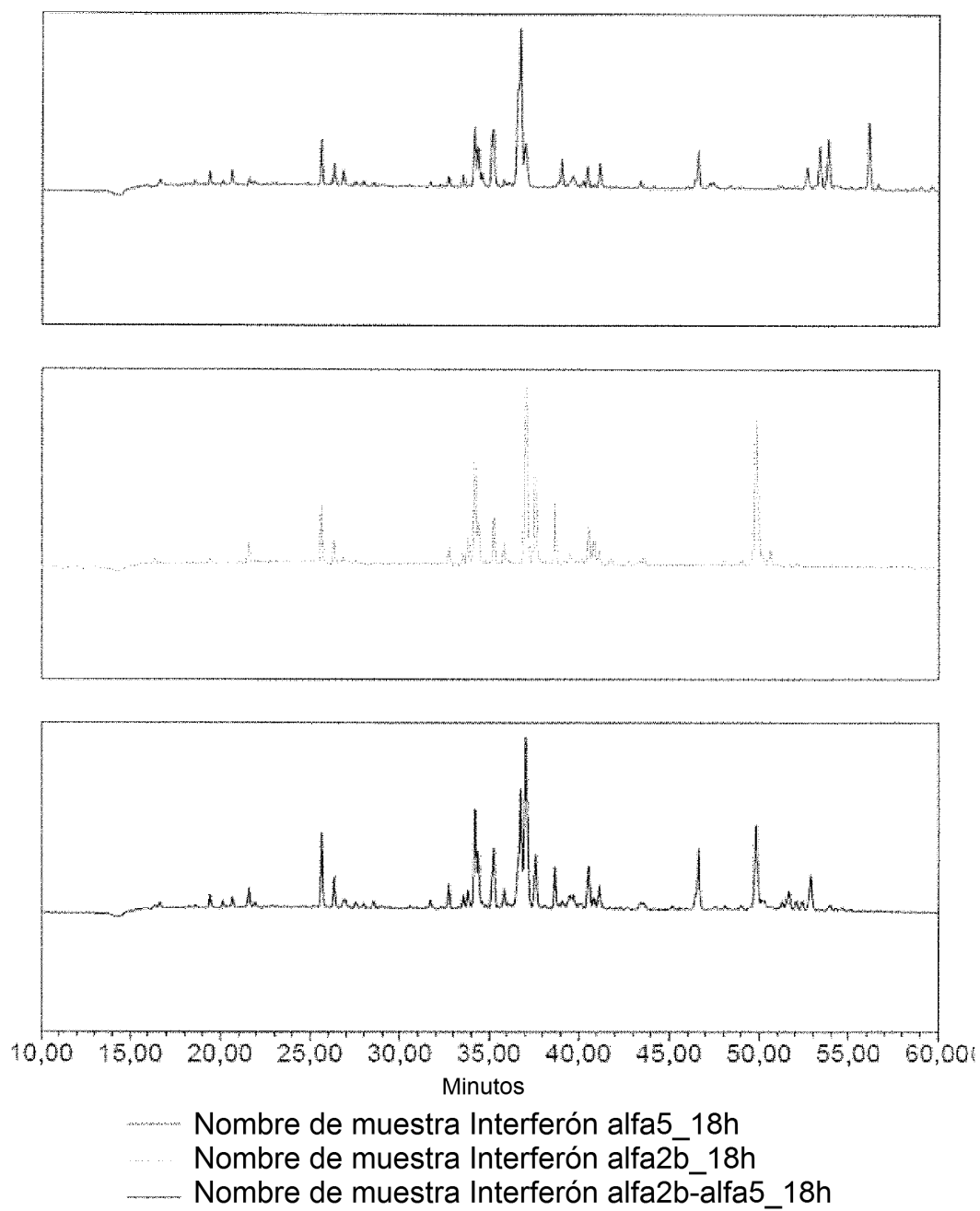


Fig. 8