

B.T



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No.

06-121175

54 TÍTULO "POLIPEPTIDOS DE INTERFERON-ALFA Y
CONJUGADOS"

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 14/555
A61K 38/21

71 SOLICITANTE MAXYGEN, INC. y F. HOFFMANN-LA
ROCHE AG

DOMICILIO REDWOOD CITY, ESTADO DE CALIFORNIA, ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA Y BASILEA, SUIZA.

74 APODERADO ALICIA MORENO RICAURTE T.P. 53.215.

22 BOGOTÁ, D. C., 30 NOV 2006.

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 08-121175- UNOUN-0000

Fec: 2005-11-30 17:38:14 Dep. 2020 NUECREACIONES

Trá. 11 PATENTE/II

ve: 579 FASE NACIONAL

Act 411 PRESENTACION

Folios: 429

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

19/12/06

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: MAXYGEN, INC. y F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

Dirección: 515 Galveston Drive, Redwood City, CA 94063, Estados Unidos de América y 124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basilea, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Redwood City, Estado de California, Estados Unidos de América y Basilea, Suiza

Lugar de Constitución: Suiza.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLORED RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: PATTEN Philip A.; VISWANATHAN Sridhar; NISSEN, Torben Lauvegaard; VOGT Anna; KROPSHOFER Harald; SCHUMACHER Ralf; FISCHER Stephan; SEEGER Stefan; GROSSMANN Adelbert; HESSE Friederike; SCHAUBMAR Andreas; FALKENSTEIN Roberto; KOLL Hans y DEMBOWSKI Markus

Dirección: 281 La Cuesta Drive, Portola Valley, CA 94028; 234 Leland Avenue, Menlo Park, CA 94025; 18 Henry Street, San Francisco, CA 94114; Hangstrasse 4, 79539 Loerrach; Hangstrasse 4, 79539 Loerrach; Hochfeldstrasse 78, 82377 Penzberg; Jakobfeldweg 11, 82368 Polling; Saalanger 34, 82377 Penzberg; Helmgartenstrasse 1, 82436 Egling; Genghoferstrasse 23, D-80339 Muenchen; Reindl 38, 82377 Penzberg; West-Witt-Strasse 5, 80689 Muenchen; Blumenanger 42, 85247 Oberoth y Scheffhauserstr. 18, 81478 Muenchen

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Alemania.

⑤

PCT (88)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/017471Fecha: 18/05/05Publicación Internacional No. WO 2005/113592 A2Fecha: 01/12/05

⑥

Título (54)

"POLIPEPTIDOS DE INTERFERON-ALFA Y CONJUGADOS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 14/555

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

19/05/04

(31) Número de Solicitud

60/572,504

⑨

Comprobante de Pago No. 08 - 72.315Fecha: 19/09/06

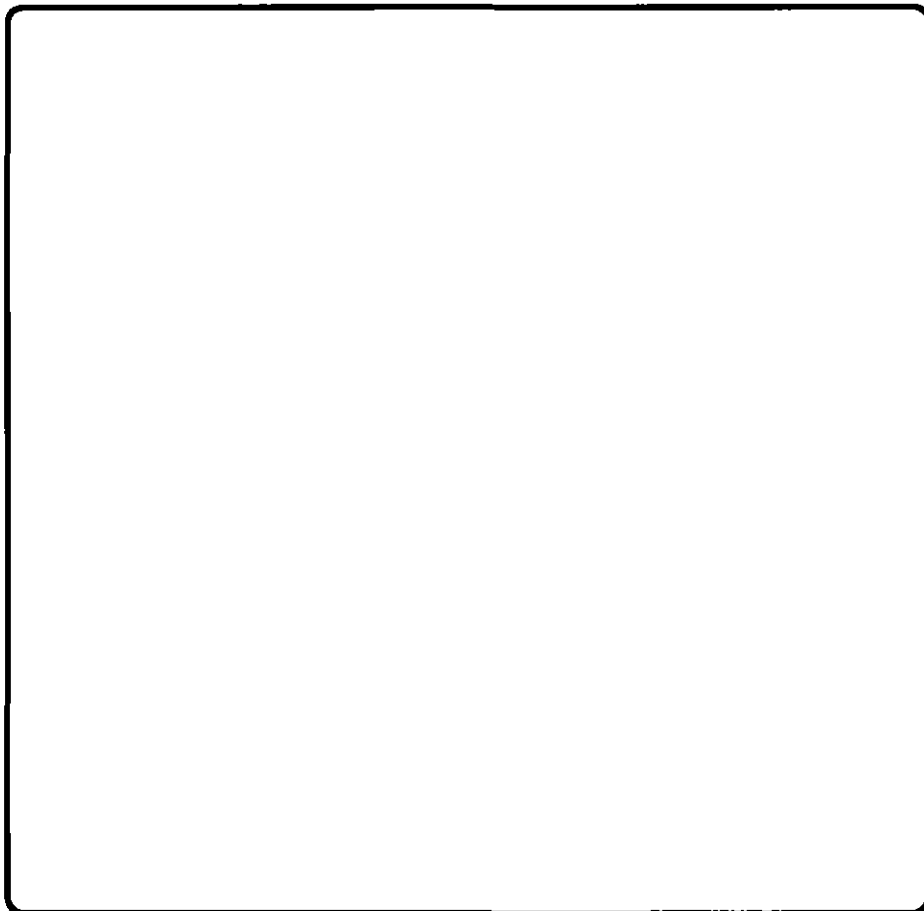
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal (F. Hoffmann-La Roche AG)
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, listado de secuencias y dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción y opinión escrita con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

[Handwritten signature]

C.C. 39.690.713 T.P. 53.215

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado:

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

10. Firma

Cancillería de Estado

Fdo.: firma ilegible

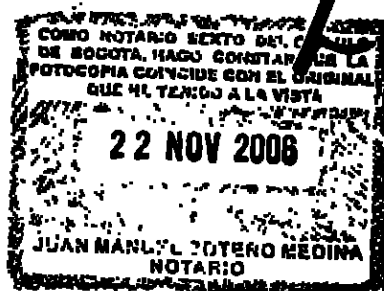
de la ciudad de Basel (Basilea)

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004

Maria Mercedes Uricoechea
Maria Mercedes Uricoechea T.
Traductora Juramentada
Resolución 10607/81 Minjusticia



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2004 SET - 3 P 12:12
JCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258651
Hanga Uncochea
COTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCUITO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE ME FUE PRESENTADO A LA VISTA
22 NOV 2006
JUAN MANUEL EOTEKU MEDINA
NOTARIO

22-11-2006
Abaixo firmados, F.H. FFMANN-LA ROCHE AG, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en 4070 Basilea, Suiza

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; Instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

5
The undersigned, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at 4070 Basel, Switzerland

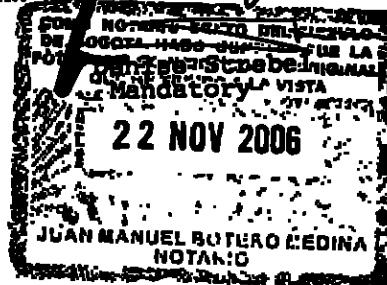
hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short; with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 11th day of August 2006.
F. Hoffmann-La Roche AG


Fridolin Klausner
Holder of procuration



ARTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

61

Sulza
Basilea

(ss

Hoy 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Strebel a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien oportunamente juramentado declaró y dijo que él es titular del poder/mo ndatario de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Sulza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Sulza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Sulza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de Incorporación firmados en Sulza, ciudad de Basilea, con fecha 19 JUNIO 1997, y verifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

Switzerland
Basel

(ss

On this 17th day of August 2004 personally Fridolin Klausner and Denise Strebel came both Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Sulza, ciudad de Basilea, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

Dr. P. Kuster
Notar

17.08.2004
2 Fr.
Dr. PETER KUSTER

Allg. Prot. No. 20

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel

COMO NOTARIO PERTO DR. CINCULO
DE JUOOTA. NAU CON TAR CUE LA
FOTOCUP A CCHITT CUN EL NOTARIAL
UN AL. N. P. L. V. 1997
2 NOV 2006
JUAN MANUEL BOIERO MEDINA
NOTARIO

OFFICIAL AUTHENTICATION
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by *P. Vullioud*

3. in his/her function as *Att. Not. Cant.*

4. and certified by the seal of the *Canton*

Certified **18. Aug. 2004**

5. in Basel (Bâle)

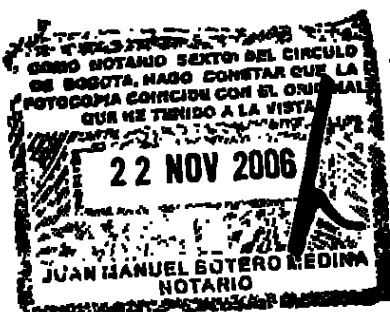
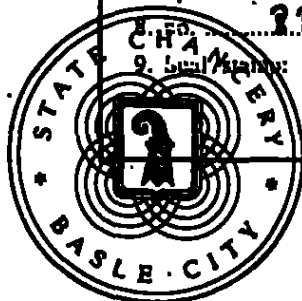
6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. No. **2235 / 113 776**

9. Seal/Stamp:

10. Signature: *P. Vullioud*



folios 849
Tarjetas temáticas

7

PC Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:	06-121175	(51) Int Cl:	C07K 14/555
(22) Fecha de solicitud:	30-11-08	(71) Solicitante(s)	MAXYGEN, INC. y F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/572,504	19-05-04	US
(72) Inventor(es)	PATTEN Phillip A.; VISWANATHAN Sridhar; NISSEN, Torben Lauvsgeard; VOGT Anne; KROPSHOFFER Harald; SCHUMACHER Ralf; FISCHER Stephan; SEEGER Stefan; GROSSMANN Adelbert; HESSE Friederike; SCHAUBMAR Andreas; FALKENSTEIN Roberto; KOLL Hans y DEMBOWSKI Markus		
(74) Apoderado:	ALICIA LLOREDA RICAURTE		
(85) Fecha limite inicio fase nacional:	19-12-06		
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT			
Fecha de presentación de la solicitud:	18-05-05		
No. de solicitud PCT/US2005/017471			
(87) Publicación Internacional			
Fecha:	01-12-05		
N° publicación:	WO 2005/113592 A2		
(54) Título:	POLIPEPTIDOS DE INTERFERON-ALFA Y CONJUGADOS		

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir del SEQ ID NO: 1 y (b) comprende una o más sustituciones en relación con SEQ ID NO: 1 seleccionada a partir del grupo que consiste de F48A/L; V51P; F55A; F65A; F68P; L111A; y V114P; dicho polipéptido exhibe actividad antiviral.

7

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

8

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente 0280.310WO	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/US2005/017471	Fecha de registro internacional (día/mes/año) (18.05.2005)	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) (19.05.2004)
Solicitante MAXYGEN, INC.		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 7 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó,

☐ una traducción de la solicitud internacional al _____, el cual es el idioma de la traducción presentada para la búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b))

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Recuadro No. I.

2. ☒ Ciertas referencias no pudieron localizarse (Ver Recuadro II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Recuadro III).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. ____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención-

b. ☒ Ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

10

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2005/017471

Casilla No. I Nucleótido y/o secuencia aminoácido (s) (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☒ contenido en la solicitud internacional según se registró
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda.

2. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

**Solicitud Internacional No.
PCT/US2005/017471**

A. CLASIFICACION DE MATERIA

C07K14/56 C12O1/68 C07H21/04 C07K14/555 C12P21/02

A61K38/21

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

C07K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, Dato WPI, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Búsqueda de secuencia

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
P,Y,	WO 2004/046365 A (MAXYGEN, INC; PATTEN, PHILLIP, A.; GOVINDARAJAN, SRIDHAR; VISWANATHAN,) 3 de Junio de 2004 (2004-06-03) reivindicaciones; figuras; ejemplos	1-79
Y	WO 01/25438 A (MAXYGEN, INC; HEINRICHS, VOLKER; CHEN, TEDDY; PATTEN, PHILLIP, A) 12 de Abril de 2001 (2001-04-12) reivindicaciones; figuras; ejemplos	1-79
Y	WO 00/52153 A (MAXYGEN, INC; HOWARD, RUSSELL, J; PATTEN, PHILLIP, A) 8 de Septiembre de 2000 (2000-09-08) figures; ejemplo 1	1-79
	-/-	

☒ En el recuadro C se enumerarán más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

E documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

"L" documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra creación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

T documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención.

"X" documento de relevancia particular; la invención reivindicada no pueda considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

Y documento de relevancia particular, la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica.

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

23 de Enero de 2006

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

13/02/2006

Nombre y dirección del correo de ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax No. (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Sommer, B

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/US2005/017471**C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	BAILON P Y SUS COL: "Diseño racional de una forma potente y de larga duración de interferón: Un interferón alfa-2a polietilenglicol conjugado ramificado de 40kDa para el tratamiento de la hepatitis C" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 12, No. 2, Marzo de 2001 (2001-03), páginas 195-202, XP002264676 ISSN: 1043-1802 resumen; resultados; discusión; —	27-48, 64-79

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/US2005/017471**Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del punto 2 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

Aunque las reivindicaciones 70-73 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/ la composición.
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones No.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Norma 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

ver hoja adicional

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☒ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

- Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante y, donde aplique, el pago de derechos de protesta.
- ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante pero el derecho de la protesta del solicitante no se pagó dentro del límite de tiempo especificado en la invitación.
- ☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION DE PCT/ISA/210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

1. Reivindicaciones: 1-7 (todas totalmente), 8-11, 24-40, 44, 46-51, 54-79 (todas parcialmente)

Un polipéptido que comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID No. 1 y (b) comprende una o más sustituciones seleccionadas de F48A/L, V51P, F55A, F65A, F68P, L111A y V114P, y el polipéptido exhibe actividad antiviral así como materia objeto relacionada al mismo;

2. Reivindicaciones: 8-11, 24-40, 44, 46-51, 54-79 (todas parcialmente)

Un polipéptido que comprende una secuencia que (a) difiere en 0 a 16 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID No. 13 y (b) comprende una o más de A/L48, P51, A55, A65, P68, A111 y P114 y el polipéptido exhibe actividad antiviral así como materia objeto relacionada al mismo;

3. Reivindicaciones: 12-19 (todas completamente); 20-37, 41-43, 45, 46-49, 52-79 (todas parcialmente)

Un polipéptido que comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos de la SEQ ID No. 36 y (b) comprende una o más sustituciones seleccionadas de M21A, I24P, F48A/L, F51P, S55A, F65A, F68P, F90A, M93P, L111A, V114P, F124A, I127P y E160D y el polipéptido exhibe actividad antiviral así como materia objeto relacionada al mismo;

4. Reivindicaciones: 20-37, 41-43, 45, 46-49, 52-79 (todas parcialmente)

Un polipéptido que comprende una secuencia que (a) difiere en 0 a 16 posiciones de aminoácidos de la SEQ. ID No. 38 y (b) comprende uno o más de A21, P24, A/L48L, P51, A55, A65, P68, A90, P93, A111, P114, A124, P127, D160 y el polipéptido exhibe actividad antiviral así como materia objeto relacionada al mismo;

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/US2005/017471

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2004046365 A	03-06-2004	AU 2003297285 A1 BR 0316324 A CA 2504267 A1 EP 1566205 A2	15-06-2004 27-09-2005 03-06-2004 24-08-2005
WO 0125438 A	12-04-2001	AU 8001300 A CA 2385049 A1 CN 1451045 A EP 1238082 A2 JP 2003511031 T MX PA02003492 A	10-05-2001 12-04-2001 22-10-2003 11-09-2002 25-03-2003 20-08-2002
WO 0052153 A	08-09-2000	AU 3725600 A	21-09-2000

PATENT COOPERATION TREATY

15 5

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:
MAXYGEN, INC.
Patent Department
Attn. Kruse, Norman J.
515 Galveston Drive
Redwood City CA 94063
UNITED STATES OF AMERICA

MAR 2006
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year) 13/02/2006

Applicant's or agent's file reference
0280.310W0

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No:
PCT/US2005/017471

International filing date
(day/month/year) 18/05/2005

Applicant

MAXYGEN, INC.

DOCKETED on by 3/20/06
Atty. PA JEP
File # 0280.310W0
Due Date 11/19/06 Ext
Final Date 12/19/06

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 18:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 18 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 18 months.

See the Annex to Form PCT/IS/A/220 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority

European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Christian Pozzi

Form PCT/ISA/220 (January 2004)

(See notes on accompanying sheet)

CC'd 2 4/10/06

17

16

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 18 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 0280.310WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2005/017471	International filing date (day/month/year) 18/05/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 19/05/2004
Applicant MAXYGEN, INC.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 36.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/017471

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
☒ contained in the international application as filed
☐ filed together with the international application in computer readable form
☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/017471

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/56 C12Q1/68 C07H21/04 C07K14/555 C12P21/02
A61K38/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FILES SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	WO 2004/046365 A (MAXYGEN, INC; PATTEN, PHILLIP, A; GOVINDARAJAN, SRIDHAR; VISWANATHAN,) 3 June 2004 (2004-06-03) claims; figures; examples	1-79
Y	WO 01/25438 A (MAXYGEN, INC; HEINRICHS, VOLKER; CHEN, TEDDY; PATTEN, PHILLIP, A) 12 April 2001 (2001-04-12) claims; figures; examples	1-79
Y	WO 00/52153 A (MAXYGEN, INC; HOWARD, RUSSELL, J; PATTEN, PHILLIP, A) 8 September 2000 (2000-09-08) figures; example 1	1-79
	-/-	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

Special categories of cited documents:

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)
- 'O' document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- 'A' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 January 2006

Date of mailing of the international search report

13/02/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5618 Patentleien 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 apo nl,
Fax (+31-70) 340-3010

Authorized officer

Sommer, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/017471

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BAILON P ET AL: "Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: A 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 12, no. 2, March 2001 (2001-03), pages 195-202, XP002264676 ISSN: 1043-1802 abstract; results; discussion;	27-48, 64-79

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/017471

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 70-73 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

- 1. claims: 1-7 (all completely), 8-11, 24-40, 44, 46-51, 54-79 (all partially)**

a polypeptide comprising a sequence which (a) differs in 1 to 16 amino acid positions from SEQ ID No. 1 and (b) comprises one or more substitution selected from F48A/L, V51P, F55A, F65A, F68P, L111A and V114P and which polypeptide exhibits antiviral activity as well as subject-matter related thereto;

- 2. claims: 8-11, 24-40, 44, 46-51, 54-79 (all partially)**

a polypeptide comprising a sequence which (a) differs in 0 to 16 amino acid positions from SEQ ID No. 13 and (b) comprises one or more of A/L48, P51, A55, A65, P68, A111 and P114 and which polypeptide exhibits antiviral activity as well as subject-matter related thereto;

- 3. claims: 12-19 (all completely); 20-37, 41-43, 45, 46-49, 52-79 (all partially)**

a polypeptide comprising a sequence which (a) differs in 1 to 16 amino acid positions from SEQ ID No. 36 and (b) comprises one or more substitution selected from M21A, I24P, F48A/L, F51P, S55A, F65A, F68P, F90A, M93P, L111A, V114P, F124A, I127P and E160D and which polypeptide exhibits antiviral activity as well as subject-matter related thereto;

- 4. claims: 20-37, 41-43, 45, 46-49, 52-79 (all partially)**

a polypeptide comprising a sequence which (a) differs in 0 to 16 amino acid positions from SEQ ID No. 38 and (b) comprises one or more of A21, P24, A/L48L, P51, A55, A65, P68, A90, P93, A111, P114, A124, P127, D160 and which polypeptide exhibits antiviral activity as well as subject-matter related thereto;

22

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/017471

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004046365 A	03-06-2004	AU 2003297285 A1	15-06-2004
		BR 0316324 A	27-09-2005
		CA 2504267 A1	03-06-2004
		EP 1565205 A2	24-08-2005
WO 0125438 A	12-04-2001	AU 8001300 A	10-05-2001
		CA 2385045 A1	12-04-2001
		CN 1451045 A	22-10-2003
		EP 1238082 A2	11-09-2002
		JP 2003511031 T	25-03-2003
		MX PA02003492 A	20-08-2002
WO 0052153 A	08-09-2000	AU 3725600 A	21-09-2000

23

25

24

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

1 de Diciembre de 2005 (01.12.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2005/113592 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07K 14/555

(74) Agente: KRUSE, Norman, J. y sus col; MAXYGEN, INC. Patent Department, 515 Galveston Drive, Redwood City, CA 94063 (US).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2005/017471

(22) Fecha de Registro Internacional: 18 de Mayo de 2005
(18.05.2005)

(25) Idioma de registro: INGLES

(26) Idioma de Publicación: INGLES

(30) Información de Prioridad:
60/572,504 19 de Mayo de 2004 (19.05.2004) US

(71) Solicitante: (para todos los estados designados excepto Estado Unidos): MAXYGEN, INC. [US/US]; 515 Galveston Drive, Redwood City, CA 94063 (US). F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; 124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventores: e

(75) Inventores/solicitantes (para los EU únicamente): PATTEN, Phillip, A. [US/US]; 261 La Cuesta Drive, Portola Valley, CA 94028 (US). VISWANATHAN, Sridhar [IN/US]; 234 Leland Avenue, Menlo Park, CA 94025 (US). NISSEN, Torben, Lanegaard [DK/US]; 18 Henry Street, San Francisco, CA 94114 (US). VOGT, Anne [DE/DE]; Hangstrasse 4, 79539 Loerrach (DE). KROPSHOFER, Harald [DE/DE]; Hangstrasse 4, 79539 Loerrach (DE). SCHUMACHER, Ralf [DE/DE]; Hochfeldstrasse 78, 82377 Penzberg (DE). FISCHER, Stephan [DE/DE]; Jakobfeldweg 11, 82398 Polling (DE). SEEGER, Stefan [DE/DE]; Saalanger 34, 82377 Penzberg (DE). GROSSMANN, Adelbert [DE/DE]; Heimgartenstrasse 1, 82436 Egling (DE). HESSE, Friederike, [DE/DE]; Ganghoferstrasse 23, D-80339 Muenchen (DE). SCHAUBMAR, Andreas [DE/DE]; Reindl 38, 82377 Penzberg (DE). FALKENSTEIN, Roberto [DE/DE]; West-Witt-Strasse 5, 80689 Muenchen (DE). KOLL, Hans [DE/DE]; Bluetenanger 42, 85247 Oberroth (DE). DEMBOWSKI, Marius [DE/DE]; Schaffhausentr. 18, 81476 Muenchen (DE).

(81) Estados Designados (salvo que de otro modo indicado para cada clase de la protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (salvo que de otro modo indicado para cada clase de la protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR) OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— sin reporte de búsqueda internacional y para ser republicado con el recibido de este reporte

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Gulas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "POLIPEPTIDOS DE INTERFERON-ALFA Y CONJUGADOS"

(57) Resumen: La presente invención provee polipéptidos y conjugados de interferón-alfa, y ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos; la invención también incluye composiciones que comprenden estos polipéptidos, conjugados, y ácidos nucleicos; células que contienen o que expresan los polipéptidos, conjugados, y ácidos nucleicos; métodos para elaboración de los polipéptidos, conjugados, y ácidos nucleicos; y métodos para el uso de los polipéptidos, conjugados, y ácidos nucleicos.

26

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 December 2005 (01.12.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/113592 A2

(51) International Patent Classification¹: C07K 14/555

(21) International Application Number:
PCT/US2005/017471

(22) International Filing Date: 18 May 2005 (18.05.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/572,504 19 May 2004 (19.05.2004) US

(71) Applicants (for all designated States except US): MAXY-
GEN, INC. [US/US]; 515 Galveston Drive, Redwood
City, CA 94063 (US). F.HOFFMANN-LA ROCHE AG
[CH/CH]; 124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(73) Inventors/Applicants (for US only): PATTEN, Phillip,
A. [US/US]; 261 La Cuesta Drive, Portola Valley, CA
94028 (US). VISWANATHAN, Sridhar [IN/US]; 234
Leland Avenue, Menlo Park, CA 94025 (US). NISSEN,
Torben, Lauengaard [DK/US]; 18 Henry Street, San
Francisco, CA 94114 (US). VOGT, Anna [DE/DE];
Hangstrasse 4, 79539 Loerrach (DE). KROPSCHOFER,
Harald [DE/DE]; Hangstrasse 4, 79539 Loerrach (DE).
SCHUMACHER, Ralf [DE/DE]; Hochfeldstrasse 78,
82377 Penzberg (DE). FISCHER, Stephan [DE/DE];
Jakobsfeldweg 11, 82398 Polling (DE). SEEGER, Stefan
[DE/DE]; Seelanger 34, 82377 Penzberg (DE). GROSS-
MANN, Adelbert [DE/DE]; Heimgartenstrasse 1, 82436
Egling (DE). HESSE, Friederike, [DE/DE]; Ganghofer-
strasse 23, D-80339 Muenchen (DE). SCHAUBMAR,
Andreas [DE/DE]; Reindl 38, 82377 Penzberg (DE).

FALKENSTEIN, Roberto [DE/DE]; Winkl-Witt-Strasse
5, 80689 Muenchen (DE). KOLL, Hans [DE/DE];
Blutenanger 42, 85247 Oberoth (DE). DEMBOWSKI,
Markus [DE/DE]; Schaffhausenstr. 18, 81476 Muenchen
(DE).

(74) Agents: KRUSE, Norman, J. et al.; MAXYGEN, INC.-
Patent Department, 515 Galveston Drive, Redwood City,
CA 94063 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: INTERFERON-ALPHA POLYPEPTIDES AND CONJUGATES

(57) Abstract: The present invention provides interferon-alpha polypeptides and conjugates, and nucleic acids encoding the polypep-
tides. The invention also includes compositions comprising these polypeptides, conjugates, and nucleic acids; cells containing or
expressing the polypeptides, conjugates, and nucleic acids; methods of making the polypeptides, conjugates, and nucleic acids; and
methods of using the polypeptides, conjugates, and nucleic acids.

WO 2005/113592 A2

26

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para: ver forma PCT/ISA/220		PCT OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)																											
		Fecha de envío por correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda página)																											
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220		PARA FUTURAS ACCIONES Ver el párrafo 2 a continuación																											
Solicitud Internacional No. PCT/US2005/017471	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 18.05.2005	Fecha de prioridad (día/mes/año) 19.05.2004																											
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C07K14/56, C12Q1/68, C07H21/04, C07K14/555, C12P21/02, A61K38/21																													
Solicitante MAXYGEN, INC																													
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table border="0"> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. I</td> <td>Bases del Reporte</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. II</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. III</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial.</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. IV</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. V</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación.</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VI</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VII</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VIII</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table> 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad Examinadora Preliminar. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220 <table border="1"> <tr> <td> Nombre y dirección de correo de ISA: Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49- 89) 2399- 4465 </td> <td> Funcionario Autorizado Sommer, B Teléfono No. +49 89 2399-7099 </td> </tr> </table>				☒	Casilla No. I	Bases del Reporte	☒	Casilla No. II	Prioridad	☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial.	☒	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación.	☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional	Nombre y dirección de correo de ISA: Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49- 89) 2399- 4465	Funcionario Autorizado Sommer, B Teléfono No. +49 89 2399-7099
☒	Casilla No. I	Bases del Reporte																											
☒	Casilla No. II	Prioridad																											
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial.																											
☒	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																											
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación.																											
☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																											
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																											
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																											
Nombre y dirección de correo de ISA: Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49- 89) 2399- 4465	Funcionario Autorizado Sommer, B Teléfono No. +49 89 2399-7099																												

Forma (PCT/ISA/237) (Carátula) (Enero de 2004)

28

Casilla No. I. Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión se ha establecido según la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo bajo este ítem.
☐ Esta opinión se ha establecido según una traducción del idioma original al siguiente idioma, que es el idioma de una traducción proporcionada para la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1(b)).
2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:
 - a. tipo de material:
☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
 - b. formato de material:
☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador
 - c. tiempo de presentación/suministro:
☒ contenido en la solicitud internacional según se registró
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda.
3. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
4. Comentarios adicionales:

Casilla No. II Prioridad

1. ☒ No se ha considerado la validez de la reivindicación de la prioridad porque la Autoridad de Búsqueda Internacional no tiene una copia de la solicitud anterior cuya prioridad se ha reivindicado o, cuando sea necesario, una traducción de esa solicitud anterior. Sin embargo, esta opinión se ha establecido con base en el hecho de que la fecha relevante (Reglas 43bis.1 y 64.1). es la fecha de la prioridad reivindicada.
2. ☐ Esta opinión se ha establecido como si ninguna prioridad se hubiese reivindicado debido al hecho de que se ha encontrado que la reivindicación de la prioridad no es válida (Reglas 43bis.1 y 64.1).. Por consiguiente, para los propósitos de esta opinión, se considera que la fecha de la presentación internacional indicada anteriormente es la fecha relevante.
3. Observaciones adicionales, si es necesario:

OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2005/017471

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un paso inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
- ☒ reivindicaciones Nos. 70-73

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 70-73 (con respecto a la aplicabilidad industrial) (Regla 67.1 (iv) PCT) se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):
ver hoja separada

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):
- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.
- ☐ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos.
- ☐ El nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida no cumple con el estándar proporcionado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:
 - la forma escrita ☐ no se ha proporcionado
 - ☐ no cumple con el estándar
 - el formato legible por computador ☐ no se ha proporcionado
 - ☐ no cumple con el estándar
- ☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver la hoja separada para más detalles.

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

**Solicitud internacional No.
PCT/US2005/017471**

Casilla No. IV Falta de Unidad en la invención

1. ☒ En respuesta a la invitación (Forma PCT/ISA/206) para pagar tasas adicionales, el solicitante ha:
- ☐ Pagado tasas adicionales
- ☐ Pagado tasas adicionales bajo protesta
- ☐ Ni pagado tasas adicionales
2. ☒ Esta Autoridad encontró que el requisito de unidad de invención no se cumple y decidió, no invitar al solicitante a pagar tasas adicionales.
3. Esta Autoridad considera que el requisito de unidad de invención de acuerdo con las Reglas 13.1, 13.2 y 13.3 es:
- ☐ Cumplido
- ☒ No cumplido por las siguientes razones:
- ver siguiente hoja
4. En consecuencia, este reporte ha sido establecido con respecto a las siguientes partes de la solicitud internacional:
- ☒ Todas la partes
- ☐ Las partes que se relacionan a las reivindicaciones Nos.

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 43bis.1 (a) (i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones	1-79
	No: Reivindicaciones	-
Nivel inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones	-
	No: Reivindicaciones	1-79
Aplicabilidad industrial (IA)	Si: Reivindicaciones	1-69, 74-79
	No: Reivindicaciones	-

**2. Citaciones y explicaciones
ver hoja separada**

Re Item V:

1. en esta comunicación, se hace referencia a los siguientes documentos:
D1: WO 01/25438 A
D2: WO 00/52153 A
2. La presente solicitud se refiere a polipéptidos con actividades antivirales obtenidos por reorganización de ADN de genes de interferón alfa humano. Además, se revelan métodos y usos de dichos polipéptidos para el tratamiento de infecciones virales.
3. La materia objeto de las reivindicaciones 1-79 parece ser novedosa (Artículo 33(2) PCT).
4. Cualquiera de D1 o D2, al revelar polipéptidos con actividades antivirales obtenidos por reorganización de ADN de genes de interferón alfa humano, puede ser considerado como el arte previo más relevante (D1, por ejemplo reivindicaciones, figuras, ejemplos; D2, por ejemplo figuras, ejemplo 1). La presente solicitud difiere de D1/D2 en las secuencias de los polipéptidos revelados los cuales son obtenidos por el mismo método, es decir, por reorganización de ADN de genes de interferón alfa humano.

El problema a resolver está formulado como el suministro de polipéptidos adicionales tipo interferón alfa con actividades antivirales. La solicitud resuelve este problema al revelar polipéptidos con SEQ ID Nos. 2-35 y 37-44 así como los polipéptidos derivados de SEQ ID Nos. 1, 13, 36 ó 38 con hasta 16 sustituciones de aminoácidos especificadas sólo parcialmente.

El suministro de polipéptidos de interferón alfa adicionales con actividades antivirales no se considera inventivo *per se*. Una persona versada en la materia sabría a partir de D1/D2 cómo obtener tales polipéptidos, v.g., por reorganización de ADN de genes de interferón alfa humano, y como ensayar sus actividades antivirales. Por lo tanto, sería obvio para una persona versada en la materia esperar como resultado y posteriormente obtener exitosamente productos similares o idénticos a aquellos reivindicados en la presente solicitud, usando técnicas de rutina. La selección arbitraria de los polipéptidos reivindicados es apenas una de las diversas posibilidades directas que la persona experta seleccionaría sin ejercicio de habilidad inventiva, para resolver el problema planteado. Además, ninguna de las reivindicaciones dependientes contiene característica alguna que en combinación con las características de cualquier reivindicación a la que se refiera, parezca inventiva. Por consiguiente, se considera que las reivindicaciones 1-79 no involucran nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT), a menos que el solicitante pueda presentar evidencia de

31

que los polipéptidos de tipo interferón alfa revelados muestran un efecto o propiedad inesperada. Tal característica debe tener sustento en la descripción presentada.

5. Las presentes reivindicaciones 9-12 se relacionan con un número extremadamente grande de posibles polipéptidos. Sin embargo, se puede encontrar sustento de acuerdo con el Artículo 6 PCT y revelación de acuerdo con Artículo 5 PCT, sólo para una pequeña proporción de los compuestos reivindicados. No todos los polipéptidos reivindicados muestran una actividad antiviral incrementada. Además, no es posible predecir si una combinación de hasta 16 sustituciones no especificadas de aminoácidos también resultará en una actividad antiviral significativa. Por consiguiente las reivindicaciones no están sustentadas por la descripción puesto que su alcance es más amplio que el justificado por la descripción y los dibujos. La presente especificación falla en sustentar técnicamente toda el área reivindicada y las reivindicaciones que no están limitadas a polipéptidos suficientemente revelados, con una actividad antiviral significativa, no están habilitados y por consiguiente no son patentables conforme al Artículo 5/6 PCT.
6. La solicitud no cumple con los requisitos de unidad como se ha establecido en las regulaciones de PCT (Artículo 34(3) Regla 13 PCT) ya que los grupos de invenciones mencionadas en el ISR no están tan ligados como para formar un único concepto inventivo general. El único concepto común a dichos grupos de invenciones puede ser visto como la provisión de polipéptidos de interferón alfa con actividades antivirales. Sin embargo, tales polipéptidos ya eran conocidos desde v.g. D1/D2, es decir, dicho concepto no es novedoso. En caso de que el solicitante desee argumentar que la selección de una estructura "base" de v.g. cualquier SEQ ID Nos. 1, 13, 36 o 38 puede ser vista como una característica nueva y unificadora, cabe mencionar que dicha característica tampoco es vista como novedosa ni esencial para todos los polipéptidos de la invención. Adicionalmente, aparentemente ningún efecto técnico especial está relacionado al uso de dichas secuencias "base" específicas, es decir, dicha característica parece ser sólo una selección arbitraria entre las varias posibilidades diferentes.

Las reivindicaciones 70-73 se relacionan con materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT). Para la evaluación de las actuales reivindicaciones 70-73 acerca de la aplicabilidad industrial, no existe criterio unificado en los estados contratantes del PCT. La patentabilidad también puede ser dependiente de la formulación de las reivindicaciones. La EPO por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto

28

en tratamiento médico, sin embargo, puede permitir reivindicaciones de primer uso en tratamiento médico para un compuesto conocido y el uso de tal compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

PATENT COOPERATION TREATY

Si

33

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

To:

see form PCT/ISA220

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA220		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below	
International application No. PCT/US2005/017471	International filing date (day/month/year) 18.05.2005	Priority date (day/month/year) 19.05.2004	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C07K14/56, C12Q1/68, C07H21/04, C07K14/555, C12P21/02, A61K38/21			
Applicant MAXYGEN, INC.			

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1 (a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA220.

Name and mailing address of the ISA:	Authorized Officer
 European Patent Office D-80288 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523656 epru d Fax: +49 89 2369 - 4485	Sommer, B Telephone No. +49 89 2369-7099 

38

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/017471

34

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form.
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

36

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/017471

35

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 70-73

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 70-73 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

37

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/017471

36

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA206) to pay additional fees, the applicant has:
 - ☐ paid additional fees.
 - ☐ paid additional fees under protest.
 - ☐ not paid additional fees.
2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
 - ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
 - ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-79
	No: Claims	-
Inventive step (IS)	Yes: Claims	-
	No: Claims	1-79
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-69, 74-79
	No: Claims	-

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item V:

1. The following documents are referred to in this communication:
D1: WO 01/25438 A
D2: WO 00/52153 A
2. The present application concerns polypeptides with antiviral activity obtained by DNA shuffling of human interferon alpha genes. Furthermore, methods and uses of said polypeptides for the treatment of viral infections are disclosed.
3. The subject-matter of claims 1-79 appears to be novel (Article 33(2) PCT).
4. Any of D1 or D2 disclosing polypeptides with antiviral activities obtained by DNA shuffling of human interferon alpha genes is equally suited as most relevant prior art (D1, e.g. claims, figures, examples; D2, e.g. figures, example 1). The present application differs from D1/D2 in the sequences of the disclosed polypeptides which are obtained by the same method, i.e. by DNA shuffling of human interferon alpha genes.

The problem to be solved is formulated as the provision of further interferon alpha-like polypeptides with antiviral activities. The application solves this problem by disclosing polypeptides with SEQ ID Nos. 2-35 and 37-44 as well as polypeptides derived from SEQ ID Nos. 1, 13, 36 or 38 by up to 16 only partly specified amino acid substitutions.

The provision of further interferon alpha polypeptides with antiviral activities is not considered as being inventive *per se*. A skilled person would know from D1/D2 how to obtain such polypeptides, e.g. by DNA shuffling of human interferon alpha genes, and how to test them for antiviral activities. Therefore, it would be obvious for a skilled person to obtain with a reasonable expectation of success products close or identical to those claimed in the present application by use of routine techniques. The arbitrary selection of the claimed polypeptides is merely one of several straightforward possibilities from which the skilled person would select without the exercise of inventive skill, in order to solve the problem posed. Moreover, none of the dependent claims does contain any features which, in combination with the features of any claim to which it refers, appear inventive. Consequently, claims 1-79 are not considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT), unless the applicant is able to file evidence, that the disclosed interferon alpha-like

38

polypeptides exhibit an unexpected effect or property. Such a feature has to be supported by the description as filed.

5. Present claims 9-12 relate to an extremely large number of possible polypeptides. Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. Not all of the claimed polypeptides exhibit an increased antiviral activity. Moreover, it is not predictable, if a combination of up to 16 unspecified amino acid substitutions will also result in a significant antiviral activity. Therefore, the claims are not supported by the description as their scope is broader than justified by the description and drawings. The present specification fails to technically support the whole area claimed and claims not limited to sufficiently disclosed polypeptides with a significant antiviral activity are not enabled and consequently not patentable pursuant to Article 5/6 PCT.
6. The application does not comply with the requirements of unity as set forth in the PCT regulations (Article 34(3), Rule 13 PCT) since the groups of inventions mentioned in the ISR are not so linked as to form a single general inventive concept. The only concept common to all of said groups of inventions can be seen as the provision of interferon alpha polypeptides with antiviral activities. However, such polypeptides are already known from e.g. D1/D2, i.e. said concept is not novel. In case the applicant intends to argue that the selection of a "backbone" structure of e.g. any of SEQ ID Nos. 1, 13, 36 or 38 could be seen as a novel unifying feature, it is noted that said feature does neither seem to be inventive nor essential for all claimed polypeptides of the invention. In addition, apparently no special technical effect is related to the use of said specific "backbone" sequences, i.e. said feature seems to be only an arbitrary selection among the various different possibilities.
7. Claims 70-73 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 57.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT). For the assessment of the present claims 70-73 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known com-

70

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/017471

pound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the
manufacture of a medicament for a new medical treatment.

POLIPEPTIDOS DE INTERFERON-ALFA Y CONJUGADOS**RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN**

5

La presente invención provee polipéptidos y conjugados de interferón-alfa, y ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos; la invención también incluye composiciones que comprenden estos polipéptidos, conjugados, y ácidos nucleicos; células que contienen o que expresan los polipéptidos, conjugados, y ácidos nucleicos; métodos para elaboración de los polipéptidos, conjugados, y ácidos nucleicos; y métodos para el uso de los polipéptidos, conjugados, y ácidos nucleicos.

10

POLIPEPTIDOS DE INTERFERON ALFA Y CONJUGADOS**REFERENCIA RECÍPROCA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS**

5 De acuerdo con 35 U.S.C. §119(e), esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de los E.U.A. No. de Serie 60/572,504 presentada el 19 de mayo de 2004, la descripción de la cual se incorpora como referencia en la presente invención en su totalidad para todos los propósitos.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere generalmente a polinucleótidos y polipéptidos codificados por éstos, conjugados de los polipéptidos, así como vectores, células, anticuerpos, y métodos para uso y producción de los polinucleótidos, 15 polipéptidos, y conjugados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Los interferones-alfa son miembros de las diversas superfamilias de genes de citocina en haz de hélices (Sprang, S. R. et al. (1993) Curr. Opin. Struct. Biol. 3: 815-827). Los interferones alfa de humano son codificados por una familia de más de 20 genes no alélicos duplicados en tándem y pseudogenes que comparten 85-98% de identidad de secuencias en el nivel de aminoácidos (Henco, K. et al. (1985) J. Mol. Biol.

185: 227-260). Los genes los cuales expresan proteínas activas de interferón-alfa han sido agrupados dentro de 13 familias de conformidad con los loci genéticos. Las proteínas conocidas del interferón-alfa expresadas en humano y sus variaciones alélicas se tabulan en Allen G. y Diaz M. O. (1996) J. Interferon and Cytokine Res. 16: 181-184.

5 Se ha mostrado que los interferones-alfa inhiben diversos tipos de proliferación celular, y son especialmente útiles para el tratamiento de una variedad de trastornos de proliferación celular frecuentemente asociados con el cáncer, particularmente malignidades hematológicas tales como leucemias. Estas proteínas han mostrado una actividad antiproliferativa en contra del mieloma múltiple, leucemia

10 linfocítica crónica, leucemia de grado bajo, sarcoma de Kaposi, leucemia mielógena crónica, carcinoma de célula renal, tumores de la vejiga urinaria y cánceres de ovario (Bonnem, E. M. et al. (1984) J. Biol. Response Modifiers 3: 580; Oldham, R.K. (1985) Hospital Practice 20: 71).

Los interferones-alfa también son útiles en contra de diversos tipos de

15 infecciones virales (Finter, N. B. et al. (1991) Drugs 42 (5): 749). Los interferones-alfa tienen actividad en contra de la infección por virus de papiloma de humano, infecciones tipo Hepatitis B, y Hepatitis C (Finter, N. B. et al., 1991, anteriormente mencionado; Kashima, H. et al. (1988) Laryngoscope 98: 334; Dusheiko, G. M. et al. (1986) J. Hematology 3 (Suplemento 2): S199; Davis, GL et al. (1989) N. England J. Med. 321:

20 1501). También se ha investigado el papel de los interferones y receptores del interferón en la patogénesis de ciertas enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Benoit, P. et al. (1993) J. Immunol. 150 (3): 707).

Aunque estas proteínas poseen valor terapéutico en el tratamiento de numerosas enfermedades, éstas no han sido optimizadas para uso como fármacos. Por ejemplo, la toxicidad limitante de dosis, la reactividad cruzada del receptor, y las vidas medias cortas en suero reducen significativamente la utilidad clínica de cualesquiera de estas citocinas (Dusheiko, G. (1997) *Hepatology* 26: 112S-121S; Vial, T. y Descotes, J. (1994) *Drug Experience* 10: 115-150; Funke, I. et al. (1994) *Ann. Hematol.* 68: 49-52; Schomburg, A. et al. (1993) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119: 745-755). Diversos y numerosos perfiles de efectos laterales los cuales acompañan a la administración del interferón incluyen síntomas similares a la gripe, fatiga, halucinaciones, fiebre, elevación de la enzima hepática, y leucopenia (Pontzer, C. H. et al. (1991) *Cancer Res.* 51: 5304; Oldham, 1985, anteriormente mencionado).

El virus de la hepatitis-C (HCV) es un virus de ARN no integrado al hospedero con una velocidad de replicación muy elevada y por lo tanto se asocia con un grado elevado de diversidad genética. Se han identificado al menos seis genotipos y más de treinta subtipos de ARN de HCV. Se ha mostrado que el genotipo de HCV es un elemento de predicción de la respuesta a la terapia por IFN-alfa. Se ha encontrado que los pacientes infectados con los genotipos de HCV 2 y 3 generalmente responden bien a la terapia con interferón. Los pacientes infectados con los genotipos 4, 5 y 6 tienden a responder menos bien. Los pacientes infectados con el genotipo HCV 1 tienden a responder muy mal a la terapia con interferón, con aproximadamente 50% de los pacientes con genotipo 1 se clasifican como pacientes que "no responden" hacia la terapia con IFN-alfa. El genotipo 1 es actualmente la forma más prevalente de Hepatitis C, infectando a aproximadamente 70% de pacientes en los Estados Unidos y 50% de

pacientes en Europa. Claramente, existe una necesidad imperante para terapias más efectivas para la infección por HCV, particularmente de la variedad de genotipo 1.

Existe evidencia genética y bioquímica de que el genotipo 1 HCV (y otros subtipos) atenúan de manera activa la ruta de señalización de IFN-alfa mediante la inhibición de proteínas clave para la respuesta a IFN tal como la serina/treonina proteína cinasa PKR activada por ARNs (Katze M. G., et al. (2002) Nat. Rev. Immunol. 2(9): 675-687). Como una probable consecuencia de esta diversidad genética e inhibición activa de la respuesta antiviral, HCV (particularmente el genotipo 1) tiene la capacidad de escapar de la vigilancia inmune del hospedero, llevando a una alta proporción de infección crónica. La extensiva heterogeneidad genética de HCV tiene implicaciones diagnósticas y clínicas importantes, que potencialmente explican las variaciones en el curso clínico, dificultades en el desarrollo de la vacuna, y ausencia de respuesta a la terapia.

La presente invención se dirige a la necesidad de moléculas de interferón-alfa las cuales exhiban una eficiencia antiviral y/o inmunomoduladora. La invención provee polipéptidos y polipéptidos conjugados novedosos de interferón-alfa, ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos, y métodos para el uso de dichas moléculas. Dichas moléculas podrían ser de uso benéfico en una variedad de aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, tratamientos terapéuticos y profilácticos, particularmente para infecciones virales y enfermedades y condiciones asociadas con las infecciones virales.

La presente invención satisface estas y otras necesidades.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención provee polipéptidos novedosos, incluyendo variantes de los mismos y proteínas de fusión que comprenden dichos polipéptidos. La invención también provee conjugados que comprenden un polipéptido de la invención aparentemente asociado a una o más porciones no polipeptídicas. La invención también provee ácidos nucleicos que codifican cualesquiera de los polipéptidos de la invención, y vectores y células hospederas que comprenden dichos ácidos nucleicos. Además, la invención provee métodos para la elaboración y uso de dichos polipéptidos, conjugados, y ácidos nucleicos, y otras características evidentes después de la revisión adicional.

En un aspecto, la invención provee un polipéptido aislado o recombinante, el polipéptido que comprende una secuencia identificada como una de SEQ ID NOs: 2-35 y SEQ ID NOs: 37-44 (tal como una de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, y SEQ ID NO: 44). La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden cualesquiera de estos polipéptidos, ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos, y métodos para la elaboración y uso de estos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 1 y (b) comprende una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de F48A/L; V51P; F55A; F65A; F68P; L111A; y V114P. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 1 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; V51A; Q52P/E; A53T; F55S; L56V; F57L; Y58H; M61I; N113K; V114E; y E160D. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (tal como, por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación TH1, y/o actividad antiproliferativa). La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden cualesquiera de estos polipéptidos, ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos, y métodos para la elaboración y uso de dichos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 0 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 13 y (b) comprende uno o más de: Ala o Leu en la

posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 111; y Pro en la posición 114 (numeración de la posición en relación con SEQ ID NO: 13). Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 13 en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 0-15 posiciones de aminoácidos, en 0-14 posiciones de aminoácidos, en 0-13 posiciones de aminoácidos, en 0-12 posiciones de aminoácidos, en 0-11 posiciones de aminoácidos, en 0-10 posiciones de aminoácidos, en 0-9 posiciones de aminoácidos, en 0-8 posiciones de aminoácidos, en 0-7 posiciones de aminoácidos, en 0-6 posiciones de aminoácidos, en 0-5 posiciones de aminoácidos, en 0-4 posiciones de aminoácidos, en 0-3 posiciones de aminoácidos, en 0-2 posiciones de aminoácidos, o en 0-1 posiciones de aminoácidos. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una Ala o una Leu en la posición 48. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una Ala en la posición 48. En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones a SEQ ID NO: 13 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; V51A; Q52P/E; A53T; F55S; L56V; F57L; Y58H; M61I; N113K; V114E; y E160D. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación TH1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal.

La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A; I24P; F48A/L; T51P; S55A; F65A; F68P; F90A; M93P; L111A; V114P; F124A; I127P y E160D.

Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 36 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de P26L; H47Q; T51V; S55P/F; V56L; H58Y; L60M; F90Y; M93L; N95D; N113K; V114E; R125Q; T132K; y L154F. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (tal como, por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación TH1, y/o actividad antiproliferativa). La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden cualesquiera de estos polipéptidos, ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos, y métodos para la elaboración y uso de dichos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 0 a 16 posiciones de

ua

aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 38 y (b) comprende uno o más de: Ala en la posición 21; Pro en la posición 24; Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 90; Pro en la posición 93; Ala en la posición 111; Pro en la posición 114; Ala en la posición 124; Pro en la posición 127; y Glu en la posición 160 (numeración de la posición en relación con SEQ ID NO: 38). Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ IDNO: 38 en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 0-15 posiciones de aminoácidos, en 0-14 posiciones de aminoácidos, en 0-13 posiciones de aminoácidos, en 0-12 posiciones de aminoácidos, en 0-11 posiciones de aminoácidos, en 0-10 posiciones de aminoácidos, en 0-9 posiciones de aminoácidos, en 0-8 posiciones de aminoácidos, en 0-7 posiciones de aminoácidos, en 0-6 posiciones de aminoácidos, en 0-5 posiciones de aminoácidos, en 0-4 posiciones de aminoácidos, en 0-3 posiciones de aminoácidos, en 0-2 posiciones de aminoácidos, o en 0-1 posiciones de aminoácidos. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una Ala o una Leu en la posición 48. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una Ala en la posición 48. En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones a SEQ ID NO: 38 seleccionadas a partir del grupo que consiste de P26L; H47Q; V51T; F55P/S; L56V; Y58H; L60M; F90Y; M93L; N95D; N113K; V114E; R125Q; T132K; y F154L. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación T_H1 , y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos

ST

polipéptidos, ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos, y métodos para la elaboración y uso de dichos polipéptidos.

La invención también provee conjugados que comprenden un polipéptido de la invención, tal como cualesquiera de los polipéptidos de la invención anteriormente descritos, y al menos una porción no polipeptídica unida a un grupo de unión del polipéptido, en donde el conjugado exhibe una actividad de interferón-alfa. En algunos casos, la porción no polipeptídica es un polímero (por ejemplo, una molécula de óxido de polialquileno, tal como un polietilenglicol (PEG), tal como un monometoxipolietilenglicol (mPEG)), o una porción de azúcar. La al menos una porción no polipeptídica puede unirse, por ejemplo, a una cisteína, a una lisina, al grupo amino N-terminal del polipéptido, o a un sitio de glicosilación in vivo del polipéptido. La invención también provee métodos para la elaboración y uso de dichos conjugados.

La invención también provee ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican cualesquiera de los polipéptidos de la invención. La invención también provee vectores y células hospederas que comprenden dichos ácidos nucleicos, y métodos para elaboración de los polipéptidos de la invención que comprenden cultivar células hospederas que comprenden dichos ácidos nucleicos.

En otro aspecto, la invención provee un método para inhibición de la replicación viral en células infectadas por virus, el método comprendiendo poner en contacto a las células infectadas por virus con un polipéptido o un conjugado de la invención. La invención también provee un método para la reducción del número de copias de un virus en células infectadas por virus, que comprende poner en contacto a las células infectadas por virus con un polipéptido o un conjugado de la invención.

51

En otro aspecto, la invención provee un método para el tratamiento de una condición la cual responde al interferón-alfa, que comprende administrar a un sujeto que padece la condición una composición que comprende un polipéptido de la invención o un conjugado de la invención en una cantidad efectiva para mejorar un síntoma asociado con la condición. Dichas condiciones incluyen infección crónica por Hepatitis C, infección crónica por Hepatitis B, leucemia de célula pilosa, melanoma maligno, linfoma folicular, Condilomata Acuminatum, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, linfoma no de Hodgkin, leucemia mielógena crónica, carcinoma de célula basal, mieloma múltiple, tumores carcinoides, cáncer de vejiga urinaria, enfermedad de Crohn, linfoma cutáneo de célula T, carcinoma de célula renal, esclerosis múltiple, y SIDA. La invención también incluye el uso de una composición que comprende un polipéptido de la invención o un conjugado de la invención para el tratamiento de una condición la cual responde al interferón-alfa, tal como por ejemplo una condición anteriormente descrita.

Estos y otros objetivos y características de la invención serán más evidentes cuando se lea la siguiente descripción detallada en conjunción con las figuras anexas.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Las figuras 1A y 1B muestran cursos de tiempo bifásicos para la eliminación viral a partir de células infectadas con HCV siguiendo al tratamiento con IFN-alfa (A. cinéticas sin respuesta; B. cinéticas con respuesta).

La figura 2 muestra un alineamiento de la secuencia de un polipéptido de la invención (SEQ ID NO: 13) con las siguientes secuencias del polipéptido de interferón-

SB

52

alfa de humano (hulFN-alfa): hulFN-alfa 1a (SEQ ID NO: 45), hulFN-alfa 2b (SEQ ID NO: 46), hulFN-alfa 4b (SEQ ID NO: 48), hulFN-alfa 5 (SEQ ID NO: 49), hulFN-alfa 6 (SEQ ID NO: 50), hulFN-alfa 7 (SEQ ID NO: 51), hulFN-alfa 8b (SEQ ID NO: 52), hulFN-alfa 10a (SEQ ID NO: 53), hulFN-alfa 14a (SEQ ID NO: 54), hulFN-alfa 16 (SEQ ID NO: 55),
 5 hulFN-alfa 17b (SEQ ID NO: 56) y hulFN-alfa 21b (SEQ ID NO: 57). Las convenciones de nombrado para las secuencias hulFN-alfa son de conformidad con Allen G. y Diaz M. O. (1996) J. Interferon and Cytokine Res. 16: 181-184. Las posiciones de los residuos de aminoácidos en SEQ ID NOs: 45-46 y 48-57 que son idénticas a SEQ ID NO: 13 se indican con un punto (.), y los espacios en la secuencia se indican con un guión (-).

10 La figura 3 muestra un alineamiento de la secuencia de un polipéptido de la invención (SEQ ID NO: 38) con las secuencias del polipéptido de interferón-alfa de humano SEQ ID NOs: 45-46 y 48-57. Las posiciones de los residuos de aminoácidos en SEQ ID NOs: 45-46 y 48-57 que son idénticas a SEQ ID NO: 38 se indican con un punto (.), y los espacios en la secuencia se indican con un guión (-).

15 La figura 4 muestra la matriz de sustitución BLOSUM62.

Las figuras 5A, 5B y 5C muestran ejemplos de cálculos de evaluaciones de alineamiento utilizadas para determinar los alineamiento óptimos de secuencia, utilizando los siguientes parámetros: matriz BLOSUM62, sanción por espacio abierto = 11, y sanción por extensión de espacio = 1.

20 Las figuras 6 y 7 muestran los lectores de expresión de E. coli designados OripBR-URA3-lacI_14epi18-mut2 y OripBR-URA3-lacI_25epi19-mut, respectivamente.

La figura 8 muestra la separación vía CLAR de intercambio catiónico de isómeros posicionales de un conjugado de interferón-alfa pegilado ejemplar.

5A

La figura 9 muestra un gel de SDS-PAGE de fracciones a partir de la separación CLAR por intercambio catiónico de la figura 8.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

5 Definiciones

A menos que se defina de otra manera en la presente invención o en el remanente de la especificación, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente invención tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por aquellos expertos en la técnica a los cuales pertenece la invención.

10 Una "secuencia polipeptídica" (por ejemplo, una proteína, polipéptido, péptido, etc.) es un polímero de aminoácidos que comprende aminoácidos que se presentan de manera natural o análogos artificiales de aminoácidos, o un carácter en hilera que representa un polímero de aminoácido, dependiendo del contexto. Dada la degeneración del código genético, uno o más ácidos nucleicos, o los ácidos nucleicos
15 complementario de los mismos, que codifican una secuencia polipeptídica específica se pueden determinar a partir de la secuencia polipeptídica.

20 Una "secuencia polipeptídica" (por ejemplo, un ácido nucleico, polinucleótido, oligonucleótido, etc.) es un polímero de nucleótidos que comprende los nucleótidos A, C, T, U, G, u otros nucleótidos que se presentan de manera natural o análogos artificiales de los nucleótidos, o un carácter en hilera que representa un ácido nucleico, dependiendo del contexto. Ya sea el ácido nucleico dado o el ácido nucleico complementario se pueden determinar a partir de cualquier secuencia polipeptídica especificada.

La numeración de un polímero de aminoácidos dado o de un polímero de ácidos nucleicos que "corresponde a" o que es "relativo a" la numeración de un polímero de aminoácidos seleccionado o a un polímero de ácidos nucleicos cuando la posición de cualquier componente polimérico dado (por ejemplo, aminoácido, nucleótido, también
5 referido genéricamente como un "residuo") se designa en referencia a la misma posición o a una posición equivalente en el polímero seleccionado de aminoácidos o de ácidos nucleicos, más que por la posición numérica real del componente en el polímero dado. Por lo tanto, por ejemplo, la numeración de una posición dada del aminoácido en una secuencia polipeptídica dada corresponde a la misma posición del aminoácido o a una
10 posición equivalente en una secuencia polipeptídica seleccionada utilizada como una secuencia de referencia.

Una "posición equivalente" (por ejemplo, una "posición equivalente del aminoácido" o "posición equivalente del ácido nucleico" o "posición equivalente del residuo") se define en la presente invención como una posición (tal como, una posición de
15 aminoácido o una posición de ácido nucleico o posición del residuo) de una secuencia polipeptídica de prueba (o polinucleótido de prueba) la cual se alinea con una posición correspondiente de una secuencia polipeptídica de referencia (o polinucleótido de referencia), cuando se alinea de manera óptima utilizando un algoritmo para alineamiento como se describe en la presente invención. La posición equivalente del aminoácido del
20 polipéptido prueba no necesita tener el mismo número de posición numérica que la posición correspondiente del polipéptido de referencia; de manera similar, la posición equivalente del ácido nucleico del polinucleótido prueba no necesita tener el mismo número de posición numérica que la posición correspondiente del polinucleótido de

referencia. Como un ejemplo, la figura 2 muestra la secuencia de un polipéptido de la invención (SEQ ID NO: 13) alineado de manera óptima con diversas secuencias polipeptídicas conocidas de interferón-alfa de humano. En este ejemplo, se considera que el número de posición de aminoácido 48 de SEQ ID NO: 13 está en una posición equivalente del aminoácido a (por ejemplo es "equivalente a") aquella del número de posición del aminoácido 47 de SEQ ID NO: 46 (huIFN-alfa 2b), puesto que el número de aminoácido 48 de SEQ ID NO: 13 se alinea con el número de aminoácido 47 de SEQ ID NO: 46. En otras palabras, la posición del aminoácido 48 de SEQ ID NO: 13 "corresponde a" la posición del aminoácido 47 de SEQ ID NO: 46. De manera similar, se entiende que el residuo A48 (Ala48) en SEQ ID NO: 13 corresponde al residuo F48 (Phe48) en, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, de manera que por ejemplo se entiende que la sustitución A48L relativa a SEQ ID NO: 13 corresponde a la sustitución F48L relativa a, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 (y así sucesivamente).

Dos secuencias polipeptídicas se encuentran "alineadas de manera óptima".

Cuando éstas se alinean utilizando parámetros definidos, por ejemplo, una matriz para sustitución de aminoácidos definidos, sanción por existencia de espacio (también denominada sanción por espacio abierto), y sanción por extensión de espacio, de manera que se llega a la mayor evaluación de similitud posible para ese par de secuencias. Una matriz BLOSUM62 (Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (22): 10915-10919) frecuentemente se utiliza como una matriz para la sustitución de evaluación por omisión en algoritmos para alineamiento de secuencias peptídicas (tal como BLASTP). La sanción por existencia de espacio se impone para la introducción de un espacio de aminoácido particular en una de las secuencias alineadas, y la sanción para la extensión

de espacio se impone para cada posición del residuo en el espacio. A menos que se establezca de otra manera, los parámetros para alineamiento empleados en la presente invención son: matriz de evaluación BLOSUM62, sanción por existencia de espacio = 11, y sanción por extensión de espacio = 1. La evaluación del alineamiento se define por las

5 posiciones de aminoácidos de cada secuencia en la cual el alineamiento empieza y termina (por ejemplo la ventana de alineamiento), y opcionalmente por la inserción de un espacio o múltiples espacios dentro de una o ambas secuencias, de manera que se llega a la mayor evaluación de similitud posible, como se describe con mayor detalle a continuación en la sección titulada "identidad de secuencia porcentual".

10 La terminología utilizada para la identificación de las posiciones de aminoácidos y sustituciones de aminoácidos se ilustra como sigue: F48 indica que la posición número 48 está ocupada por un residuo de fenilalanina (Phe) en una secuencia de aminoácidos de referencia, tal como SEQ ID NO: 1. F48A indica que el residuo de fenilalanina de la posición 48 ha sido sustituido con un residuo de alanina (Ala). Las

15 sustituciones alternativas se indican con una "/", por ejemplo, F48A/L significa una secuencia de aminoácidos en la cual el residuo de fenilalanina en la posición 48 está sustituida con un residuo de alanina o un residuo de leucina. Las sustituciones múltiples algunas veces se pueden indicar con un signo de "+", por ejemplo H47Q+ F48A/L significa una secuencia de aminoácidos la cual comprende una sustitución del residuo de

20 histidina en la posición 47 con un residuo de glutamina y una sustitución del residuo de fenilalanina en la posición 48 con un residuo de alanina o un residuo de leucina. Las deleciones se indican por un asterisco. Por ejemplo, H47* indica que el residuo de histidina en la posición 47 ha sido deletado. Las deleciones de dos o más aminoácidos

57

continuos se puede indicar como sigue, por ejemplo, R161*-E166* indica la delección de los residuos R161-E166 inclusivos (es decir, los residuos 161, 162, 163, 164, 164, y 166 están deletados). Las inserciones se indican de la siguiente manera: la inserción de un residuo adicional de serina después del residuo de histidina localizado en la posición 47 se indica como H47HS. Las sustituciones e inserciones combinadas se indica de la siguiente manera: la sustitución del residuo de histidina en la posición 47 con un residuo de serina y la inserción de un residuo de alanina después de la posición 47 del residuo de aminoácido se indica como H47SA.

A menos que se indique de otra manera, la numeración de la posición de los residuos de aminoácidos mencionados en la presente invención es relativa a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Se debe entender que aunque los ejemplos y modificaciones al polipéptido parental generalmente se proveen en la presente invención en relación con la secuencia SEQ ID NO: 1 (o en relación con otra secuencia especificada), los ejemplos pertenecen a otros polipéptidos de la invención, y las modificaciones descritas en la presente invención se pueden realizar en posiciones equivalentes de aminoácidos de cualesquiera de otros polipéptidos descritos en la presente invención. Por lo tanto, como un ejemplo, la sustitución F48L relativa a SEQ ID NO: se entiende que corresponde a la sustitución A48L en SEQ ID NO: 13, y así sucesivamente.

El término "que exhibe (por ejemplo, exhibe, o que tiene, o tiene) una actividad de interferón-alfa" se pretende que indique que el polipéptido o conjugado de la invención tiene al menos una actividad exhibida por un polipéptido de referencia tipo interferón-alfa (tal como, por ejemplo, un polipéptido de interferón-alfa de humano, por

59

ejemplo, hIFN-alfa 2b identificado en la presente invención como SEQ ID NO: 46, hIFN-alfa 2a identificado en la presente invención como SEQ ID NO: 47, hIFN-alfa 8b identificado en la presente invención como SEQ ID NO: 51, o cualquier otro polipéptido tipo interferón alfa conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, aquellos listados en Allen G. y Diaz M.O. (1996, anteriormente mencionado)). Dicha actividad incluye la capacidad de señalizar a través de un receptor de interferón-alfa, como se evidencia por, por ejemplo, uno o más de: inhibición de la replicación viral en células infectadas por virus ("actividad antiviral"); mejora de la diferenciación de células-T sin afección a un fenotipo T_H1 y/o supresión de la diferenciación de células-T sin afección a un fenotipo T_H2 ("actividad de diferenciación T_H1 "); o inhibición de la proliferación celular ("actividad antiproliferativa"). La una o más actividades de interferón-alfa se ensayan utilizando ensayos conocidos en la técnica y/o descritos en los ejemplos.

Un polipéptido o un conjugado que exhibe una actividad de interferón-alfa se considera que tiene dicha actividad cuando exhibe una actividad mensurable, por ejemplo, una actividad antiviral mensurable, actividad antiproliferativa, o actividad de diferenciación T_H1 (por ejemplo, como se determina por los ensayos conocidos en la técnica y/o descritos en los ejemplos). Un experto en la técnica reconoce que lo que constituye una actividad mensurable depende en parte de la naturaleza del ensayo a ser realizado, pero como una guía general una actividad mensurable es una en la cual la señal del ensayo generada en la presencia del compuesto prueba (por ejemplo, un polipéptido de la invención) se cuantifica de manera diferente en comparación con la señal del ensayo generada en la ausencia del compuesto prueba. Se debe entender que un polipéptido o conjugado de la invención no necesita exhibir todas las actividades

conocidas de un interferón-alfa particular de referencia, o exhibe dichas actividades al mismo grado que el interferón-alfa de referencia. En algunos casos la actividad exhibida por un polipéptido o conjugado de la invención (como se evidencia, por ejemplo, por una EC_{50} , actividad específica, u otro valor relacionado con actividad) puede ser

5 aproximadamente igual a, menor que, o mayor que la actividad particular exhibida por el interferón-alfa de referencia.

Una "variante" es un polipéptido que comprende una secuencia la cual difiere en una o más posiciones del aminoácido en comparación con una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, una variante puede comprender una secuencia la

10 cual difiere de la secuencia polipeptídica parental en hasta 10% del número total de residuos de la secuencia polipeptídica parental, tal como en hasta 8% de los residuos, por ejemplo, en hasta 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% del número total de residuos de la secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, una variante de SEQ ID NO: 1 puede comprender una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 1 en 1-16 posiciones de

15 aminoácidos (tal como en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos), por ejemplo en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos,

20 en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos.

El término "polipéptido parental" o "interferón-alfa parental" se pretende que indique la secuencia polipeptídica a ser modificada de conformidad con la presente

invención. La secuencia polipeptídica parental puede ser aquella de un IFN-alfa que se presenta de manera natural (tal como un IFN-alfa de mamífero, por ejemplo, un IFN-alfa de primate, tal como un IFN-alfa de humano, tal como un polipéptido huIFN-alfa identificado en la presente invención como SEQ ID NOs: 45-57, u otra secuencia huIFN-alfa tal como aquella descrita en la presente invención y/o en Allen G. y Diaz M.O. (1996), anteriormente mencionado). La secuencia polipeptídica parental puede ser aquella de un interferón-alfa que no se presenta de manera natural (por ejemplo, "sintético"), tal como IFN-alfa Con1 (SEQ ID NO: 58). En algunos casos, el polipéptido parental a ser modificado puede ser él mismo un polipéptido de la invención, tal como, por ejemplo, cualesquiera de SEQ ID NOs: 2-35 y SEQ ID NOs: 37-44.

"Que se presenta de manera natural" como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que el objeto se puede encontrar en en la naturaleza como una forma distinta a la producida artificialmente por el hombre. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia polipeptídica que está presente en un organismo (incluyendo virus, bacterias, protozoos, insectos, plantas o tejido de mamífero) que se puede aislar a partir de una fuente en la naturaleza y el cual no ha sido modificado de manera intencional por el hombre en el laboratorio es aquel que se presenta de manera natural. "Que no se presenta de manera natural" (también denominado "sintético" o "artificial") como se aplica a un objeto significa que el objeto no se presenta de manera natural — por ejemplo, el objeto no se puede encontrar en la naturaleza como una forma distinta a la producida artificialmente por el hombre.

Un "fragmento" o "subsecuencia" es cualquier porción de una secuencia completa, que no incluye la secuencia total. Por lo tanto, un fragmento o subsecuencia se

61
refiere una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos que comprende una parte de una secuencia más larga de aminoácidos (por ejemplo, polipéptido) o ácidos nucleicos (por ejemplo, polinucleótido).

Un tipo de fragmento contemplado por la presente invención es un
5 fragmento en el cual los residuos de aminoácidos se remueven a partir del extremo N terminal o del extremo C terminal del polipéptido parental (o ambos); dicho polipéptido se considera que está "N terminalmente truncado" o "C terminalmente truncado", respectivamente. Se sabe que la delección de al menos los primeros cuatro aminoácidos a partir del extremo N terminal no afectan significativamente la actividad de interferón-alfa
10 (Lydon, N.B. et al. (1985) Biochemistry 24: 4131-41). Además, se han descrito las variantes que retienen la actividad de interferón-alfa en donde entre 7 y 11 aminoácidos han sido deletados a partir del extremo C terminal (Cheetham B. F. et al. (1991) Antiviral Res. 15 (1): 27- 39; Chang N.T. et al. (1983) Arch. Biochem Biophys. 221 (2): Franke A.E. et al. (1982) ADN 1 (3): 223-230).

15 Un "receptor" por ejemplo, un "receptor de interferón-alfa" (también conocido como un "receptor de interferón tipo I") es un receptor el cual se activa en células por un interferón-alfa, por ejemplo, se une a un interferón-alfa e inicia la señalización intracelular, tal como un receptor de interferón tipo I que comprende las subunidades del receptor IFNAR-2 e IFNAR-1 (Domanski et al. (1998) J. Biol. Chem. 273
20 (6): 3144-3147; Mogensen et al., (1999) Journal of Interferon and Cytokine Research, 19: 1069-1098). En el contexto de esta invención, también se pretende que el receptor incluya formas truncadas de una molécula de longitud total del receptor, tal como por ejemplo una molécula receptora la cual carece de una porción para unión a la membrana,

23

b2

tal como una forma soluble de una molécula receptora (también conocido como un "receptor soluble") la cual comprende un dominio de unión extracelular, el cual se une a un interferón-alfa, pero necesariamente no se une a una membrana y/o inicia la señalización intracelular.

- 5 Una "afinidad de unión específica" entre las dos moléculas, por ejemplo, un ligando y un receptor, significa una unión preferencial de una molécula por otra en una mezcla de moléculas. La unión de las moléculas típicamente se considera específica si la afinidad de unión es de aproximadamente $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a aproximadamente $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ o mayor (por ejemplo, K_D de aproximadamente 10^{-4} a 10^{-9} M o menor). La afinidad de unión
- 10 de un ligando y un receptor se puede medir mediante técnicas estándar conocidas por aquellos expertos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de técnicas bien conocidas para la medición de las afinidades de unión incluyendo tecnología Biacore® (Biacore AB, Suecia), microcalorimetría por titulación isotérmica (MicroCal LLC, Northampton, MA EUA), ELISA, y FACS. Por ejemplo, FACS u otros métodos para clasificación se pueden
- 15 utilizar para seleccionar poblaciones de moléculas (tales como por ejemplo, ligandos que se exhiben en la superficie celular) las cuales se unen específicamente al miembro par de unión asociado (tal como un receptor, por ejemplo, un receptor soluble). Los complejos ligando-receptor se pueden detectar y seleccionar por ejemplo, mediante fluorescencia (por ejemplo, mediante la reacción del complejo con un anticuerpo fluorescente que
- 20 reconoce el complejo). Las moléculas de interés las cuales se unen a un miembro par de unión asociado (por ejemplo, receptor) se agrupan y re-clasifican en la presencia de concentraciones menores del receptor. Mediante la realización de múltiples rondas de selección en la presencia de concentraciones decrecientes del receptor (se obtiene un

CA

intervalo de concentración ejemplar que se encuentra en el orden de 10^{-6} M hacia abajo hasta 10^{-9} M, por ejemplo, 1 micromolar (μ M) hacia abajo hasta 1 nanomolar (nM), o menor, dependiendo de la naturaleza de la interacción del ligando-receptor), se pueden aislar las poblaciones de la molécula de interés que exhiben actividad de unión específica para el receptor.

Un polipéptido, ácido nucleico, u otro componente está "aislado" cuando está parcialmente o completamente separado a partir de componentes con los cuales normalmente está asociado (otros péptidos, polipéptidos, proteínas (incluyendo complejos, por ejemplo, polimerasas y ribosomas los cuales pueden acompañar una secuencia nativa), ácidos nucleicos, células, reactivos sintéticos, contaminantes celulares, componentes celulares, etc.), por ejemplo, tal como a partir de otros componentes con los cuales normalmente están asociados en la célula a partir de la cual se derivan originalmente. Un polipéptido, ácido nucleico, u otro componente está aislado cuando se recupera o separa parcialmente o completamente a partir de otros componentes de su ambiente natural de tal manera que es la especie predominante presente en una composición, mezcla, o colección de componentes (por ejemplo, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En algunos casos, la preparación consiste de más de aproximadamente 60%, 70% ó 75%, típicamente más de aproximadamente 80%, o preferiblemente más de aproximadamente 90% de especies aisladas.

Un ácido nucleico "sustancialmente puro" o "aislado" (por ejemplo, ARN o ADN), polipéptido, proteína, o composición también significa cuando las especies objeto (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) comprende al menos aproximadamente 50, 60,

o 70 por ciento en peso (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Una composición sustancialmente pura o aislada también puede comprender al menos aproximadamente 80, 90, o 95 por ciento en peso de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. La especie objeto aislada también se puede purificar esencialmente hasta homogeneidad (las especies contaminantes no pueden ser detectadas en la composición mediante métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente de derivados de una especie macromolecular particular. El término "purificado" generalmente denota que un ácido nucleico, polipéptido, o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético. Típicamente significa que el ácido nucleico, polipéptido, o proteína es al menos aproximadamente 50% pura, 60% pura, 70% pura, 75% pura, más preferiblemente al menos aproximadamente 85% pura, y más preferiblemente al menos aproximadamente 99% pura.

El término "ácido nucleico aislado" se puede referir a un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que no está inmediatamente contiguo con ambas secuencias codificantes con las cuales está inmediatamente contiguo (por ejemplo, uno en el extremo 5' y uno en el extremo 3') en el genoma que se presenta de manera natural del organismo a partir del cual se deriva el ácido nucleico de la invención. Por lo tanto, este término incluye, por ejemplo, un fragmento de ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por el tratamiento de endonucleasa de restricción, cualquier fragmento de ADNc o fragmento de ADN genómico que se incorpore dentro de un vector, se integra dentro del genoma de la misma especie o de una especie diferente a la del organismo, incluyendo, por ejemplo, un virus, a partir del

cual se deriva originalmente, asociado a una secuencia codificante adicional para formar un gen híbrido que codifica un polipéptido quimérico, o un polipéptido independiente de cualesquiera otras secuencias de ADN. El ADN puede ser de cadena doble o de cadena sencilla, sentido o antisentido.

- 5 Un "polinucleótido recombinante" o un "polipéptido recombinante" es un polinucleótido o polipéptido que no se presenta de manera natural el cual puede incluir secuencias de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, a partir de más de un ácido nucleico o polipéptido fuente, dicha fuente de ácido nucleico o polipéptido puede ser un ácido nucleico o polipéptido que se presenta de manera natural, o puede ser sometida a mutagénesis o a otro tipo de modificación. Un ácido nucleico o polipéptido puede ser considerado "recombinante" cuando es sintético o artificial o diseñado, o se deriva a partir de un polipéptido o ácido nucleico sintético o artificial o diseñado. Un ácido nucleico recombinante (por ejemplo, ADN o ARN) se puede elaborar mediante la combinación (por ejemplo, combinación artificial) de al menos dos segmentos
- 10 de secuencia que típicamente no se incluyen juntos, típicamente no están asociados entre sí, o típicamente se separan de otra manera entre sí. Un ácido nucleico recombinante puede comprender una molécula de ácido nucleico formada mediante la unión o combinación de segmentos de ácido nucleico a partir de diferentes fuentes y/o sintetizado de manera artificial. Un "polipéptido recombinante" frecuentemente se refiere
- 15 a un polipéptido que resulta a partir de un ácido nucleico clonado o recombinante. La fuente de polinucleótidos o polipéptidos a partir de la cual se derivan las diferentes secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos algunas veces son homólogas (por ejemplo, tienen, o codifican un polipéptido que codifica, la misma estructura y/o función o
- 20

67

67

una estructura y/o función similar), y frecuentemente son a partir de diferentes aislados, serotipos, cepas, especies de organismo o a partir de diferentes estados de enfermedad, por ejemplo.

El término "recombinante" cuando se utiliza con referencia, por ejemplo, a una célula, polinucleótido, vector, proteína, o polipéptido típicamente indica que la célula, polinucleótido, o vector ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo (o extraño) o mediante la alteración de un ácido nucleico nativo, o que la proteína o polipéptido ha sido modificado mediante la introducción de un aminoácido heterólogo, o que la célula se deriva a partir de una célula así modificada. Las células recombinantes expresan secuencias de ácidos nucleicos que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o que expresan secuencias de ácidos nucleicos nativos que de otra manera podrían expresarse anormalmente, sub-expresarse, o no expresarse del todo. El término "recombinante" cuando se utiliza con referencia a una célula indica que la célula replica un ácido nucleico heterólogo, o expresa un polipéptido codificado por un ácido nucleico heterólogo. Las células recombinantes pueden contener secuencias codificantes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula. Las células recombinantes también pueden contener secuencias codificantes encontradas en la forma nativa de la célula en donde las secuencias codificantes están modificadas y se re-introducen dentro de la célula mediante medios artificiales. El término también comprende células que contienen un ácido nucleico endógeno a la célula que ha sido modificada sin remover el ácido nucleico a partir de la célula; dichas modificaciones incluyen aquellas obtenidas mediante reemplazos de genes, mutación sitio específica, recombinación, y técnicas relacionadas.

El término "recombinantemente producido" se refiere una combinación artificial que usualmente se logra ya sea mediante medios de síntesis química, recombinación de secuencia recursiva de segmentos de ácido nucleico u otros métodos de generación de diversidad (tal como, por ejemplo, recambio) de nucleótidos, o manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética conocidas por aquellos expertos en la técnica. "Recombinantemente expresado" típicamente se refiere a técnicas para la producción de un ácido nucleico recombinante in vitro y la transferencia del ácido nucleico recombinante dentro de las células in vivo, in vitro, o ex vivo en donde éste se puede expresar o propagar.

Un "cassette de expresión recombinante" o simplemente un "cassette de expresión" es una construcción de ácido nucleico, generada de manera recombinante o sintética, con elementos de ácidos nucleicos que son capaces de afectar la expresión de un gen estructural en hospederos compatibles con dichas secuencias. Los cassettes de expresión incluyen al menos promotores y opcionalmente, señales para terminación de la transcripción. Típicamente, el cassette de expresión recombinante incluye un ácido nucleico a ser transcrito (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica a polipéptido deseado), y un promotor. Los factores adicionales necesarios o auxiliares para afectar la expresión también se pueden utilizar como se describe en la presente invención. Por ejemplo, un cassette de expresión también puede incluir secuencias nucleotídicas que codifican una secuencia señal que dirige la secreción de una proteína expresada a partir de la célula hospedera. Las señales para terminación de la transcripción, potenciadores, y

otras secuencias de ácidos nucleicos que influyen la expresión génica, también se puede incluir en un cassette de expresión.

Un "inmunógeno" se refiere a una sustancia capaz de provocar una respuesta inmune, e incluye, por ejemplo, antígenos, autoantígenos que desempeñan un papel en la inducción de las enfermedades autoinmunes, y antígenos asociados con tumores expresados en células cancerosas. Generalmente una respuesta inmune se refiere al desarrollo de una respuesta celular o una respuesta mediada por el anticuerpo a un agente, tal como un antígeno o fragmento del mismo o ácido nucleico que codifica dicho agente. En algunos casos, dicha respuesta comprende una producción de al menos una o una combinación de células CTLs, células B, o varias clases de células T que se dirigen específicamente a las células presentadoras del antígeno que expresan el antígeno de interés.

Un "antígeno" se refiere a una sustancia que es capaz de inducir la formación de anticuerpos en un hospedero o que genera una población específica de linfocitos reactivos con esa sustancia. Los antígenos típicamente son macromoléculas (por ejemplo, proteínas y polisacáridos) que son externas al hospedero.

Un "adyuvante" se refiere a una sustancia que mejora las propiedades estimulantes inmunes del antígeno o el efecto(s) farmacológico de un fármaco. Un adjuvant puede mejorar de manera no específica la respuesta inmune a un antígeno. El "adyuvante completo de Freund", por ejemplo, es una emulsión de aceite y agua que contienen un inmunógeno, un agente emulsificante y micobacterias. Otra ejemplo, el "adyuvante incompleto de Freund", es el mismo, pero si la micobacteria.

Un vector es un componente o composición para facilitar la transducción o transfección de la célula mediante un ácido nucleico seleccionado, o la expresión del ácido nucleico en la célula. Los vectores incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, virus, YACs, bacterias, poli-lisina, etc. Un "vector de expresión" es una construcción de ácido nucleico o secuencia, generada de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos específicos de ácido nucleico que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula hospedera. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o fragmento de ácido nucleico. Típicamente el vector de expresión incluye un ácido nucleico a ser operativamente transcrito asociado a un promotor. El ácido nucleico a ser transcrito típicamente se encuentra bajo la dirección o control del promotor.

"Sustancialmente la longitud total de una secuencia polipeptídica" o "sustancialmente la longitud total de una secuencia polipeptídica" se refiere a al menos 50%, generalmente al menos aproximadamente 60%, 70%, o 75%, usualmente al menos aproximadamente 80%, o típicamente al menos aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de una longitud de una secuencia polipeptídica o secuencia polipeptídica.

El término "inmunoensayo" incluye un ensayo que utiliza un anticuerpo o inmunógeno para unirse o unirse específicamente a un antígeno. El inmunoensayo típicamente se caracteriza por el uso de propiedades específicas de unión de un anticuerpo particular para aislar, dirigir, y/o cuantificar el antígeno.

El término "sujeto" como se utiliza en la presente invención incluye, pero no se limita a, un organismo; un mamífero, incluyendo, por ejemplo, un humano, primate no

humano (por ejemplo, babuino, orangután, mono), ratón, cerdo, vaca, cabra, gato, conejo, rata, conejillo de Indias, hámster, caballo, mono, oveja, u otro mamífero no humano; un no mamífero, incluyendo, por ejemplo, un vertebrado no mamífero, tal como un ave (por ejemplo, un pollo o un pato) o un pez, y un invertebrado no mamífero.

5 El término "composición farmacéutica" significa una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto, incluyendo un animal o humano. Una composición farmacéutica generalmente comprende una cantidad efectiva de un agente activo y un vehículo, incluyendo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 El término "cantidad efectiva" significa una dosis o cantidad adecuada para producir un resultado deseado. El resultado deseado puede comprender una mejora objetiva o subjetiva en el recipiente de la dosis o cantidad.

Un "tratamiento profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto el cual no exhibe signos o síntomas de una enfermedad, patología, o trastorno médico, o exhibe solamente signos o síntomas tempranos de una enfermedad, patología, o trastorno, de tal manera que el tratamiento se administra para el propósito de disminuir, prevenir, o disminuir el riesgo de desarrollar la enfermedad, patología, o trastorno médico. Un tratamiento profiláctico funciona como un tratamiento preventivo en contra de una enfermedad o trastorno. Una "actividad profiláctica" es una actividad de un agente, tal como un ácido nucleico, vector, gen, polipéptido, proteína, sustancia, o composición de la misma, cuando se administra un sujeto el cual no exhibe signos o síntomas de patología, enfermedad o trastorno, o el cual exhibe solamente signos o síntomas tempranos de patología, enfermedad, o trastorno, disminuye, previene, o disminuye el riesgo del sujeto de desarrollar una patología, enfermedad, o trastorno. Un agente o compuesto

15

20

71

"profilácticamente útil" (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) se refiere a un agente o compuesto que es útil para disminuir, prevenir, tratar, o disminuir el desarrollo de la patología, enfermedad o trastorno.

Un "tratamiento terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto el cual exhibe síntomas o signos de patología, enfermedad, o trastorno, en el cual el tratamiento se administra al sujeto para el propósito de disminuir o eliminar aquellos signos o síntomas de patología, enfermedad, o trastorno. Una "actividad terapéutica" es una actividad de un agente, tal como un ácido nucleico, vector, gen, polipéptido, proteína, sustancia, o composición de la misma, que elimina o disminuye los signos o síntomas de patología, enfermedad o trastorno, cuando se administra a un sujeto que padece de dichos signos o síntomas. Un agente o compuesto "terapéuticamente útil" (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) indica que un agente o compuesto es útil en la disminución, tratamiento, o eliminación de dichos signos o síntomas de una patología, enfermedad o trastorno.

El término "gen" se refiere ampliamente a cualquier segmento de ADN asociado con una función biológica. Los genes incluyen secuencias codificantes y/o secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Los genes también incluyen segmentos no expresados de ácido nucleico tipo ADN que, por ejemplo, forman secuencias para reconocimiento de otras proteínas (por ejemplo, promotor, potenciador, u otras regiones reguladoras). Los genes se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes, incluyendo clonación a partir de una fuente de interés o sintetizándolos a partir de información conocida o información de secuencia pronosticada, y pueden incluir secuencias diseñadas para que tengan parámetros deseados.

33

Generalmente, la nomenclatura utilizada a continuación y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, biología molecular, química de ácidos nucleicos, y química de proteínas descritos a continuación son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados por aquellos expertos en la técnica.

- 5 Las técnicas estándares, tales como aquellas que se describen en Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2a Edición), volúmenes 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 (en adelante "Sambrook") y Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc.
- 10 (1994, suplementado hasta 1999) (en adelante "Ausubel"), se utilizan para los métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, métodos de cultivo de células, e incorporación del transgén, por ejemplo, electroporación, inyección, pistola de genes, impresión a través de la piel, y lipofección. Generalmente, los pasos de síntesis y purificación de oligonucleótidos se llevan a cabo de conformidad con las especificaciones.
- 15 Generalmente las técnicas y procedimientos se llevan a cabo de conformidad con métodos convencionales en la técnica y con diversas referencias generales las cuales se proveen a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en la presente invención se conocen bien por aquellos expertos en la técnica y se proveen para la conveniencia del lector.

- 20 Como se utiliza en la presente invención, un "anticuerpo" se refiere a una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente o parcialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. El término anticuerpo se utiliza para que signifique anticuerpos completos y fragmentos de

unión de los mismos. Los genes reconocidos de inmunoglobulinas incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda; alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como una miríada de genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican ya sea como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, las cuales a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulina típica (por ejemplo, anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par teniendo una cadena "ligera" (aproximadamente 25 KDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 KDa). El N terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

Los anticuerpos también incluyen anticuerpos monoclonales compuestos de un solo brazo, anticuerpos de cadena sencilla, incluyendo anticuerpos Fv (sFv) de cadena sencilla en los cuales una cadena pesada variable y una cadena ligera variable están unidas (directamente o a través de un péptido enlazador) para formar un polipéptido continuo, así como diacuerpos, tricuerpos, y tetracuerpos (Pack et al. (1995) J Mol Biol 246: 28; Biotechnol 11: 1271; y Biochemistry 31: 1579). Los anticuerpos son, por ejemplo, policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos producidos por una librería de expresión Fab, o los similares.

El término "epítipo" significa un determinante protéico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipes usualmente consisten de agrupamientos

de moléculas de superficies químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y usualmente tienen características tridimensionales estructurales específicas, así como características específicas de cadena. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en tanto que la unión del primero
5 pero no del segundo se pierde en la presencia de solventes desnaturizantes.

Un "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo es un fragmento peptídico o polipeptídico del anticuerpo que se une a un antígeno. Un sitio de unión al antígeno se forma por aquellos aminoácidos del anticuerpo que contribuyen a, participan en, o afectan la unión del antígeno. Véase Scott, T. A. y Mercer, E. I., Concise
10 Encyclopedia: Biochemistry and Molecular Biology (de Gruyter, 3a edición 1997), y Watson, J. D. et al., Recombinant ADN (2a edición 1992) (en adelante "Watson, Recombinant ADN"), cada uno de los cuales se incorpora en la presente invención como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

El término "selección" describe, en general, un procedimiento que identifica
15 las moléculas óptimas de la presente invención, tales como, por ejemplo, polipéptidos de la invención, y polipéptidos de fusión relacionados incluyendo los mismos, y ácidos nucleicos que codifican todas esas moléculas. Se pueden utilizar varias propiedades de estas moléculas respectivas en la clasificación y selección, por ejemplo: una capacidad
de una molécula respectiva para unirse a un ligando o a un receptor, para inhibir la
20 proliferación celular, para inhibir la replicación viral en células infectadas por virus, para inducir o inhibir la producción celular de citocina, para alterar una respuesta inmune, por ejemplo, inducir o inhibir una respuesta inmune deseada, en un sistema de prueba o en una aplicación in vitro, ex vivo o in vivo. En el caso de los antígenos, se pueden utilizar

varias propiedades del antígeno en la selección y selección incluyendo expresión del antígeno, plegamiento, estabilidad, inmunogenicidad y presencia de epítopes a partir de varios antígenos relacionados.

La "selección" es una forma de selección en la cual la identificación y
5 separación física se logran simultáneamente mediante, por ejemplo, expresión de un marcador de selección, el cual, en algunas circunstancias genéticas, permite que las células expresen el marcador para sobrevivir mientras que otras células mueren (o viceversa). Los marcadores de selección incluyen, por ejemplo, luciferasa, beta-galactosidasa y proteína fluorescente verde, y o los similares. Los marcadores de
10 selección incluyen genes resistentes a fármacos y a toxinas, y o los similares. Otro modo de selección incluye la clasificación física basada en un evento detectable, tal como la unión de un ligando a un receptor, reacción de un sustrato con una enzima, o cualquier otro procedimiento físico el cual pueda generar una señal detectable ya sea directamente (por ejemplo, mediante la utilización de un sustrato o ligando cromogénico) o
15 indirectamente (por ejemplo, mediante la reacción con un anticuerpo secundario cromogénico). La selección mediante clasificación física se puede lograr mediante una variedad de métodos, tal como mediante FACS en formatos de célula completa o formatos de microgota.

Un ácido nucleico "exógeno", "segmento de ADN exógeno", "secuencia
20 heteróloga", o "ácido nucleico heterólogo", como se utiliza en la presente invención, es uno que se origina a partir de una fuente externa a la célula hospedera particular, o, si es a partir de la misma fuente, está modificada a partir de su forma original. Por lo tanto, un gen heterólogo en una célula hospedera incluye un gen que es endógeno a la célula

hospedera particular, pero que ha sido modificado. La modificación de una secuencia heteróloga en las aplicaciones descritas en la presente invención típicamente se presentan a través del uso de recombinación de secuencia recursiva. Los términos se refieren a un segmento de ADN el cual es externo o heterólogo a la célula, u homólogo a la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedera en la cual el elemento no se encuentra de manera ordinaria. Los segmentos de ADN exógeno se expresan para producir polipéptidos exógenos.

El término "ácido nucleico" se refiere a deoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en cualquier forma de cadena sencilla o de cadena doble. A menos que se limite específicamente, el término comprende ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales los cuales tienen similares propiedades de unión que el ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a la de los nucleótidos que se presentan de manera natural. A menos que se indique de otra manera, una secuencia particular de ácido nucleico también comprende de manera implícita variantes conservativamente modificadas de los mismos (por ejemplo, sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codón degenerado se pueden lograr mediante la generación de secuencias en las cuales la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) esta sustituida con bases mezcladas y/o residuos de deoxiinosina (Batzer et al. (1991) Nucleic Acid Res 19: 5081; Ohtsuka et al. (1985) J Biol Chem 260: 2605-2608; Cassol et al. (1992); Rossolini et al. (1994) Mol Cell Probes 8: 91-98). El término ácido nucleico se utiliza de manera intercambiable con gen, ADNc, y ARNm codificado por un gen.

El "ácido nucleico derivado a partir de un gen" se refiere a un ácido nucleico para cuya síntesis el gen, o una subsecuencia del mismo, ha servido finalmente como un molde. Por lo tanto, un ARNm, un ADNc retrotranscrito a partir de un ARNm, un ARN transcrito a partir de ese ADNc, un ADN amplificado a partir del ADNc, un ARN transcrito a partir del ADN amplificado, etc., son todos derivados a partir del gen y la detección de dichos productos derivados es indicativa de la presencia y/o abundancia del gen original y/o transcripción del gen en una muestra.

Un ácido nucleico está "operativamente asociado" cuando se coloca dentro de una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente asociado a una secuencia codificante si incrementa la transcripción de la secuencia codificante. Operativamente asociado significa que las secuencias de ADN que están asociadas típicamente son contiguas y, cuando es necesario unen dos regiones codificantes de la proteína, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, puesto que los potenciadores generalmente funcionan cuando se separan a partir del promotor en varias kilobases y las secuencias intrónicas pueden ser de longitudes variables, algunos elementos polinucleotídicos pueden estar operativamente asociados pero no ser contiguos.

El término "citocina" incluye, por ejemplo, interleucinas, interferones, quimocinas, factores de crecimiento hematopoiéticos, factores de necrosis tumoral y factores de crecimiento transformante. En general éstas son proteínas de bajo peso molecular que regulan la maduración, activación, proliferación, y diferenciación de células del sistema inmune.

En la presente descripción y reivindicaciones, cualquier referencia a "un" componente, por ejemplo en el contexto de una porción no polipeptídica, un residuo de aminoácidos, una sustitución, un regulador de pH, un catión, etc., se pretende que se refiere a uno o más de dichos componentes, a menos que se establezca de otra manera o a menos que sea evidente a partir del contexto particular que no es el caso. Por ejemplo, la expresión "un componente seleccionado a partir del grupo que consiste de A, B y C" se pretende que incluya todas las combinaciones de A, B y C, por ejemplo, A, B, C, A+B, A+C, B+C o A+B+C.

Se definen varios términos adicionales o se caracterizan de otra manera en la presente invención.

Moléculas y métodos de la invención

Las moléculas de la invención (por ejemplo, polipéptidos de la invención, conjugados de la invención, y ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos) son útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos los cuales responden al tratamiento mediante interferón-alfa, particularmente enfermedades asociadas con la infección viral, tal como, por ejemplo, infección por HCV.

Los pacientes con infección crónica por HCV tienen cargas virales típicamente en el intervalo de 10^4 - 10^7 copias de ARN de HCV/ml de suero antes del tratamiento. Después del tratamiento con IFN-alfa, la carga viral en estos pacientes característicamente lleva cabo dos fases log-lineales distintas de declinación (figura 1B; Neumann A.U., et al. (1998) Science 282: 103-107). La caída inicial rápida en la carga viral que se presenta dentro de los primeros dos días de terapia con IFN-alfa se cree que

se debe a la reducción mediana por el interferón-alfa en la producción del virus en las células hepáticas infectadas y la protección concomitante de las células sin afección en contra de la infección. La velocidad de producción viral alcanza un nuevo estado estacionario aproximadamente a los dos días, tiempo en el cual se observa una segunda fase log-lineal menos rápida phase de eliminación viral. Generalmente se cree que esta segunda fase de eliminación viral se debe en parte a la eliminación de células hepáticas infectadas mediana por célula-T (Neumann, et al., anteriormente mencionado). Se cree que IFN-alfa desempeña un papel importante en esta respuesta biológica a través de la estimulación de células T específicas al antígeno para diferenciarse hacia células T_H1 . Además, se cree que el modo de acción de Ribavirin se debe al aumento de la respuesta T_H1 , y se piensa que son las bases mecánicas de su eficiencia en la terapia de combinación con IFN-alfa. Los pacientes infectados con HCV que no responden a las terapias con interferón-alfa actualmente se encuentran en uso (generalmente denominados "que no responden") exhiben perfiles mucho más bajos de eliminación de carga viral (figura 1A).

Aunque no se pretende que la presente invención se limite a una teoría particular del mecanismo subyacente, se propone que la actividad antiviral en sistemas de ensayo sustituto (tales como aquellos descritos con mayor detalle en la presente invención) pueden ser predictivos de la eficiencia del interferón-alfa, en por ejemplo la primera fase de la eliminación viral. Los ensayos antivirales ejemplares, descritos en la sección de ejemplos, monitorean la efectividad del IFN-alfa en la protección en contra del efecto citopático del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) en células derivadas de hígado de humano HuH7 como un sistema sustituto para efectividad en contra de HCV en

células hepáticas de humano. Otros sistemas de ensayo de virus/célula útiles incluyen EMCV en células derivadas del amnios de humano WISH, EMCV en células de carcinoma cervical de humano HeLa, virus de la estomatitis vesicular (VSV) en células HuH7, virus de vaccinia (VV) en células HeLa, virus de la fiebre amarilla (YFV) en células de hepatocarcinoma de humano HepG2, así como virus de inmunodeficiencia de humano (VIH) en células T CD4+ primarias. El ejemplo 2 muestra actividades antivirales de polipéptidos representativos de la invención en los ensayos de actividad antiviral EMCV/HuH7 y EMCV/HeLa.

Otros sistemas de ensayo sustituto útiles para monitorear la efectividad en contra de HCV en hepatocitos infectados incluyen sistemas de replicón HCV, como se describe, por ejemplo, por Lohmann V., et al., (1999) *Science* 285 (5424): 285-293; G. y Rice C. M. (2001) *Curr Opin Infect Dis* 14 (6): 743-7477; Bartenschlager, R. (2002) *Nature Reviews/Drug Discovery* 1: 911. Un ejemplo de un sistema útil de hospedero in vivo para el monitoreo de eficiencia antiviral contra HCV es un ratón SCID quimérico hígado de humano, como se describe por Mercer, et al. (2001) *Nature Medicine* 7(8): 927-933.

Se propone adicionalmente, sin limitarse por la teoría, que la mejoría de la diferenciación por T_H1 y/o supresión de la diferenciación por T_H2 mediante IFN-alfa puede ser un factor que contribuya a la eficiencia del interferón-alfa, por ejemplo, en la segunda fase de eliminación viral. De conformidad con esta teoría, se podría pronosticar que los IFN-alfa evolucionaron con potencia incrementada en estas actividades biológicas (por ejemplo, mejoría de la diferenciación por T_H1 y/o supresión de la diferenciación por T_H2) tienen eficiencia incrementada en relación con, por ejemplo, las moléculas terapéuticas actualmente aprobadas de interferón-alfa administradas a la misma dosis. Un ensayo

ejemplar, descrito en la sección de ejemplos en la presente invención, monitorea la
mejoría de la diferenciación por T_H1 y/o la supresión de la diferenciación por T_H2 IFN-alfa
sobre las células T_H0 sin afección, mediante la medición de la producción de citocinas
asociadas con el fenotipo T_H1 (por ejemplo, IFN-gamma) y/o el fenotipo T_H2 (por ejemplo,
5 IL-5, IL4) vía ELISA o vía tinción intracelular y selección por FACS. El ejemplo 3 muestra
las actividades de diferenciación por T_H1 de polipéptidos representativos de la invención.

La eficiencia terapéutica de las moléculas de IFN-alfa tiende a estar
disminuida en parte debido a las toxicidades limitantes de la dosis, por ejemplo
trombocitopenia y neutropenia. Aunque la presente invención no se pretende que se
10 limite por una teoría particular particular del mecanismo subyacente, se propone que
dicha toxicidad pueda estar asociada con efectos anti-proliferativos de IFN-alfa sobre
precursores de plaquetas y neutrófilos, y esa actividad antiproliferativa en sistemas de
ensayo sustituto (tales como aquellos descritos en la presente invención) pueden
pronosticar la toxicidad relativa de una molécula de interferón-alfa. Por lo tanto, las
15 toxicidades limitantes de dosis asociadas con la terapia con IFN-alfa se pueden
disminuir en las moléculas de IFN-alfa que exhiben actividad antiproliferativa reducida en
relación con, por ejemplo, moléculas terapéuticas actualmente aprobadas de interferón-
alfa, tal como ROFERON®-A (interferón alfa-2a, recombinante; Hoffmann-La Roche Inc.),
INTRON® A (interferón alfa-2b, recombinante; Schering Corporation), y INFERGEN®
20 (interferón alfacon-1; InterMune, Inc.). Un ensayo ejemplar de la actividad antiproliferativa,
descrito en la sección de ejemplos de la presente invención, monitorea el efecto de IFN-
alfa sobre la proliferación de células linfoides de humano Daudi. Alternativamente, o en
adición, las toxicidades limitantes de dosis se pueden reducir como un resultado de la

administración de moléculas más terapéuticamente activas, las cuales podrían permitir la dosificación en concentraciones menores o a una menor frecuencia que las moléculas actualmente aprobadas. El ejemplo 4 muestra que las actividades antiproliferativas Daudi de polipéptidos representativos de la invención.

5 Es un objetivo de la invención provee polipéptido de interferón-alfa novedosos, y ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos. Los polipéptidos de la invención son útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos los cuales responden al tratamiento mediante interferón-alfa, particularmente enfermedades asociadas con la infección viral, tales como, por ejemplo, infección por HCV. Algunos

10 polipéptidos de la invención exhiben una actividad de interferón-alfa, tal como, por ejemplo, actividad antiviral, actividad antiproliferativa, y/o actividad diferenciación por T_H1 . Algunos polipéptidos de la invención exhiben una o más de las siguientes propiedades: actividad antiviral incrementada o disminuida en comparación con un polipéptido IFN-alfa de referencia; actividad de diferenciación por T_H1 incrementada o disminuida en

15 comparación con un polipéptido IFN-alfa de referencia; actividad antiproliferativa incrementada o disminuida en comparación con un polipéptido IFN-alfa de referencia. El polipéptido IFN-alfa de referencia puede comprender una secuencia de un interferón-alfa que no se presenta de manera natural, tal como IFN-alfa Con 1 (SEQ ID NO: 58), o puede comprender una secuencia de un polipéptido de interferón-alfa que se presenta de

20 manera natural (por ejemplo, de tipo silvestre). Los ejemplos de secuencias de polipéptidos de interferón-alfa que se presentan de manera natural incluyen secuencias de polipéptido IFN-alfa de humano, tales como, por ejemplo, huIFN-alfa 2b (SEQ ID NO: 46), huIFN-alfa 2a (SEQ ID NO: 47), huIFN-alfa 2c (SEQ ID NO: 46 con la posición 34 =

82

84

Arg), huiFN-alfa 8b (SEQ ID NO: 52), huiFN-alfa 8a (SEQ ID NO: 52 con las posiciones 98 = Val, 99 = Leu, 100 = Cys, y 101 = Asp), huiFN-alfa 8c (SEQ ID NO: 52 con la posición 161 = Asp y los aminoácidos en las posiciones 162-166 deletados), huiFN-alfa 14a (SEQ ID NO: 54), huiFN-alfa 14c (SEQ ID NO: 54 con la posición 152 = Leu), o una
5 secuencia de cualquier otro polipéptido de interferón alfa de humano que se presenta de manera natural, tales como aquellos listados en Allen G. y Diaz M.O. (1996), anteriormente mencionado.

En otro aspecto, la invención provee polipéptidos de interferón-alfa los cuales exhiben eficiencia mejorada en la eliminación de un virus a partir de las células
10 infectadas por virus, en comparación con una molécula de interferón-alfa de referencia, tal como una actualmente empleada como un terapéutico (tal como, por ejemplo, ROFERON-A, INTRON A, o INFERGEN). Los virus ejemplares incluyen, pero no se limitan a, virus de la familia Flaviviridae, tales como, por ejemplo, virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus oriental del Nilo, virus de la encefalitis japonesa, virus del
15 dengue, y virus de la diarrea viral de bovino; virus de la familia HepaADNviridae, tales como, por ejemplo, virus de la hepatitis B; virus de la familia Picornaviridae, tales como, por ejemplo, virus de la encefalomiocarditis, rinovirus de humano, y virus de la hepatitis A; virus de la familia Retroviridae, tales como, por ejemplo, virus de inmunodeficiencia de humano, virus de inmunodeficiencia de simio, virus linfotrópico T de humano, y virus del
20 sarcoma de Rous; virus de la familia Coronaviridae, tales como, por ejemplo, coronavirus de SARS; virus de la familia Rhabdoviridae, tal como, por ejemplo, virus de la rabia y virus de la estomatitis vesicular, virus de la familia Paramixoviridae, tales como, por ejemplo, virus sincitial respiratorio y virus de la Parainfluenza, virus de la familia

Papillomaviridae, tal como, por ejemplo, papilomavirus de humano, y virus de la familia Herpesviridae, tales como, por ejemplo, virus del Herpes Simplex. Dicha eficiencia mejorada se puede generar a partir de actividad antiviral mejorada, actividad mejorada de diferenciación por T_H1 , o ambas, en relación con la molécula de referencia. Por ejemplo,

5 algunos polipéptidos de interferón-alfa de la invención se pueden utilizar particularmente en la eliminación de virus o de cepas virales que muestran una escasa respuesta al tratamiento con las moléculas de interferón-alfa actualmente en uso, tal como, por ejemplo, el genotipo 1 de HCV.

Algunos polipéptidos de la invención exhiben una relación incrementada de

10 (actividad antiviral/actividad antiproliferativa) en comparación con la molécula de IFN-alfa de referencia, y/o una relación incrementada de (actividad diferenciación por T_H1 /actividad antiproliferativa) en comparación con la molécula de IFN-alfa de referencia. Los polipéptidos que exhiben dichas propiedades pueden ser particularmente efectivos en el tratamiento de infecciones virales, tales como, por ejemplo, infección por un virus

15 anteriormente listado. Algunos de dichos polipéptidos pueden proveer, por ejemplo, eficiencia terapéutica mejorada en comparación con las moléculas de interferón-alfa actualmente aprobadas en el tratamiento de HCV, en una o ambas fases del perfil bifásico de eliminación viral, y/o pueden exhibir toxicidad reducida. Algunos de dichos polipéptidos pueden proveer eficiencia terapéutica mejorada en comparación con las

20 moléculas de interferón-alfa actualmente aprobadas en el tratamiento del genotipo 1 HCV.

Es otro objetivo de la invención proveer conjugados, dichos conjugados comprenden una o más porciones no polipeptídicas asociadas con un polipéptido de la

invención, dicho conjugado exhibe una actividad de interferón-alfa (tal como uno o más de las actividades anteriormente mencionadas), y el cual exhibe opcionalmente otras propiedades deseables, tales como vida media incrementada en suero y/o vida media funcional in vivo, y/o antigenicidad disminuida, en comparación con el polipéptido no conjugado. Algunos de dichos conjugados pueden exhibir una eficiencia mejorada en la eliminación de un virus a partir de las células infectadas con el virus, en comparación con la molécula de interferón-alfa de referencia, tal como un conjugado de interferón-alfa actualmente empleado como un terapéutico (tal como, por ejemplo, PEGASYS® (Peginterferón alfa-2a; Hoffmann-La Roche, Inc.) o PEG-INTRON® (peginterferón alfa-2b; Schering Corporation)). Los virus ejemplares incluyen, pero no se limitan a, virus de la familia Flaviviridae, tales como, por ejemplo, virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus oriental del Nilo, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue, y virus de la diarrea viral de bovino; virus de la familia HepaADNviridae, tal como, por ejemplo, virus de la hepatitis B; virus de la familia Picomaviridae, tal como, por ejemplo, virus de la encefalomiocarditis, rinovirus de humano, y virus de la hepatitis A; virus de la familia Retroviridae, tales como, por ejemplo, virus de inmunodeficiencia de humano, virus de inmunodeficiencia de simio, virus linfotrópico T de humano, y virus del sarcoma de Rous; virus de la familia Coronaviridae, tales como, por ejemplo, coronavirus del SARS; virus de la familia Rhabdoviridae, tales como, por ejemplo, virus de la rabia y virus de la estomatitis vesicular, virus de la familia Paramixoviridae, tales como, por ejemplo, virus sincitial respiratorio y virus de la Parainfluenza, virus de la familia Papillomaviridae, tales como, por ejemplo, papilomavirus de humano, y virus de la familia Herpesviridae, tales como, por ejemplo, virus del Herpes Simplex. Dicha eficiencia mejorada se puede generar

a partir de la actividad antiviral mejorada, actividad de diferenciación por T_H1 mejorada, o ambas, en relación con la molécula de referencia. Por ejemplo, algunos conjugados de interferón-alfa de la invención pueden ser particularmente útiles en la eliminación de virus o de cepas virales que muestran una baja respuesta al tratamiento con moléculas del interferón-alfa actualmente en uso, tal como, por ejemplo, genotipo 1 de HCV.

Algunos conjugados de la invención exhiben una relación incrementada de (actividad antiviral/actividad antiproliferativa) en comparación con la molécula de IFN-alfa de referencia, y/o una relación incrementada de (actividad de diferenciación T_H1/actividad antiproliferativa) en comparación con la molécula de IFN-alfa de referencia. Los conjugados que exhiben dichas propiedades pueden ser particularmente efectivos en el tratamiento de las infecciones virales, tales como infecciones por un virus anteriormente listado, tal como, por ejemplo, HCV. Algunos de dichos conjugados pueden proveer, por ejemplo, eficiencia terapéutica mejorada en comparación con las moléculas de interferón-alfa actualmente aprobadas en el tratamiento de HCV, en una o ambas fases del perfil bifásico de eliminación viral, y/o pueden exhibir una toxicidad reducida. Algunos de dichos conjugados pueden proveer eficiencia terapéutica mejorada en comparación con las moléculas de interferón-alfa actualmente aprobadas en el tratamiento del genotipo 1 HCV.

Es otro objetivo de la invención el proveer un método para la inhibición de la replicación viral en células infectadas por virus, el método comprenden administrar a las células infectadas por el virus un polipéptido o conjugado de la invención en una cantidad efectiva para inhibir la replicación viral en dichas células. La invención también provee un método para la reducción del número de copias de un virus en células infectadas por el

virus, que comprende administrar a las células infectadas por el virus un polipéptido o conjugado de la invención en una cantidad efectiva para reducir el número de copias del virus en dichas células. El virus puede ser un virus de la familia Flaviviridae, tales como, por ejemplo, virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus oriental del Nilo, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue, o virus de la diarrea viral de bovino; un virus de la familia HepaADNviridae, tales como, por ejemplo, virus de la hepatitis B; un virus de la familia Picomaviridae, tales como, por ejemplo, virus de la encefalomiocarditis, rinovirus de humano, o virus de la hepatitis A; un virus de la familia Retroviridae, tales como, por ejemplo, virus de inmunodeficiencia de humano, virus de inmunodeficiencia de simio, virus linfotrópico T de humano, o virus del sarcoma de Rous; un virus de la familia Coronaviridae, tales como, por ejemplo, coronavirus del SARS; un virus de la familia Rhabdoviridae, tales como, por ejemplo, virus de la rabia o virus de la estomatitis vesicular; un virus de la familia Paramyxoviridae, tales como, por ejemplo, virus sincitial respiratorio o virus de la Parainfluenza; un virus de la familia Papillomaviridae, tales como, por ejemplo, papilomavirus de humano; o un virus de la familia Herpesviridae, tales como, por ejemplo, virus del Herpes Simplex. El virus puede ser por ejemplo un virus de ARN, tal como HCV, un virus de ADN, tal como HBV, o un retrovirus, tal como HIV. Las células pueden estar en cultivo o se pueden aislar de otra manera a partir de un mamífero (por ejemplo, in vitro o ex vivo), o puede estar in vivo, por ejemplo, en un mamífero (por ejemplo tal como un modelo de ratón SCID como se describe por Mercer, et al. (2001) Nature Medicine. 7 (8): en un primate, o en el hombre.

La invención también provee un método para la mejoría de la diferenciación por T_H1 de células T_H0 , que comprende la administración a una población que comprende

células T_H0 de un polipéptido o conjugado de la invención en una cantidad efectiva para incrementar la producción de una citocina asociada con el fenotipo de T_H1 (por ejemplo, IFN-gamma) y/o disminución de la producción de una citocina asociada con el fenotipo de T_H2 (por ejemplo, IL-4 o IL-5) en dicha población. La población puede estar en cultivo o de otra manera se puede aislar a partir de un mamífero (por ejemplo, in vitro o ex vivo), o puede estar in vivo, por ejemplo, en un mamífero, en un primate, o en el hombre.

La invención también provee un método para la inhibición de la proliferación de una población celular, que comprende poner en contacto la población celular con un polipéptido, variante, o conjugado de la invención en una cantidad efectiva para disminuir la proliferación de la población celular. La población celular puede estar en cultivo o se puede aislar de otra manera a partir de un mamífero (por ejemplo, in vitro o ex vivo), o puede estar in vivo, por ejemplo, en un mamífero, un primate, o el hombre.

Estos y otros objetivos de la invención se discuten con mayor detalle a continuación.

15

Polipéptidos de la invención

La invención provee polipéptidos novedosos de interferón-alfa, colectivamente referidos en la presente invención como "polipéptidos de la invención". El término "polipéptido(s) de la invención" se pretende que a lo largo de la descripción incluya variantes de las secuencias polipeptídicas descritas en la presente invención. También se incluyen en esta invención proteínas de fusión que comprenden polipéptidos de la invención, y conjugados que comprenden polipéptidos de la invención.

20

Fragmentos de diversas secuencias que codifican interferón-alfa se recombinaron de manera recursiva para formar librerías que comprenden polinucleótidos recombinantes, a partir de las cuales se derivan los polipéptidos de la invención. Los métodos para la obtención de librerías de polinucleótidos recombinantes y/o para la obtención de diversidad en los ácidos nucleicos utilizados como los sustratos para la recombinación de secuencia recursiva también se describen a continuación.

Los polipéptidos ejemplares de la invención incluyen polipéptidos que comprenden secuencias identificadas en la presente invención como SEQ ID NOs: 2-35 y SEQ ID NOs: 37-44 (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, y SEQ ID NO: 44). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, tal como, por ejemplo, una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de

90

aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 1 y (b) comprende una o más sustituciones a SEQ ID NO: 1 seleccionada a partir del grupo que consiste de F48A/L; V51P; F55A; F65A; F68P; L111A; y V114P. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 1 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1- 8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones en relación con la SEQ ID NO: 1 seleccionada a partir del grupo que consiste de H47Q; V51A; Q52P/E; A53T; F55S; L56V; F57L; Y58H; M61I; N113K; V114E; y E160D. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, tal como una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 1 y (b) comprende la sustitución F48A/L en relación

92

a1

con SEQ ID NO: 1. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 1 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. Algunos de dichos polipéptidos comprenden la sustitución F48A relativa a SEQ ID NO: 1.

10 En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; V51A/P; Q52P/E; A53T; F55A/S; L56V; F65A; F57L; Y58H; M61I; F68P; L111A; N113K; V114E/P; y E160D. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

20 La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: y (b) comprende la sustitución F55A relativa a SEQ ID NO: 1. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de

93

42

SEQ ID NO: 1 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; F48A/L; V51A/P; Q52P/E; A53T; L56V; F65A; F57L; Y58H; M61I; F68P; L111A; N113K; V114E/P; y E160D. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 1 y (b) comprende la sustitución F65A relativa a SEQ ID NO: 1. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 1 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en

94

23

1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1- 8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos.

5 En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; F48A/L; V51A/P; Q52P/E; A53T; F55A/S; L56V; F57L; Y58H; M61I; F68P; L111A; N113K; V114E/P; y E160D. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

15 La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere, en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 1 y (b) comprende la sustitución L111A relativa a SEQ ID NO: 1. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 1 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1- 8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos,

25

en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos.

En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; F48A/L;

5 V51A/P; Q52P/E; A53T; F55A/S; L56V; F65A; F57L; Y58H; M61I; F68P; N113K; V114E/P; y E160D. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-

alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más

aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. La

10 invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 0 a 16 posiciones de

15 aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 13 y (b) comprende uno o más de: Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 111; y Pro en la posición 114 (numeración de la posición

en relación con SEQ ID NO: 13). Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 13 en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

20 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 0-15 posiciones de aminoácidos,

en 0-14 posiciones de aminoácidos, en 0-13 posiciones de aminoácidos, en 0-12 posiciones de aminoácidos, en 0-11 posiciones de aminoácidos, en 0-10 posiciones de

aminoácidos, en 0-9 posiciones de aminoácidos, en 0-8 posiciones de aminoácidos, en 0-

as

7 posiciones de aminoácidos, en 0-6 posiciones de aminoácidos, en 0-5 posiciones de aminoácidos, en 0-4 posiciones de aminoácidos, en 0-3 posiciones de aminoácidos, en 0-2 posiciones de aminoácidos, o en 0-1 posiciones de aminoácidos. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una Ala o una Leu en la posición 48. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una Ala en la posición 48. En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones a SEQ ID NO: 13 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; V51A; Q52P/E; A53T; F55S; L56V; F57L; Y58H; M61I; N113K; V114E; y E160D. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende una o más sustituciones a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A; I24P; F48A/L; T51P; S55A; F65A; F68P; F90A; M93P; L111A; V114P; F124A; I127P; y E160D. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 36 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos,

99

en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de P26L; H47Q; T51 V; S55P/F; V56L; H58Y; L60M; F90Y; M93L; N95D; N113K; V114E; R125Q; T132K; y L154F. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, tal como una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende la sustitución F48A/L relativas a SEQ ID NO: 36. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 36 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1- 8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones

47

de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. Algunos de dichos polipéptidos comprenden la sustitución F48A relativa a SEQ ID NO: 36. En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A; I24P; P26L; H47Q; T51V/P; S55P/F/A; V56L; H58Y; L60M; F65A; F68P; F90Y/A; M93L/P; N95D; L111A; N113K; V114E/P; F124A; R125Q; I127P; T132K; L154F; y E160D. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende la sustitución F90A relativa a SEQ ID NO: 36. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 36 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1- 8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos.

48

En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A; I24P; P26L; H47Q; F48A/L; T51V/P; S55P/F/A; V56L; H58Y; L60M; F65A; F68P; M93L/P; N95D; L111A; N113K; V114E/P; F124A; R125Q; I127P; T132K; L154F; y E160D. En

5 algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos
10 nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende la sustitución E160D relativa a SEQ ID NO: 36. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere
15 de SEQ ID NO: 36 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1- 8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos,
20 en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 36 seleccionados a partir del grupo que consiste de M21A; I24P;

aa

P26L; H47Q; F48A/L; T51V/P; S55P/F/A; V56L; H58Y; L60M; F65A; F68P; F90Y/A; M93L/P; N95D; L111A; N113K; V114E/P; F124A; R125Q; I127P; T132K; y L154F. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa).

- 5 Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que (a) difiere en 0 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 38 y (b) comprende uno o más de: Ala en la posición 21; Pro en la posición 24; Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 90; Pro en la posición 93; Ala en la posición 111; Pro en la posición 114; Ala en la posición 124; Pro en la posición 127; y Glu en la posición 160 (numeración de la posición en relación con SEQ ID NO: 38). Algunos de dichos polipéptidos comprenden una secuencia la cual difiere de SEQ ID NO: 38 en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 0-15 posiciones de aminoácidos, en 0-14 posiciones de aminoácidos, en 0-13 posiciones de aminoácidos, en 0-12 posiciones de aminoácidos, en 0-11 posiciones de aminoácidos, en 0-10 posiciones de aminoácidos, en 0-9 posiciones de aminoácidos, en 0-8 posiciones de aminoácidos, en 0-7 posiciones de aminoácidos, en 0-6 posiciones de aminoácidos, en 0-5 posiciones de aminoácidos, en 0-4 posiciones de aminoácidos, en 0-3 posiciones de aminoácidos, en 0-2 posiciones de aminoácidos, o

101

en 0-1 posiciones de aminoácidos. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una Ala o a Leu en la posición 48. Algunos de dichos polipéptidos comprenden una Ala en la posición 48. En algunos casos, el polipéptido comprende adicionalmente una o más sustituciones a la SEQ ID NO: 38 seleccionados a partir del grupo que consiste de P26L; H47Q; V51T; F55P/S; L56V; Y58H; L60M; F90Y; M93L; N95D; N113K; V114E; R125Q; T132K; y F154L. En algunos casos, el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación T_H1 , y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. La invención también provee proteínas de fusión y conjugados que comprenden estos polipéptidos, y ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos.

Otras modificaciones contempladas por los polipéptidos de la invención incluyen aquellas descritas a continuación y en la sección titulada "conjugados de interferón-alfa".

Se debe entender que aunque los ejemplos y modificaciones al polipéptido parental generalmente se proveen en la presente invención en relación con la secuencia SEQ ID NO: 1 (o relativa a SEQ ID NO: 36, o relativa a alguna otra secuencia especificada), las modificaciones descritas también se pueden elaborar en posiciones equivalentes de aminoácidos de cualesquiera de los otros polipéptidos de la invención (tal como un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 2-35 y SEQ ID NOs: 37-44) descritos en la presente invención. Por lo tanto, como

101

un ejemplo, la sustitución F48L relativa a SEQ ID NO: 1 se entiende que corresponde a la sustitución A48L en SEQ ID NO: 13, y así sucesivamente.

Los siguientes cuadros proveen secuencias de algunos polipéptidos de interferón-alfa de la invención. Para claridad, las secuencias se muestran en relación con las secuencias de referencia SEQ ID NO: 1 (cuadro 1) o SEQ ID NO: 36 (cuadro 2). Algunos de dichos polipéptidos exhiben una actividad de interferón-alfa, tal como actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa.

CUADRO 1

Secuencia polipeptídica (relativa a SEQ ID NO: 1)	Nombre de la clona	SEQ ID
SEQ ID NO: 1	B9x14EC4	SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 1 F55P	14epi07	SEQ ID NO: 2
SEQ ID NO: 1 V51A Q52P F55S L56V F57L Y58H	14epi08	SEQ ID NO: 3
SEQ ID NO: 1 V51A Q52E A53T F55P L56V F57L Y58H	14epi09	SEQ ID NO: 4
SEQ ID NO: 1 V51A Q52E F55S L56V F57L Y58H	14epi10	SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 1 V51 A F55S L56A Y58H	14epi11	SEQ ID NO: 6
SEQ ID NO: 1 F48L E160D	14epi12d	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 1 H47Q	14epi13	SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 1 M611	14epi14	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 1 F48L	14epi15	SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 1 F48L F55A	14epi16	SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 1, F48L F55S	14epi17	SEQ ID NO: 12
SEQ ID NO: 1 F48A	14epi18	SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 1 F48A F55A	14epi19	SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 1 F48A F55S	14epi20	SEQ ID NO: 15
SEQ ID NO: 1 F55A	14epi21	SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 1 F55S	14epi22	SEQ ID NO: 17
SEQ ID NO: 1 F48A F55S L111A	14epi23	SEQ ID NO: 18

103

102

SEQ ID NO: 1 F48A F55S N113K V114E	14epi24	SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 1 F48L F55S L111A	14epi25	SEQ ID NO: 20
SEQ ID NO: 1 F48L F55S N113K V114E	14epi26	SEQ ID NO: 21
SEQ ID NO: 1 F48A F55S F65A L111A	14epi27	SEQ ID NO: 22
SEQ ID NO: 1 F48A F55S F65A N113K V114E	14epi28	SEQ ID NO: 23
SEQ ID NO: 1 F48A F55S F65A L111A	14epi29	SEQ ID NO: 24
SEQ ID NO: 1 F48A F55A L111A	14epi30	SEQ ID NO: 25
SEQ ID NO: 1 F48A F55A N113K V114E	14epi31	SEQ ID NO: 26
SEQ ID NO: 1 F48L Q52P F55S N113K V114E	14epi32	SEQ ID NO: 27
SEQ ID NO: 1 Q52P F55S N113K V114E	14epi33	SEQ ID NO: 28
SEQ ID NO: 1 Q52P F55S N113K V114E	14epi34	SEQ ID NO: 29
SEQ ID NO: 1 F48L V51A Q52P F55S L56V F57L Y58H N113K V114E	14epi35	SEQ ID NO: 30
SEQ ID NO: 1 V51A Q52E A53T F55P L56V F57L Y58H N113K V114E	14epi36	SEQ ID NO: 31
SEQ ID NO: 1 V51A F55S L56V F57L Y58H N113K V114E	14epi37	SEQ ID NO: 32
SEQ ID NO: 1 V51A Q52P F55S L56V F57L Y58H N113K V114E	14epi38	SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 1 H47Q F48A F55S	14epi39	SEQ ID NO: 34
SEQ ID NO: 1 H47Q F48A F55S L56V Y58H	14epi42	SEQ ID NO: 35

104

103

CUADRO 2

Secuencia polipeptídica (relativa a SEQ ID NO: 36)	Nombre de la clona	SEQ ID
SEQ ID NO: 36	25epi08	SEQ ID NO: 36
SEQ ID NO: 36 F48A L154F	25epi18	SEQ ID NO: 37
SEQ ID NO: 36 F48A T51 V S55F V56L H58Y L154F	25epi19	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 36 F48A T51 V V56L H58Y L154F	25epi20	SEQ ID NO: 39
SEQ ID NO: 36 F48A T51 V L154F	25epi25	SEQ ID NO: 40
SEQ ID NO: 36 F48A T51 V F90Y M93L N95D L154F	25epi26	SEQ ID NO: 41
SEQ ID NO: 36 F48A T51 V F90A R125Q L154F	25epi27	SEQ ID NO: 42
SEQ ID NO: 36 F48A T51 V F90Y M93L N95D R125Q L154F	25epi28	SEQ ID NO: 43
SEQ ID NO: 36 L154F E160D	25epi29	SEQ ID NO: 44

Variaciones de la secuencia

Como se mencionó anteriormente, los polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos que comprenden las secuencias las cuales difieren a partir de SEQ ID NO: en 1 a 16 posiciones de aminoácidos y que comprenden una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de F48A/L; V51P; F55A; F65A; F68P; L111A; y V114P. Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos que comprenden secuencias las cuales difieren a partir de SEQ ID NO: 36 en 1 a 16 posiciones de aminoácidos y que comprenden una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A; I24P;

105

F48A/L; T51P; S55A; F65A; F68P; F90A; M93P; L111A; V114P; F124A; I127P; y E160D.

Algunos de dichos polipéptidos exhiben una actividad de interferón-alfa.

Por ejemplo, algunos polipéptidos de la invención comprenden una secuencia que tiene una longitud de aproximadamente 151 aminoácidos, tales como

5 aproximadamente 151, 152; 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, o 165 aminoácidos, que corresponden a la delección de entre 1 y 15 aminoácidos relativa a una secuencia polipeptídica parental (tal como, por ejemplo, una de SEQ ID NOs: 2-35 o 37-44). En algunos casos, entre 1 y 11, por ejemplo, entre 1 y 10, tal como entre 1 y 7, por ejemplo entre 1 y 5, tal como entre 1 y 3 aminoácidos están deletados a partir del

10 extremo C terminal, por ejemplo el polipéptido está C terminalmente truncado en comparación con la secuencia polipeptídica parental (tal como, por ejemplo, una de SEQ ID NOs: 2-35 o 37-44) por 1-11 residuos de aminoácidos (por ejemplo por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11 residuos de aminoácidos), tal como por 1-10, 1-7, por ejemplo, por 1-5 o por 1-3 residuos de aminoácidos. Alternativamente, o en adición, algunos de dichos

15 polipéptidos están N terminalmente truncados en comparación con la secuencia polipeptídica parental (tal como, una de SEQ ID NOs: 2-35 o 37-44) por 1-4 residuos de aminoácidos (por ejemplo por 1, 2, 3, o 4 residuos de aminoácidos), por ejemplo, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 residuo(s) de aminoácidos se remueven a partir del extremo N terminal. Algunos de dichos polipéptidos comprenden adicionalmente una metionina en el extremo N

20 terminal. Algunos de dichos polipéptidos exhiben una actividad de interferón-alfa.

Como otro ejemplo, algunos polipéptidos de la invención comprenden una secuencia que contiene entre 1 y 16 sustituciones de aminoácidos relativas a SEQ ID NO: 1 (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 sustituciones de

105

aminoácidos), tales como 1-14 o 1-12 o 1-10 o 1-8 o 1-6 o 1-5 o 1-4 o 1-3 o 1-2 sustituciones de aminoácidos, en las cuales al menos una de las sustituciones se selecciona a partir del grupo que consiste de F48A/L; V51P; F55A; F65A; F68P; L111A; y V114P. Otros polipéptidos de la invención comprenden una secuencia que contiene entre 1 y 16 sustituciones de aminoácidos relativas a SEQ ID NO: 36 (por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 sustituciones de aminoácidos), tales como 1-14 o 1-12 o 1-10 o 1-8 o 1-6 o 1-5 o 1-4 o 1-3 o 1-2 sustituciones de aminoácidos, en las cuales al menos una de las sustituciones se selecciona a partir del grupo que consiste de M21A; I24P; F48A/L; T51P; S55A; F65A; F68P; F90A; M93P; L111A; V114P; F124A; I127P; y E160D. Una o más sustituciones adicionales de aminoácidos se pueden elaborar en la secuencia polipeptídica de conformidad con, por ejemplo, un grupo de sustitución (tal como, un grupo de sustitución conservativa), tal como una establecida a continuación. Alternativamente, o en adición, una o más sustituciones adicionales de aminoácidos se pueden elaborar en la secuencia polipeptídica la cual introduce o remueve un residuo de aminoácidos que comprende un grupo de unión para una porción no polipeptídica. Los ejemplos incluyen la introducción de uno o más sitios de N glicosilación, de uno o más residuo(s) de cisteína, residuo(s) de lisina, la remoción de uno o más sitios de N-glicosilación, o la remoción de una o más lisinas o histidinas. Dichos polipéptidos exhiben una actividad de interferón-alfa.

Como un ejemplo no limitante, un polipéptido de la invención puede tener una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 1 en un total de hasta 16 posiciones (la cual pueden ser una combinación de sustituciones de aminoácidos, deleciones, y/o inserciones, incluyendo aquellas descritas a continuación). En algunos casos, ninguna,

107

106

algunas, o todas las sustituciones son sustituciones de conformidad con un grupo de sustitución definido a continuación.

Las sustituciones de aminoácidos de conformidad con la invención pueden incluir, pero no se limitan a, una o más sustituciones conservativas de aminoácidos. Los cuadros de sustituciones conservativas que proveen aminoácidos con funcionalidad similar se conocen bien en la técnica. Un ejemplo se provee en el cuadro a continuación (cuadro 3), el cual establece cuarenta y seis grupos ejemplares que contienen aminoácidos los cuales se pueden considerar "situaciones conservativas" entre sí.

CUADRO 3

Grupos de sustitución conservativa

1	Alanina (A)	Glicina (G)	Serina (S)	Treonina (T)
2	Acido aspártico (D)	Acido glutámico (E)		
3	Asparagina (N)	Glutamina (Q)		
4	Arginina (R)	Lisina (K)	Histidina (H)	
5	Isoleucina (I)	Leucina (L)	Metionina (M)	Valina (V)
6	Fenilalanina (F)	Tirosina (Y)	Triptofano (W)	

Se pueden considerar otros grupos para sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se pueden agrupar mediante función similar o estructura química o composición (por ejemplo, ácidos, básicos, alifáticos, aromáticos, que contienen azufre). Por ejemplo, un grupo alifático puede comprender: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I). Otros grupos que contienen aminoácidos que se consideran sustituciones conservativas entre sí incluyen: Aromáticos: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); Que contienen azufre: Metionina (M), Cisteína (C); Básicos:

708

107

Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); Acidos: Acido aspártico (D), Acido glutámico (E), Asparagina (N), Glutamina (Q). Véase también Creighton (1984) Proteins, W. H. Freeman and Company, para los grupos adicionales de aminoácidos. El listado de una secuencia polipeptídica en la presente invención, en conjunción con los grupos de sustitución

5 anteriormente mencionados, provee una lista de expresión de todas las secuencias polipeptídicas conservativamente sustituidas.

Porcentaje de identidad porcentual

En un aspecto, la invención provee polipéptidos aislados o recombinantes

10 cada uno de los cuales comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad

15 de secuencia de aminoácidos) a cualquiera de SEQ ID NOs: 1-35, en donde la secuencia comprende uno o más de: Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 111; y Pro en la posición 114, la posición del aminoácido relativa a SEQ ID NO: 1. En algunos casos el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa.

20 La invención también provee polipéptidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos

107

aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos) a cualquiera de SEQ ID NOs: 36-44, en donde la secuencia comprende uno o más de: Ala en la posición 21; Pro en la posición 24; Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 90; Pro en la posición 93; Ala en la posición 111; Pro en la posición 114; Ala en la posición 124; Pro en la posición 127; y Asp en la posición 160, la posición del aminoácido relativa a SEQ ID NO: 36. En algunos casos el polipéptido exhibe una actividad de interferón-alfa.

0 El grado en el cual una secuencia (polipéptido o ácido nucleico) es similar a otra provee una indicación de propiedades estructurales y funcionales similares para las dos secuencias. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, las secuencias que tienen una secuencia similar con respecto a cualquier secuencia ejemplar dada son una característica de la presente invención. En particular, las secuencias que tienen
15 identidades de secuencia porcentuales como se define a continuación son una característica de la invención.

Se puede utilizar una variedad de métodos para la determinación de las relaciones de secuencia, incluyendo alineamiento manual y alineamiento de secuencia asistido por computadora y análisis. Está disponible una variedad de programas de
20 computadora para llevar a cabo los alineamientos de secuencia, o se puede preparar un alineamiento manualmente por un experto en la técnica, como se describe continuación.

Como se mencionó anteriormente, las secuencias de los polipéptidos y ácidos nucleicos empleados en la presente invención no necesitan ser idénticas, pero

pueden ser sustancialmente idénticas con la secuencia correspondiente de uno polipéptido de la invención o ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención se puedan someter a diversos cambios, tales como una o más inserciones, deleciones, y/o situaciones de aminoácidos, ya sea conservativas o no conservativas, incluyendo en donde, por ejemplo, dichos cambios pueden proveer ciertas ventajas en su uso; tal como, en el uso terapéutico o profiláctico o para la administración o aplicación diagnóstica. Los ácidos nucleicos de la invención también se pueden someter a diversos cambios, tales como una o más sustituciones de uno o más ácidos nucleicos en uno o más codones de tal manera que un codón particular codifica el mismo aminoácido o un aminoácido diferente, resultando ya sea en una variación silenciosa (como se define en la presente invención) o una variación no silenciosa, o una o más deleciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia. Los ácidos nucleicos también se pueden modificar para incluir uno o más codones que se proveen para expresión óptima en un sistema de expresión (por ejemplo, bacteriano o en mamífero), aunque, si se desea, dicho uno o más codones codifican los mismos aminoácidos. Los cambios de ácido nucleico se pueden proveer para ciertas ventajas en su uso terapéutico o profiláctico o para administración, o aplicación diagnóstica. Los ácidos nucleicos y polipéptidos se pueden modificar de numerosas formas siempre y cuando comprendan una secuencia sustancialmente idéntica (como se define a continuación) con respecto a una secuencia en un ácido nucleico o polipéptido respectivo de la invención.

El término "idéntico" o "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias que son las

mismas o que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean para una máxima similitud, como se determina utilizando el algoritmo de comparación de secuencia descrito a continuación o mediante inspección visual.

5 La "identidad de secuencia porcentual" ("% de identidad") de una secuencia sujeto con respecto a una secuencia de referencia (por ejemplo de búsqueda) significa que la secuencia sujeto es idéntica (por ejemplo, en una base aminoácido por aminoácido para una secuencia polipeptídica, o en una base nucleótido por nucleótido para una secuencia polipeptídica) en un porcentaje especificado con respecto a la secuencia de búsqueda sobre una longitud para comparación.

10 El porcentaje de identidad de secuencia de una secuencia sujeto con respecto a una secuencia de búsqueda se calcula como sigue. Primero, se determina el alineamiento óptimo de las dos secuencias utilizando un algoritmo para comparación de secuencia con parámetros específicos para alineamiento. Esta determinación del
15 alineamiento óptimo se puede llevar a cabo utilizando una computadora, o se puede calcular manualmente, como se describe a continuación. Posteriormente, las dos secuencias óptimamente alineadas se comparan sobre la longitud para comparación, y se determina el número de posiciones en el alineamiento óptimo en el cual se presentan residuos idénticos en ambas secuencias, lo cual provee el número de posiciones
20 coincidentes. El número de posiciones coincidentes se divide entonces por el número total de posiciones de la longitud para comparación (la cual, a menos que se especifique de otra manera, es la longitud de la secuencia de búsqueda), y entonces el resultado se

111

multiplica por 100, para producir el porcentaje de identidad de secuencia de la secuencia sujeto con respecto a las secuencia de búsqueda.

Con respecto a las secuencias polipeptídicas, típicamente se considera una secuencia como una "secuencia de búsqueda" (por ejemplo, una secuencia polipeptídica de la invención) con respecto a la cual se comparan una o más secuencias diferentes, por ejemplo, "secuencias sujeto" (por ejemplo, las secuencias presentes en una base de datos de secuencia). El algoritmo para comparación de secuencia utiliza los parámetros para alineamiento designados para determinar el alineamiento óptimo entre la secuencia de búsqueda y la secuencia(s) sujeto para comparación con una secuencia de búsqueda en contra de una base de datos de secuencia, tales como, por ejemplo, GENBANK® (Genetic Sequence Data Bank; U. S. Department of Health and Human Services) o GENESEQ® (Thomson Derwent; también disponible como DGENE® en STN), usualmente solamente se ingresan la secuencia de búsqueda y los parámetros para alineamiento dentro de la computadora; los alineamientos óptimos entre la secuencia de búsqueda de ingreso y cada secuencia sujeto presente en la base de datos son regresadas, generalmente por hasta un número deseado de secuencias sujeto.

Dos secuencias polipeptídicas están "óptimamente alineadas" cuando éstas se alinean utilizando parámetros definidos, por ejemplo, una matriz definida para sustitución de aminoácidos, sanción por existencia de espacio (también denominada sanción por espacio abierto), y sanción por extensión de espacio, de manera que se llega a la evaluación de similitud más alta posible para ese par de secuencias. La matriz BLOSUM62 (Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(22): 10915-10919) frecuentemente se utiliza como una matriz para sustitución de evaluación por omisión en

113

112

algoritmos para alineamiento de secuencia polipeptídica (tal como BLASTP, como se describe continuación). La sanción por existencia de espacio se impone para la introducción de un espacio particular de aminoácido en una de las secuencias alineadas, y la sanción por extensión de espacio se impone para cada posición del residuo en el espacio. A menos que se establezca de otra manera, los parámetros para alineamiento empleados en la presente invención son: matriz de evaluación BLOSUM62, sanción por existencia de espacio = 11, y sanción por extensión de espacio = 1. La evaluación del alineamiento se define por las posiciones de aminoácidos de cada secuencia en la cual el alineamiento empieza y termina (por ejemplo la ventana de alineamiento), y opcionalmente por la inserción de un espacio o múltiples espacios dentro de una o ambas secuencias, de manera que se llega a la mayor evaluación de similitud posible.

Aunque el alineamiento óptimo entre dos o más secuencias se puede determinar manualmente (como se describe a continuación), el procedimiento se facilita por el uso de un algoritmo para alineamiento implementado por computadora tal como BLAST® (National Library of Medicine), por ejemplo, BLASTP para las secuencias polipeptídicas y BLASTN para las secuencias de ácidos nucleicos, descrito en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, y están disponibles al público a través de varias fuentes, tales como the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Website. Cuando se utiliza una interfaz BLAST computarizada, si existe la opción de utilizar un "filtro de baja complejidad", esta opción debe ser eliminada (por ejemplo, sin filtro).

El alineamiento óptimo entre dos secuencias polipeptídicas también se puede determinar mediante un cálculo manual del algoritmo BLASTP (por ejemplo, sin la

114

ayuda de una computadora) utilizando los mismos parámetros de alineamiento anteriormente especificados (matriz = BLOSUM62, sanción por espacio abierto = 11, y sanción por extensión de espacio = 1). Para empezar, las dos secuencias se alinean inicialmente mediante inspección visual. Una evaluación de alineamiento inicial se calcula entonces como sigue: para cada posición individual del alineamiento (por ejemplo, para cada par de residuos alineados), un valor numérico se asigna de conformidad con la matriz BLOSUM62 (figura 4). La suma de los valores asignados a cada par de residuos en el alineamiento en la evaluación de alineamiento inicial. Si las dos secuencias a ser alineadas son altamente similares, frecuentemente este alineamiento inicial provee la evaluación más alta posible del alineamiento. El alineamiento con la evaluación más alta posible del alineamiento es el alineamiento óptimo basado en los parámetros de alineamiento empleados. La figura 5A muestra un ejemplo del cálculo de una evaluación del alineamiento para dos secuencias, una secuencia "de búsqueda", identificado en la presente invención como los residuos 29-50 de SEQ ID NO: 1 (superior), y una secuencia "sujeto", identificados en la presente invención como los residuos 30-52 de SEQ ID NO: 8 (inferior). Las secuencias se alinearon mediante inspección visual, y el valor numérico asignado por la matriz BLOSUM62 para cada par de aminoácidos alineados se muestra por debajo de cada posición en el alineamiento (para ayudar en la visualización, cada par de aminoácidos idéntico en el alineamiento se muestra en negritas). En este ejemplo, este alineamiento inicial proveyó la evaluación más alta posible del alineamiento (la suma de los valores se muestra por debajo de cada posición alineada); cualquier otro alineamiento de estas dos secuencias, con o sin espacios, podría resultar en una menor evaluación de alineamiento.

En algunos casos, una mayor evaluación de alineamiento se podría obtener mediante la introducción de uno o más espacios dentro del alineamiento. Siempre que se introduzca un espacio dentro de un alineamiento, se asigna una sanción por espacio abierto, y además se evalúa una sanción por extensión de espacio para cada posición del residuo dentro de ese espacio. Por lo tanto, utilizando los parámetros de alineamiento anteriormente descritos (incluyendo sanción por espacio abierto = 11 y sanción por extensión de espacio = 1), un espacio de un residuo en el alineamiento podría corresponder a un valor de $-(11+(1 \times 1)) = -12$ asignado al espacio; un espacio de tres residuos podría corresponder a un valor de $-(11+(3 \times 1)) = -14$ asignado al espacio, y así sucesivamente. Este cálculo se repite para cada nuevo espacio introducido dentro del alineamiento. Las figuras 5B y 5C muestran un ejemplo el cual demuestra cómo la introducción de un espacio dentro de un alineamiento pueda resultar en una mayor evaluación de alineamiento, a pesar de la sanción por espacio. La figura 5B muestra un alineamiento inicial de los residuos 29-50 de SEQ ID NO: 1 (superior, de búsqueda) y los residuos 30-50 de SEQ ID NO: 46 (inferior, sujeto) realizado mediante inspección visual, lo cual resulta en una evaluación del alineamiento inicial de 67. La figura 5C muestran el efecto de la introducción de un espacio de un residuo en SEQ ID NO: 46 en la evaluación de alineamiento; a pesar la sanción por espacio de -12, la evaluación general de alineamiento de las dos secuencias se incrementa a 88. En este ejemplo, el alineamiento que se muestra en la figura 5C provee la evaluación más alta posible del alineamiento, y por lo tanto es el alineamiento óptimo de estas dos secuencias; cualquier otro alineamiento de estas dos secuencias (con o sin espacios) podría resultar en una menor evaluación de alineamiento.

Se debe entender que los ejemplos de los cálculos del alineamiento de secuencia anteriormente descritos, los cuales utilizan secuencias relativamente cortas, se proveen solamente para propósitos ilustrativos; en la práctica, los parámetros de alineamiento empleados (matriz BLOSUM62, sanción por espacio abierto = 11, y sanción por extensión de espacio = 1) generalmente se pretenden para las secuencias polipeptídicas de 85 aminoácidos de longitud o más largas. El sitio en la red NCBI provee los siguientes parámetros de alineamiento para secuencias de otras longitudes (los cuales son adecuados para cálculos para alineamiento auxiliados por computadora así como cálculo manual para alineamiento, utilizando el mismo procedimiento anteriormente descrito). Para las secuencias de 50-85 aminoácidos en longitud, los parámetros óptimos son matriz BLOSUM80 (Henikoff y Henikoff, anteriormente mencionado), sanción por espacio abierto = 10, y sanción por extensión de espacio = 1. Para las secuencias de 35-50 aminoácidos en longitud, los parámetros óptimos son matriz PAM70 (Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M. & Orcutt, B.C. (1978) "A model of evolutionary change in proteins" en Atlas of Protein Sequence and Structure, volumen 5, suplemento 3, M. O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC.), sanción por espacio abierto = 10, y sanción por extensión de espacio = 1. Para las secuencias de menos de 35 aminoácidos en longitud, los parámetros óptimos son matriz PAM30 (Dayhoff, M.O., anteriormente mencionado), sanción por espacio abierto = 9, y sanción por extensión de espacio = 1.

Una vez que las secuencias se alinean óptimamente, la identidad porcentual de la secuencia sujeto relativa a la secuencia de búsqueda se calcula mediante la cuenta del número de posiciones en el alineamiento óptimo el cual contiene pares de residuos

idénticos, dividiendo eso por el número de residuos en la longitud para comparación (la cual, a menos que se especifique de otra manera, es el número de residuos en la secuencia de búsqueda), y multiplicando el número resultante por 100. Con referencia de nuevo a los ejemplos que se muestran en la figura 5, en cada ejemplo la secuencia designada como la secuencia de búsqueda es de 22 aminoácidos en longitud. En el alineamiento de la figura 5A, 20 pares de residuos de aminoácidos alineados (mostrados en negritas) son idénticos en el alineamiento óptimo de la secuencia de búsqueda (parte superior) con la secuencia subsecuente (parte inferior). Por lo tanto, esta secuencia sujeto particular tiene $(20/22) \times 100 = 91.1\%$ de identidad con respecto a la secuencia de búsqueda; en otras palabras, la secuencia sujeto en el alineamiento de la figura 5A tiene al menos 91% de los aminoácidos de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de búsqueda. En el alineamiento mostrado en la figura 5C, 18 pares de residuos de aminoácidos (mostrados en negritas) en el alineamiento óptimo son idénticos; por lo tanto esta secuencia sujeto particular tiene $(18/22) \times 100 = 81.8\%$ de identidad con respecto a la secuencia de búsqueda; en otras palabras, la secuencia sujeto en el alineamiento de la figura 5C tiene al menos 81% de los aminoácidos de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de búsqueda.

Como se aplica a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" (o "sustancialmente idéntico") típicamente significa que cuando dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo una secuencia de búsqueda y una secuencia sujeto) están óptimamente alineadas utilizando el algoritmo BLASTP (manualmente o vía una computadora) utilizando parámetros apropiados anteriormente descritos, la secuencia sujeto tiene al menos aproximadamente 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o mayor porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de búsqueda. En algunos casos, la identidad sustancial existe sobre una comparación de longitud de al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, tal como, al menos aproximadamente 110, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, o 166 residuos de aminoácidos.

10 Similarmente, como se aplica en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos, el término identidad sustancial (o sustancialmente idéntico) significa que cuando dos secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo una secuencia de búsqueda y una secuencia sujeto) se alinean óptimamente utilizando el algoritmo BLASTN (manualmente o vía una computadora) utilizando parámetros apropiados descritos a continuación, la secuencia sujeto tiene al menos aproximadamente 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o mayor porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de búsqueda. Los

15 parámetros utilizados para los alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos son: recompensa por coincidencia 1, sanción por inconsistencia -3, sanción por existencia de espacio 5, sanción por extensión de espacio 2 (las matrices de sustitución no se utilizan en el algoritmo BLASTN). En algunos casos, la identidad sustancial existe sobre una longitud de comparación de al menos aproximadamente 300 residuos de nucleótidos, tal

20 como al menos aproximadamente 330, 360, 375, 390, 405, 420, 435, 450, 465, 480, 483, 486, 489, 492, 495, o 498 nucleótidos.

Aspectos adicionales

Cualquier polipéptido de la invención puede estar presente como parte de una secuencia polipeptídica más grande, por ejemplo una proteína de fusión, tal como se presenta después de la adición de uno o más dominios con subsecuencias para la estabilización o detección o purificación del polipéptido. Una subsecuencia para purificación del polipéptido puede incluirse, por ejemplo, un epítipo marca, una marca FLAG, una secuencia de polihistidina, una fusión GST, o cualquier otra subsecuencia o "marca" para detección/purificación conocida en la técnica. Estos dominios adicionales o subsecuencias pueden tener ya sea poco o ningún efecto sobre la actividad del polipéptido de la invención, o se pueden remover mediante pasos de procesamiento post síntesis tales como mediante tratamiento con una proteasa, inclusión de una proteína, o los similares.

La invención incluye proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de la invención, por ejemplo, como se describe en la presente invención, fusionado a una molécula de Ig, por ejemplo, una cadena IgG Fc de humano ("fragmento cristizable", o unión al fragmento de complemento), dominio CH2 y dominio CH3, y secuencias nucleotídicas que codifican dicha proteína de fusión. Fc es la porción del anticuerpo responsable para la unión a los receptores del anticuerpo sobre las células y el componente C1q del complemento. Estas proteínas de fusión y sus ácidos nucleicos codificantes son útiles como fármacos profilácticos y/o terapéuticos o como herramientas diagnósticas (véase también, por ejemplo, Challita-Eid, P. et al. (1998) J. Immunol 160: 3419-3426; Sturmhoefel, K. et al. (1999) Cancer Res 59: 4964-4972). La invención también incluye proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de la invención,

fusionados a una molécula de albúmina, tal como albúmina de suero de humano (HSA), como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,876,969, y secuencias nucleotídicas que codifican la proteína de fusión. La Ig y proteínas de fusión a albúmina pueden exhibir un incremento en la vida media en suero del polipéptido y/o vida media funcional funcional in vivo, antigenicidad reducida del polipéptido, estabilidad incrementada de almacenamiento del polipéptido, o biodisponibilidad incrementada, por ejemplo AUCsc incrementada, y por lo tanto son útiles como fármacos profilácticos y/o terapéuticos.

Cualquier polipéptido de la invención también puede comprender uno o más aminoácidos modificados. El aminoácido modificado puede ser, por ejemplo, un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una porción de lípido, o un aminoácido conjugado a un agente derivado orgánico. La presencia de aminoácidos modificados puede ser ventajosa en, por ejemplo, (a) el incremento de la vida media en suero del polipéptido y/o vida media funcional in vivo, (b) reducción de la antigenicidad del polipéptido, (c) incremento en la estabilidad de almacenamiento del polipéptido, o (d) incremento en la biodisponibilidad, por ejemplo incremento de los aminoácidos AUCsc modificados, por ejemplo, co-traduccionalmente o post-tradicionalmente durante la producción recombinante (por ejemplo, glicosilación N asociada en los motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o modificados por medios sintéticos. Este aspecto se describe con mayor detalle en la sección en la presente invención titulada "conjugados de interferón-alfa".

120

La invención también provee una composición que comprende al menos un polipéptido de la invención, y un excipiente o vehículo. La composición puede ser una composición que comprende un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones y excipientes y vehículos ejemplares se describen a continuación.

5

Elaboración de polipéptidos

Los métodos recombinantes para la producción y aislamiento de los polipéptidos de la invención se describen en la presente invención. Además de la producción recombinante, los polipéptidos se pueden producir mediante síntesis directa del péptido utilizando técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart et al. (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co, San Francisco; Merrifield J. (1963) J Am Chem Soc 85: 2149-2154). La síntesis del péptido se puede llevar a cabo utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City, California) de conformidad con las instrucciones provistas por el fabricante. Por ejemplo, las subsecuencias se pueden sintetizar químicamente de manera separada y se pueden combinar utilizando métodos químicos para proveer polipéptidos de longitud total o fragmentos de los mismos. Alternativamente, dichas secuencias pueden ser ordenadas a numerosas compañías las cuales se especializan en la producción de polipéptidos. Más comúnmente, los polipéptidos de la invención se pueden producir mediante la expresión de ácidos nucleicos codificantes y la recuperación de los polipéptidos, por ejemplo, como se describe a continuación.

122

121

Los métodos para la producción de los polipéptidos de la invención también se incluyen. Uno de dichos métodos comprende la introducción dentro de una población de células de cualquier ácido nucleico de la invención descrito en la presente invención, el cual está operativamente asociado a una secuencia reguladora efectiva para producir el polipéptido codificado, cultivar las células en un medio de cultivo para expresar el polipéptido, y aislar el polipéptido a partir de las células o a partir del medio de cultivo. Se utiliza una cantidad de ácido nucleico adecuada para facilitar la toma por las células (transfección) y/o expresión del polipéptido. El ácido nucleico se introduce dentro de dichas células mediante cualquier método de administración descrito en la presente invención, incluyendo, por ejemplo, inyección, pistola de genes, toma pasiva, etc. El ácido nucleico puede ser parte de un vector, tal como un vector de expresión recombinante, incluyendo un vector de ADN plasmídico, o cualquier vector descrito en la presente invención. El ácido nucleico o vector que comprende un ácido nucleico de la invención se puede preparar y formular como se describe en la presente invención, anteriormente mencionado. Dicho ácido nucleico o vector de expresión se puede introducir dentro de una población de células de un mamífero in vivo, o las células seleccionadas del mamífero (por ejemplo, células tumorales) se pueden remover del mamífero y el vector de expresión de ácido nucleico introducido ex vivo dentro de la población de dichas células en una cantidad adecuada de tal manera que resulta la toma y expresión del polipéptido codificado. O, se produce un ácido nucleico o vector que comprende un ácido nucleico de la invención utilizando células cultivadas in vitro. En un aspecto, el método de producción de un polipéptido de la invención comprende la introducción dentro de una población de células de un vector de expresión recombinante que comprende cualquier ácido nucleico

123

122

de la invención descrito en la presente invención en una cantidad y fórmula de tal manera que resultará la toma del vector y la expresión del polipéptido codificado; la administración del vector de expresión dentro de un mamífero mediante cualquier formato de introducción/administración descrito en la presente invención; y aislando el polipéptido

5 aparte de mamífero o a partir de un subproducto de mamífero.

Anticuerpos

En otro aspecto de la invención, un polipéptido de la invención (un fragmento antigénico del mismo) se utiliza para producir anticuerpos los cuales tienen, por ejemplo, usos diagnósticos, terapéuticos, o profilácticos, por ejemplo, relacionados

10 con la actividad, distribución, y expresión de polipéptidos y fragmentos de los mismos. Los anticuerpos a los polipéptidos de la invención se pueden generar mediante métodos bien conocidos en la técnica. Dichos anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una librería de expresión Fab. Los anticuerpos, por

15 ejemplo, aquellos que bloquean la unión a receptor, se prefieren especialmente para uso terapéutico y/o profiláctico.

Los polipéptidos para inducción del anticuerpo no requieren actividad biológica; sin embargo, los polipéptidos o péptidos deben ser antigénicos. Los péptidos utilizados para inducir anticuerpos específicos pueden tener una secuencia de

20 aminoácidos que consiste de al menos aproximadamente 10 aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente 15 ó 20 aminoácidos o al menos aproximadamente 25 ó 30 aminoácidos. Las extensiones cortas de un polipéptido se

+24

pueden fusionar con otra proteína, tal como hemocianina de lapa cerradura, y anticuerpo producido en contra de la molécula quimérica.

Los métodos para la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales se conocen por aquellos expertos en la técnica, y muchos anticuerpos están disponibles.

- 5 Véase, por ejemplo, Current Protocols In Immunology, John Colligan et al., eds., Volúmenes I-IV (John Wiley & Sons, Inc., NY, 1991 y 2001 Suplemento); y Harlow y Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NY; Stites et al. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4a edición) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y referencias citadas en éste; y Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2a edición) Academic Press, New York, NY; y Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497. Otras técnicas adecuadas para preparación del anticuerpo incluyen la selección de librerías de anticuerpos recombinantes en fago o vectores similares. Véase, Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281; y Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546. Los anticuerpos monoclonales y policlonales específicos y antisuero usualmente se
- 10
- 15 unirán con una K_D de al menos aproximadamente $0.1 \mu M$, preferiblemente al menos aproximadamente $0.01 \mu M$ o mejor, y más típicamente y preferiblemente, $0.001 \mu M$ o mejor.

- Los métodos detallados para la preparación de anticuerpos quiméricos (humanizados) se pueden encontrar en la Patente de Estados Unidos 5,482,856. Se
- 20 pueden encontrar detalles adicionales sobre la humanización y otras técnicas de producción y diseño de anticuerpos en Borrebaeck (ed.) (1995) Antibody Engineering, 2a Edición Freeman and Company, NY (Borrebaeck); McCafferty et al. (1996) Antibody

Engineering, A Practical Approach IRL at Oxford Press, Oxford, Inglaterra (McCafferty), y Paul (1995) Antibody Engineering Protocols Humana Press, Towata, NJ (Paul).

En un aspecto, esta invención provee anticuerpos completamente humanizados en contra de los polipéptidos de la invención o fragmentos de los mismos.

- 5 Los anticuerpos humanizados son especialmente deseables en aplicaciones en donde los anticuerpos se utilizan como terapéuticos y/o profilácticos in vivo en pacientes humanos. Los anticuerpos humanos consisten de secuencias de inmunoglobulina característicamente de humano. Los anticuerpos de humano de esta invención se pueden producir utilizando una amplia variedad de métodos (véase, por ejemplo, Larrick et al.,
- 10 Patente de Estados Unidos No. 5,001,065, y Borrebaeck McCafferty y Paul, anteriormente mencionado, para una revisión). En un aspecto, los anticuerpos de humano de la presente invención se producen inicialmente en células de trioma. Luego los genes que codifican los anticuerpos se clonan y expresan en otras células, tales como células de mamífero no humano. El método general para la producción de anticuerpos de
- 15 humano por tecnología de trioma se describe por Ostberg et al. (1983), Hybridoma 2: 361-367, Ostberg, Patente de Estados Unidos No. 4,634,664, y Engelman et al., Patente de Estados Unidos No. 4,634,666. Las líneas celulares productoras de anticuerpo obtenidas mediante este métodos se denominan triomas debido a que descienden a partir de tres células - dos células de humano y una de ratón. Se ha encontrado que los triomas
- 20 producen anticuerpo de manera más estable que los hibridomas ordinarios elaborados a partir de células de humano.

Otros usos contemplados para los polipéptidos de la invención se proveen a lo largo de la especificación.

Conjugados de interferón alfa

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende un polipéptido que exhibe una actividad de interferón-alfa el cual comprende una secuencia de aminoácidos de cualesquiera de SEQ ID NOs: 2-35 y SEQ ID NOs: 37-44, y al menos una porción no polipeptídica unida al polipéptido, tal como por ejemplo, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unidas al polipéptido. Se entenderá que el conjugado también exhibe una actividad de interferón-alfa (tal como, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa).

En otro aspecto el conjugado comprende un polipéptido que exhibe una actividad de interferón-alfa el cual comprende una secuencia de aminoácidos la cual difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 1 y comprende una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: seleccionadas a partir del grupo que consiste de F48A/L; V51P; F55A; F65A; F68P; L111A; y V114P; y al menos una porción no polipeptídica unida al polipéptido, tal como por ejemplo, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unidas al polipéptido. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos comprende adicionalmente una o más sustituciones las cuales introducen un grupo de unión para la porción no polipeptídica (por ejemplo, mediante la sustitución de un residuo de aminoácidos para un residuo diferente el cual comprende un grupo de unión para la porción no polipeptídica, o mediante la inserción de un residuo de aminoácidos adicional el cual comprende un grupo de unión para la porción no polipeptídica). Se debe entender que el conjugado también exhibe una actividad de interferón-alfa (tal como, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa).

126

La invención también provee conjugados cada uno de los cuales comprende un polipéptido que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 1 y (b) comprende la sustitución F48A/L relativa a SEQ ID NO: 1, y al menos una porción no polipeptídica unida al polipéptido, tal como por ejemplo, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unidas al polipéptido. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual difiere a partir de SEQ ID NO: 1 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. Algunos de dichos conjugados comprenden la sustitución F48A relativa a SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la parte polipeptídica del conjugado comprende adicionalmente una o más sustituciones a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; V51A/P; Q52P/E; A53T; F55A/S; L56V; F65A; F57L; Y58H; M61I; F68P; L111A; N113K; V114E/P; y E160D. Algunos de dichos conjugados exhiben una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos conjugados comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, tal como una metionina añadida al extremo N terminal del polipéptido.

128

La invención también provee conjugados cada uno de los cuales comprende un polipéptido que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 1 y (b) comprende la sustitución F55A relativa a SEQ ID NO: 1, y al menos una porción no polipeptídica unida al polipéptido, tal como por ejemplo, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unidas al polipéptido. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual difiere a partir de SEQ ID NO: 1 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. En algunos casos, la parte polipeptídica del conjugado comprende adicionalmente una o más sustituciones a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; F48A/L; V51A/P; Q52P/E; A53T; L56V; F65A; F57L; Y58H; M61I; F68P; L111A; N113K; V114E/P; y E160D. Algunos de dichos conjugados exhiben una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos conjugados comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal del polipéptido.

La invención también provee conjugados cada uno de los cuales comprende un polipéptido que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de

128

aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 1 y (b) comprende la sustitución F65A relativa a SEQ ID NO: 1, y al menos una porción no polipeptídica unida al polipéptido, tal como por ejemplo, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unidas al polipéptido. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual difiere a partir de SEQ ID NO: 1 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. En algunos casos, la parte polipeptídica del conjugado comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; F48A/L; V51A/P; Q52P/E; A53T; F55A/S; L56V; F57L; Y58H; M61I; F68P; L111A; N113K; V114E/P; y E160D. Algunos de dichos conjugados exhiben una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos conjugados comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal del polipéptido.

La invención también provee conjugados cada uno de los cuales comprende un polipéptido que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 1 y (b) comprende la sustitución L111A relativa a SEQ ID NO: 1, y al menos una porción no polipeptídica unida al polipéptido, tal como por

130

12A

ejemplo, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unidas al polipéptido. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual difiere a partir de SEQ ID NO: 1 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. En algunos casos, la parte polipeptídica del conjugado comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; F48A/L; V51A/P; Q52P/E; A53T; F55A/S; L56V; F65A; F57L; Y58H; M61I; F68P; N113K; V114E/P; y E160D. Algunos de dichos conjugados exhiben una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos conjugados comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal del polipéptido.

La invención también provee conjugados cada uno de los cuales comprende un polipéptido que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 0 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 13 y (b) comprende uno o más de: Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 111; y Pro en la posición 114 (numeración de la posición en relación con SEQ ID NO: 13), y al menos una porción no polipeptídica unida al

131

polipéptido, tal como por ejemplo, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unida al polipéptido. Algunos de dichos conjugados comprenden un polipéptido que comprende una secuencia la cual difiere a partir del SEQ ID NO: 13 en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 0-15 posiciones de aminoácidos, en 0-14 posiciones de aminoácidos, en 0-13 posiciones de aminoácidos, en 0-12 posiciones de aminoácidos, en 0-11 posiciones de aminoácidos, en 0-10 posiciones de aminoácidos, en 0-9 posiciones de aminoácidos, en 0-8 posiciones de aminoácidos, en 0-7 posiciones de aminoácidos, en 0-6 posiciones de aminoácidos, en 0-5 posiciones de aminoácidos, en 0-4 posiciones de aminoácidos, en 0-3 posiciones de aminoácidos, en 0-2 posiciones de aminoácidos, o en 0-1 posiciones de aminoácidos. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual comprende una Ala o una Leu en la posición 48. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual comprende una Ala en la posición 48. En algunos casos, la parte polipeptídica del conjugado comprende adicionalmente una o más sustituciones a SEQ ID NO: 13 seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; V51A; Q52P/E; A53T; F55S; L56V; F57L; Y58H; M61I; N113K; V114E; y E160D. Algunos de dichos conjugados exhiben una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica adicional que comprende uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal.

En otro aspecto el conjugado comprende un polipéptido que exhibe una actividad de interferón-alfa el cual comprende una secuencia de aminoácidos la cual difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 36 y comprende una

o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A; I24P; F48A/L; T51P; S55A; F65A; F68P; F90A; M93P; L111A; V114P; F124A; I127P; y E160D; y al menos una porción no polipeptídica unida al polipéptido, tal como por ejemplo, 1-6; 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unida al polipéptido. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos comprende adicionalmente una o más sustituciones las cuales introducen un grupo de unión para la porción no polipeptídica (por ejemplo, mediante la sustitución de un residuo de aminoácidos para un residuo diferente el cual comprende un grupo de unión para la porción no polipeptídica, o mediante la inserción de un residuo de aminoácidos adicional el cual comprende un grupo de unión para la porción no polipeptídica).

La invención también provee conjugados cada uno de los cuales comprende un polipéptido que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende la sustitución F48A/L relativa a SEQ ID NO: 36, y al menos una porción no polipeptídica unida al polipéptido, tal como por ejemplo, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unidas al polipéptido. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual difiere a partir de SEQ ID NO: 36 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de

aminoácidos. Algunos de dichos conjugados comprenden la sustitución F48A relativa a SEQ ID NO: 36. En algunos casos, la parte polipeptídica del conjugado comprende adicionalmente una o más sustituciones a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A; I24P; P26L; H47Q; T51V/P; S55P/F/A; V56L; H58Y; L60M; F65A; F68P; F90Y/A; M93L/P; N95D; L111A; N113K; V114E/P; F124A; R125Q; I127P; T132K; L154F; y E160D. Algunos de dichos conjugados exhiben una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos conjugados comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, tal como una metionina añadida al extremo N terminal del polipéptido.

La invención también provee conjugados cada uno de los cuales comprende un polipéptido que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende la sustitución F90A relativa a SEQ ID NO: 36, y al menos una porción no polipeptídica unida al polipéptido, tal como por ejemplo, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unidas al polipéptido. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual difiere a partir de SEQ ID NO: 36 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de

aminoácidos. En algunos casos, la parte polipeptídica del conjugado comprende adicionalmente una o más sustituciones a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A; I24P; P26L; H47Q; F48A/L; T51V/P; S55P/F/A; V56L; H58Y; L60M; F65A; F68P; M93L/P; N95D; L111A; N113K; V114E/P; F124A; R125Q; I127P; T132K; L154F; y E160D. Algunos de dichos conjugados exhiben una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos conjugados comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal del polipéptido.

10 La invención también provee conjugados cada uno de los cuales comprende un polipéptido que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende la sustitución E160D relativa a SEQ ID NO: 36, y al menos una porción no polipeptídica unida al polipéptido, tal como por ejemplo, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unidas al polipéptido. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual difiere a partir de SEQ ID NO: 36 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos. En algunos casos, la parte polipeptídica del conjugado comprende

134

adicionalmente una o más sustituciones a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A; I24P; P26L; H47Q; F48A/L; T51V/P; S55P/F/A; V56L; H58Y; L60M; F65A; F68P; F90Y/A; M93L/P; N95D; L111A; N113K; V114E/P; F124A; R125Q; I127P; T132K; y L154F. Algunos de dichos conjugados exhiben una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1, y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos conjugados comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, tal como una metionina añadida al extremo N terminal del polipéptido.

La invención también provee conjugados cada uno de los cuales comprende un polipéptido que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 0 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 38 y (b) comprende uno o más de: Ala en la posición 21; Pro en la posición 24; Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 90; Pro en la posición 93; Ala en la posición 111; Pro en la posición 114; Ala en la posición 124; Pro en la posición 127; y Glu en la posición 160 (numeración de la posición en relación con SEQ ID NO: 38), y al menos una porción no polipeptídica unida al polipéptido, tal como por ejemplo, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, por ejemplo 1 ó 2 porciones no polipeptídicas unidas al polipéptido. Algunos de dichos conjugados comprenden un polipéptido que comprende una secuencia la cual difiere a partir de SEQ IDNO: 38 en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 0-15 posiciones de aminoácidos, en 0-14 posiciones de aminoácidos, en 0-13 posiciones de aminoácidos, en 0-12 posiciones de aminoácidos, en 0-11 posiciones de aminoácidos, en 0-10 posiciones de aminoácidos, en 0-9 posiciones de aminoácidos, en 0-8 posiciones de aminoácidos,

186

en 0-7 posiciones de aminoácidos, en 0-6 posiciones de aminoácidos, en 0-5 posiciones de aminoácidos, en 0-4 posiciones de aminoácidos, en 0-3 posiciones de aminoácidos, en 0-2 posiciones de aminoácidos, o en 0-1 posiciones de aminoácidos. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual comprende una Ala o una Leu en la posición 48. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual comprende una Ala en la posición 48. En algunos casos, la parte polipeptídica del conjugado comprende adicionalmente una o más sustituciones a SEQ ID NO: 38 seleccionadas a partir del grupo que consiste de P26L; H47Q; V51T; F55P/S; L56V; Y58H; L60M; F90Y; M93L; N95D; N113K; V114E; R125Q; T132K; y F154L.

Algunos de dichos conjugados exhiben una actividad de interferón-alfa (por ejemplo, actividad antiviral, actividad de diferenciación por T_H1 , y/o actividad antiproliferativa). Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica adicional que comprende uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal.

El término "conjugado" (o de manera intercambiable "polipéptido conjugado" o "conjugado polipéptido") se pretende que indique una molécula heterogénea (en el sentido de compuesta) formada por la unión componente de uno o más polipéptidos de la invención a una o más porciones no polipeptídicas. El término "unión covalente" significa que el polipéptido y la porción no polipeptídica se encuentran ya sea directamente unidos de manera covalente entre sí, o cualquiera que están indirectamente unidos de manera covalente entre sí a través de una porción o porciones interpuestas, tal como un enlace, espaciador, o porción o porciones de enlace. Preferiblemente, un polipéptido conjugado es soluble a concentraciones y condiciones relevantes, por ejemplo soluble en fluidos

fisiológicos tal como sangre. Los ejemplos de polipéptidos conjugados de la invención incluyen polipéptidos glicosilados y/o PEGilados. El término "polipéptido no conjugado" se puede utilizar para referirse a la parte polipeptídica del polipéptido conjugado.

El término "porción no polipeptídica" se pretende que signifique una molécula que es capaz de conjugarse con un grupo de unión del polipéptido. Los ejemplos preferidos de porciones no polipeptídicas incluyen moléculas poliméricas, porciones de azúcar, compuestos lipófilos, o agentes derivados orgánicos, en particular moléculas poliméricas o porciones de azúcar. Se entenderá que la porción no polipeptídica está asociada al polipéptido a través de un grupo de unión del polipéptido. Excepto en donde expresamente se indica el número de porciones no polipeptídicas, tales como moléculas poliméricas, al polipéptido, cada referencia a "una porción no polipeptídica" unida al polipéptido o utilizada de otra manera en la presente invención debe ser una referencia a una o más porciones no polipeptídicas unidas al polipéptido.

El término "molécula polimérica" se define como una molécula formada mediante la unión covalente de dos o más monumentos, en donde ninguno de los monómeros es un residuo de aminoácidos. El término "polímero" se puede utilizar de manera intercambiable con el término "molécula polimérica".

El término "porción de azúcar" se pretende que indique una molécula de carbohidrato unida mediante glicosilación in vivo o in vitro, tal como N u O-glicosilación. Un "sitio de N-glicosilación" tiene la secuencia N-X-S/T/C, en donde X es cualquier residuo de aminoácidos excepto prolina, N es asparagins y S/T/C es cualquier serina, treonina o cisteína, preferiblemente serina o treonina, y más preferiblemente treonina.

137

Un "sitio de O-glicosilación" que comprende el grupo OH de un residuo de serina o treonina.

El término "grupo de unión" se pretende que indique un grupo de residuo de aminoácidos capaz de acoplarse a la porción no polipeptídica relevante tal como una molécula poliméricas o una porción de azúcar. Los ejemplos no limitantes de grupos de unión útiles y algunas porciones no polipeptídicas correspondientes se proveen en el cuadro 4 a continuación.

CUADRO 4
Grupos de unión útiles y ejemplos de porciones no polipeptídicas correspondientes

Grupo de unión	Aminoácido	Ejemplos de porciones no peptídicas	Ejemplos de método de conjugación/PEG activado	Referencia
-NH2	N terminal, Lys	polímero, por ejemplo PEG	mPEG-SPA mPEG2-NHS mPEG2-butryALD	Catálisis Nektar 2003
-COOH	C terminal, Asp, Glu	polímero, por ejemplo PEG porción de azúcar	mPEG-H2 acoplamiento in vitro	Catálisis Nektar 2003
-SH	Cys	polímero, por ejemplo PEG, porción de azúcar	mPEG-VS mPEG2-MAL acoplamiento in vitro	Catálisis Nektar 2003; et al, Review Therapeutic Drug System 9(3,4): 304 (1
-OH	Ser, Thr, OH-	Porción de azúcar	Glicosilación O-asociada in vivo	
-CONH2	Asn como parte de un sitio de N-glicosilación	Porción de azúcar	N-Glicosilación in vivo	
Residuo aromático	Phe, Tyr, Trp	Porción de azúcar	Acoplamiento in vitro	
-CONH2	Gln	Porción de azúcar	Acoplamiento in vitro	Yan y Bloch 1984,

139

138

5

Aldehído cetona	Carbohidrato oxidado	Polímero, por ejemplo, PEG, PEG- hidrolizabler	PEGilación	Andresz et al., 1978, Makromol. Chem. 179: 301; WO 92/16555, WO 00/23114
Guanidino	Arg	Porción de azúcar	Acoplamiento in vitro	Lundblad y Noyes, Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc. Boca Raton, F
Anillo imidazol	His	Porción de azúcar	Acoplamiento in vitro	Como para guanidina

10

15

20

Para N-glicosilación in vivo, el término "grupo de unión" se utiliza de manera no convencional para indicar los residuos de aminoácidos que constituyen un sitio de N-glicosilación (con la secuencia N-X-S/T/C, en donde X es cualquier residuo de aminoácidos excepto prolina, N es asparagina y S/T/C es cualquier serina, treonina o cisteína, preferiblemente serina o treonina, y más preferiblemente treonina). Aunque el residuo de asparagina del sitio de N-glicosilación es aquél al cual la porción de azúcar se une durante la glicosilación, dicha unión no se puede lograr a menos que otros residuos de aminoácidos del sitio de N-glicosilación estén presentes. Por consiguiente, cuando la porción no polipeptídica es una porción de azúcar y la conjugación se va a realizar mediante N-glicosilación, el término "residuo de aminoácido que comprende un grupo de unión para la porción no polipeptídica" como se utiliza en conexión con alteraciones de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención se entiende que uno, dos o

140

todos los residuos de aminoácidos que constituyen un sitio de N-glicosilación es/son alterados de tal manera que cualquier sitio de N-glicosilación funcional se introduce dentro de la secuencia de aminoácidos, removida a partir de dicha secuencia o un sitio de N-glicosilación funcional se retiene en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo mediante la sustitución de un residuo de serina, el cual ya constituye una parte de un sitio de N-glicosilación, con un residuo de treonina y viceversa).

El término "introduce" (por ejemplo, un residuo "introducido" de aminoácidos, la "introducción" de un residuo de aminoácidos) se pretende principalmente que signifique la sustitución de un residuo de aminoácido existente por otro residuo de aminoácidos, pero también puede significar la inserción de un residuo de aminoácidos adicional.

El término "remueve" (por ejemplo, un residuo "removido" de aminoácidos, la "remoción" de un residuo de aminoácidos) se pretende principalmente que signifique la sustitución del residuo de aminoácido a ser removido por otro residuo de aminoácidos, pero también puede significar la delección (sin sustitución) del residuo de aminoácido a ser removido.

El término "residuo de aminoácido que comprende un grupo de unión para la porción no polipeptídica" se pretende que indique que el residuo de aminoácido es uno al cual se une la porción no polipeptídica (en el caso de un residuo de aminoácidos introducido) o se podría unir (en el caso de un residuo de aminoácidos removido).

El término "vida media funcional in vivo" se utiliza en su significado normal, por ejemplo el tiempo al cual 50% de la actividad biológica del polipéptido aún se encuentra presente en el cuerpo/órgano blanco, o el tiempo en el cual la actividad del

polipéptido es 50% del valor inicial. La vida media funcional in vivo se puede determinar en un animal experimental, tal como rata, ratones, conejo, perro o mono. Preferiblemente, la vida media funcional in vivo se determina en un primate no humano, tal como un mono. Además, la vida media funcional in vivo se puede determinar para una muestra que ha sido administrada intravenosamente o subcutáneamente.

Como una alternativa para determinar la vida media funcional in vivo, "vida media en suero" se puede determinar, por ejemplo el tiempo en el cual 50% del polipéptido circula en el plasma o torrente sanguíneo antes de ser eliminado. La determinación de la vida media en suero frecuentemente es más simple que la determinación de la vida media funcional in vivo y la magnitud de la vida media en suero usualmente es una buena indicación de la magnitud de la vida media funcional in vivo. Alternativamente los términos de vida media en suero incluyen "vida-media en plasma", "vida-media en circulación", "eliminación en suero", "eliminación en plasma" y "vida media para eliminación". La vida media en suero se puede determinar como se describió anteriormente en conexión con la determinación de la vida media funcional in vivo.

El término "suero" se utiliza en su significado normal, por ejemplo como plasma sanguíneo sin fibrinógeno y otros factores de coagulación.

El término "incrementado" como se utiliza aproximadamente para la vida media funcional in vivo o vida media en suero se utiliza para indicar que la vida media relevante del conjugado de la invención se incrementa de manera estadísticamente significativa en relación con una molécula de referencia, tal como un interferón-alfa de tipo silvestre, por ejemplo, un interferón-alfa de humano, tal como una de SEQ ID NO: 45-SEQ ID NO: 56 (u otras secuencias hIFN-alfa como se describe en la presente invención

141

y/o en Allen G. y Diaz M. O. (1996), anteriormente mencionado), o el conjugado no polipeptídico correspondiente. Por lo tanto, los conjugados de la invención interesantes incluyen aquellos los cuales tienen una vida media funcional incrementada in vivo o una vida media en suero incrementada en comparación con una molécula de referencia anteriormente mencionada.

El término "AUC_{sc}" o "área bajo la curva cuando se administra subcutáneamente" se utiliza en su significado normal, por ejemplo como el área bajo la curva de actividad de interferón-alfa-en-suero contra la curva del tiempo, en donde la molécula conjugada ha sido administrada subcutáneamente a un animal experimental.

Una vez que los puntos de tiempo de la actividad experimental de interferón-alfa han sido determinados, el AUC_{sc} se puede calcular de manera conveniente mediante un programa de computadora, tal como GraphPad Prism 3.01.

El término "incrementado" como se utiliza aproximadamente el AUC_{sc} se utiliza para indicar que el área bajo la curva para un conjugado de la invención, cuando se administra subcutáneamente, se incrementa estadísticamente de manera significativa en relación con una molécula de referencia, tal como interferón-alfa de tipo silvestre, por ejemplo, un interferón-alfa de humano, tal como uno de SEQ ID NO: 45-SEQ ID NO: 56 (u otras secuencias hIFN-alfa como se describe en la presente invención y/o en Allen G. y Diaz M. O. (1996), anteriormente mencionado), o el conjugado no polipeptídico correspondiente, cuando se determina bajo condiciones comparables. Evidentemente, la misma cantidad de actividad de interferón-alfa se debe administrar para el conjugado de la invención y la molécula de referencia. Consecuentemente, con el objeto de hacer comparaciones directas entre diferentes moléculas de interferón-alfa, los valores de

143

AUC_{sc} típicamente se deben normalizar, por ejemplo se deben expresar como AUC_{sc}/dosis administrada.

El término " $T_{max,sc}$ " se utiliza acerca el punto de tiempo en la curva de actividad de interferón-alfa-en-suero contra tiempo en donde se observa la mayor actividad del interferón-alfa en suero.

Se entenderá que aunque los ejemplos y modificaciones al polipéptido parental generalmente se proveen en la presente invención con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, las modificaciones descritas también se pueden elaborar en posiciones equivalentes de aminoácidos de los otros polipéptidos de la invención (incluyendo SEQ ID NOs: 2-35 y 37-44 y variantes de los mismos) anteriormente descritos.

Mediante la remoción y/o introducción de los residuos de aminoácidos que comprenden un grupo de unión para la porción no polipeptídica es posible adaptar específicamente el polipéptido de manera que se hace a la molécula más susceptible a la conjugación a la porción no polipeptídica de elección, para optimizar el patrón de conjugación (por ejemplo para asegurar una distribución óptima de las porciones no polipeptídicas en la superficie de la molécula de interferón-alfa y así, por ejemplo, proteger efectivamente los epítopes y otras partes de la superficie del polipéptido sin alterar significativamente la función del mismo). Por ejemplo, mediante la introducción de grupos de unión, el polipéptido de interferón-alfa se altera en el contexto de los residuos específicos de aminoácidos a los cuales se unen las porciones no polipeptídicas relevantes, logrando así una conjugación más eficiente, específica y/o extensiva. Mediante la remoción de uno o más grupos de unión es posible evitar la conjugación a la porción no polipeptídica en las partes polipeptídicas en la cual dicha conjugación es

desventajosa, por ejemplo a un residuo de aminoácido localizado en o cerca de un sitio funcional del polipéptido (puesto que la conjugación en dicho sitio puede resultar en inactivación o actividad reducida del interferón-alfa del conjugado resultante debido a un reconocimiento alterado del receptor). Además, puede ser ventajoso remover un grupo de
5 unión localizado cercanamente a otro grupo de unión.

Se debe entender que el residuo de aminoácido que comprende un grupo de unión para una porción no polipeptídica, ya sea removido o introducido, se selecciona con base en una naturaleza de la porción no polipeptídica y, en algunos casos, con base en el método de conjugación a ser utilizado. Por ejemplo, cuando la porción no
10 polipeptídica es una molécula polimérica, tal como una molécula derivada de polietilenglicol o de óxido de polialquileno, los residuos de aminoácidos capaces de funcionar como un grupo de unión se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste de cisteína, lisina (y/o el grupo amino N-terminal del polipéptido), ácido aspártico, ácido glutámico, histidina y arginina. Cuando la porción no polipeptídica es una porción de
15 azúcar, el grupo de unión es un sitio de N- u O-glicosilación in vivo o in vitro, preferiblemente un sitio de N-glicosilación.

En algunos casos, cuando un grupo de unión para una porción no polipeptídica se va a introducir dentro de o remover a partir del polipéptido de interferón-alfa, la posición del polipéptido de interferón-alfa a ser modificado se puede seleccionar
20 convenientemente como sigue:

La posición a ser modificada se puede localizar en la superficie del polipéptido de interferón-alfa, tal como una posición ocupada por un residuo de aminoácido el cual tiene más de 25% de su cadena lateral expuesta al solvente, tal como

144

más de 50% de su cadena lateral expuesta al solvente. Dichas posiciones se han identificado con base en un análisis de una estructura en 3D de la molécula de interferón-alfa 2a de humano como se describe en la sección de "materiales y métodos" en la presente invención.

5 Con el objeto de determinar una distribución óptima de los grupos de unión, se calculó la distancia entre los residuos de aminoácidos localizados en la superficie de la molécula de interferón-alfa con base en una estructura de 3D de un polipéptido de interferón-alfa. Más específicamente, se determinaron las distancias entre los CB's de los residuos de aminoácidos que comprenden dichos grupos de unión, o la distancia entre el

10 grupo funcional (NZ para lisina, CG para ácido aspártico, CD para ácido glutámico, SG para cisteína) de uno y el CB de otro residuo de aminoácido que comprende un grupo de unión. En caso de glicina, CA se utilizó en lugar de CB. en la parte polipeptídica del interferón- α de un conjugado de la invención, cualquiera de dichas distancias o de ser mayor de 8Å, tal como mayor de 10Å con el objeto de evitar o reducir la conjugación

15 heterogénea y proveer una distribución uniforme de grupos de unión, por ejemplo con el objetivo de epítopo protegido.

Además, en la parte polipeptídica del interferón-alfa de un conjugado de la invención, en algunos casos se remueven los grupos de unión localizados en o cerca de los sitios de unión del receptor de interferón-alfa, tal como mediante sustitución del

20 residuo de aminoácido que comprende dicho grupo. En algunos casos, los residuos de aminoácidos que comprenden un grupo de unión para una porción no polipeptídica, tal como cisteína o lisina, frecuentemente no se introducen en o cerca del sitio de unión del receptor de la molécula de interferón.

146

Otro método para modificar un polipéptido de interferón-alfa es proteger y por lo tanto modificar o destruir o inactivar de otra manera uno epítoto presente en el interferón-alfa parental, mediante la conjugación a una porción no polipeptídica. Los epítotoes de polipéptidos de interferón- alfa se pueden identificar mediante el uso de los métodos conocidos en la técnica, también conocido como mapeo del epítoto, véase por ejemplo Romagnoli et al., J. Biol Chem., 1999, 380 (5): 553-9, DeLisser HM, Methods Mol Biol, 1999, 96: 11-20, Van de Water et al., Clin Immunol Immunopathol, 1997, 85 (3): 229-35, Saint-Remy JM, Toxicology, 1997, 119 (1): 77-81, y Lane DP y Stephen CW, Curr Opin Immunol, 1993, 5(2): 268-71. Un método es establecer una librería de exhibición del fago que expresa oligopéptidos al azar de, por ejemplo, 9 residuos de aminoácidos. Los anticuerpos de IgG1 a partir de antisuero específico hacia el interferón-alfa de humano se purifican mediante inmunoprecipitación y los fagos reactivos se identifican mediante inmunoblot. Mediante la secuenciación del ADN de los fagos reactivos purificados, se puede determinar la secuencia del oligopéptido seguido por la localización de la secuencia en estructura de 3D del interferón-alfa. Alternativamente, se pueden identificar los epítotoes de conformidad con el método descrito en la Patente de Estados Unidos 5,041,376. La región así identificada en la estructura constituye un epítoto que se puede seleccionar entonces como una región blanco para la introducción de un grupo de unión para la porción no polipeptídica. Preferiblemente, al menos un epítoto, tal como dos, tres o cuatro epítotoes de interferón-alfa se protegen por una porción no polipeptídica de conformidad con la presente invención. Por consiguiente, en un aspecto, el conjugado de la invención tiene al menos un epítoto protegido en comparación con un interferón-alfa de humano de tipo silvestre, incluyendo cualquier interferón-alfa comercialmente

146

disponible. Esto se puede realizar mediante la introducción de un grupo de unión para una porción no polipeptídica dentro de una posición localizada en la vecindad de (por ejemplo en 4 residuos de aminoácidos en la secuencia primaria o en aproximadamente 10Å en la secuencia terciaria) de un epítopo dado. La distancia de 10Å se mide entre 5 CB's (CA's en el caso de la glicina). Dichas instrucciones específicas se describen en las siguientes secciones.

En el caso de la remoción de un grupo de unión, el residuo de aminoácido relevante que comprende dicho grupo y que ocupa una posición como se definió anteriormente se puede sustituir con un residuo de aminoácido diferente que no 10 comprende un grupo de unión para la porción no polipeptídica en cuestión, o se puede deletar. La remoción de un grupo de N-glicosilación, también se puede realizar mediante la inserción o remoción de un residuo de aminoácido dentro del motivo N-X-S/T/C.

En el caso de la introducción de un grupo de unión, se introduce un residuo de aminoácido que comprende dicho grupo dentro de la posición, tal como mediante la 15 sustitución del residuo de aminoácido que ocupa dicha posición.

El número exacto de grupos de unión disponibles para la conjugación y presente en el polipéptido del interferón-alfa es dependiente del efecto deseado que se pretende que se logre por la conjugación. El efecto a ser obtenido es dependiente, por ejemplo, de la naturaleza y grado de conjugación (por ejemplo la identidad de la porción 20 no polipeptídica, el número de porciones no polipeptídicas deseables o posibles para conjugar el polipéptido, en donde éstas deben ser conjugadas o en donde se debe evitar la conjugación, etc.). Por ejemplo, si se desea una inmunogenicidad reducida, el número de grupos (y ubicación de los grupos) de unión debe ser adecuada para proteger la

148

mayoría o todos los epítopes. Esto normalmente se obtiene cuando una porción más grande del polipéptido de interferón-alfa está protegida. La protección efectiva de los epítopes normalmente se lleva a cabo cuando el número total de grupos de unión disponibles para la conjugación se encuentra en el intervalo de 1-6 grupos de unión, por ejemplo, 1-5, tal como en el intervalo de 1-3, tal como 1, 2, o 3 grupos de unión.

La vida media funcional in vivo es por ejemplo dependiente del peso molecular del conjugado, y del número de grupos de unión necesarios para proveer una vida media incrementada que depende así del peso molecular de la porción no polipeptídica en cuestión. Algunos de dichos conjugados comprenden 1-6, por ejemplo, 1-5, tal como 1-3, por ejemplo 1, 2, o 3 porciones no polipeptídicas cada una teniendo un PM de aproximadamente 2-40 kDa, tal como aproximadamente 2 kDa, aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 12 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 30 kDa, o aproximadamente 40 kDa.

En el conjugado de la invención, algunos, la mayoría, o sustancialmente todos los grupos de unión que se pueden conjugar están ocupados por la porción no polipeptídica relevante.

El conjugado de la invención puede exhibir uno o más de las siguientes propiedades mejoradas:

Por ejemplo, el conjugado puede exhibir una inmunogenicidad reducida en comparación con interferón-alfa de humano (tal como cualesquiera de los polipéptidos definidos en la presente invención como SEQ ID NO: 45-57, o cualquier otro hIFN-alfa descrito en la presente invención y/o en Allen G. y Diaz M.O. (1996), anteriormente mencionado) o como en comparación con el conjugado no polipeptídico correspondiente,

por ejemplo una reducción de al menos 10%, tal como una reducción de al menos 25%, tal como una reducción de al menos 50%, por ejemplo una reducción de al menos 75% en comparación con el conjugado no polipeptídico o en comparación con interferón-alfa de humano.

5 En otro aspecto el conjugado puede existir como una reacción reducida o sin reacción con anticuerpos neutralizantes a partir de pacientes tratados con interferón-alfa de humano (tal como cualesquiera de los polipéptidos definidos en la presente invención como SEQ ID NO: 45-57, o cualquier otro huFN-alfa descrito en la presente invención y/o en Allen G. y Diaz M.O. (1996), anteriormente mencionado) o en
10 comparación con el conjugado no polipeptídico correspondiente, por ejemplo una reducción de la neutralización de al menos 10%, tal como de al menos 25%, tal como de al menos 50%, por ejemplo, al menos 75%.

En otro aspecto de la invención el conjugado puede exhibir una vida media funcional incrementada in vivo y/o una vida media incrementada en suero en
15 comparación con una molécula de referencia tal como un interferón-alfa de humano (por ejemplo cualesquiera de los polipéptidos definidos en la presente invención como SEQ ID NO: 45-57 o cualquier otro huFN-alfa descrito en la presente invención y/o en Allen G. y Diaz M.O. (1996), anteriormente mencionado) o en comparación con el conjugado no polipeptídico correspondiente. Los conjugados particulares preferidos son aquellos
20 conjugados en donde la relación entre la vida media funcional in vivo (o la vida media en suero) de dicho conjugado y la vida media funcional in vivo (o la vida media en suero) de dicha molécula de referencia es al menos 1.25, tal como al menos 1.50, tal como al menos 1.75, tal como al menos 2, tal como al menos 3, tal como al menos 4, tal como al

menos 5, tal como al menos 6, tal como al menos 7, tal como al menos 8. Como se mencionó anteriormente, la vida media se determina de manera conveniente en un animal experimental, tal como una rata o mono, y se puede basar en la administración intravenosamente o subcutáneamente.

- 5 En un aspecto adicional el conjugado puede exhibir una biodisponibilidad incrementada en comparación con una molécula de referencia tal como un interferón-alfa de humano (por ejemplo cualesquiera de los polipéptidos definidos en la presente invención como SEQ ID NO: 45-57, o cualquier otro hIFN-alfa descrito en la presente invención y/o en Allen G. y Diaz M.O. (1996), anteriormente mencionado) o el conjugado
- 10 no polipeptídico correspondiente. Por ejemplo, el conjugado puede exhibir una AUC_{sc} incrementada en comparación con una molécula de referencia tal como un interferón-alfa de humano o el conjugado no polipeptídico correspondiente. Por lo tanto, los conjugados ejemplares son dichos conjugados en donde la relación entre la AUC_{sc} de dicho conjugado y la AUC_{sc} de dicha molécula de referencia es de al menos 1.25, tal como al
- 15 menos 1.5, tal como al menos 2, tal como al menos 3, tal como al menos 4, tal como al menos 5 o al menos 6, tal como al menos 7, tal como al menos 8, tal como al menos 9 o al menos 10, tal como al menos 12, tal como al menos 14, por ejemplo al menos 16, al menos 18 o al menos 20 cuando se administra subcutáneamente, en particular cuando se
- 20 administra subcutáneamente en un animal experimental tal como una rata o mono. De manera análoga, algunos conjugados de la invención son dichos conjugados en donde la relación entre T_{max} para dicho conjugado y T_{max} para dicha molécula de referencia, tal como un interferón-alfa de humano o el conjugado no polipeptídico correspondiente, es de menos 1.2, tal como al menos 1.4, por ejemplo al menos 1.6, tal como al menos 1.8,

tal como al menos 2, por ejemplo al menos 2.5, tal como al menos 3, tal como al menos 4, por ejemplo al menos 5, tal como al menos 6, tal como al menos 7, por ejemplo al menos 8, tal como al menos 9, tal como al menos 10, cuando se administra subcutáneamente, en particular cuando se administra subcutáneamente en un animal experimental tal como una rata o mono.

En algunos casos, se puede reducir la magnitud de la actividad antiviral de un conjugado de la invención (por ejemplo por al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 10%) o incrementar (por ejemplo en al menos aproximadamente 10%) o es aproximadamente igual (por ejemplo en aproximadamente +/-10% o aproximadamente +/-5%) a aquella de un interferón-alfa de humano (por ejemplo cualesquiera de los polipéptidos identificados en la presente invención como SEQ ID NO: 45-57, o cualquier otro hIFN-alfa descrito en la presente invención y/o en Allen G. y Diaz M.O. (1996), anteriormente mencionado) o aquel del conjugado no polipeptídico correspondiente. En algunos casos el grado de actividad antiviral en comparación con la actividad antiproliferativa de un conjugado de la invención puede variar, y por lo tanto puede ser mayor, menos o aproximadamente igual a aquél de un interferón-alfa de humano o aquel del conjugado no polipeptídico correspondiente.

Conjugado de la invención en donde la porción no polipeptídica se une a un residuo de lisina o a la amina N-terminal

En un aspecto, la invención se refiere a un conjugado que exhibe una actividad de interferón-alfa y que comprende al menos una porción no polipeptídica

151

conjugada a al menos un residuo de lisina y/o al grupo amino N terminal de un polipéptido de interferón-alfa que comprende una secuencia seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 2-35 y 37-44. Algunos de dichos conjugados comprenden una porción no polipeptídica unida a un residuo de lisina seleccionado a partir de K31, K50, K71, K84, K122, K134, K135, y K165; tal como, por ejemplo, un residuo de lisina seleccionado a partir de K31, K122, K135, y K165. Algunos de dichos conjugados comprenden una porción no polipeptídica unida a un residuo de lisina seleccionado a partir de K31, K122, y K135. Algunos de dichos conjugados comprenden una porción no polipeptídica unida a un residuo de lisina seleccionado a partir de K122 y K135. Algunos de dichos conjugados comprenden una porción no polipeptídica unida a un residuo de lisina seleccionado a partir de K31 y K122; o K31 y K135.

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado que exhibe una actividad de interferón-alfa y que comprende al menos una porción no polipeptídica conjugada a al menos un residuo de lisina, o al grupo amino N terminal, de un polipéptido del interferón-alfa que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos (tal como en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos) a partir de SEQ ID NO: y (b) comprende una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 1 seleccionadas a partir del grupo que consiste de F48A/L; V51P; F55A; F65A; F68P;

153

152

L111A; y V114P. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica que comprende adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. Algunos conjugados de conformidad con este aspecto comprenden al menos un residuo removido de lisina y/o al menos un residuo removido de
 5 histidina, y/o al menos un residuo introducido de lisina.

La invención también provee un conjugado que exhibe una actividad de interferón-alfa y que comprende al menos una porción no polipeptídica conjugada a al menos un residuo de lisina, o al grupo amino N terminal, de un polipéptido de interferón-alfa que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 0 a 16 posiciones de aminoácidos
 10 a partir de SEQ ID NO: 13 (tal como en 0-15 posiciones de aminoácidos, en 0-14 posiciones de aminoácidos, en 0-13 posiciones de aminoácidos, en 0-12 posiciones de aminoácidos, en 0-11 posiciones de aminoácidos, en 0-10 posiciones de aminoácidos, en 0-9 posiciones de aminoácidos, en 0-8 posiciones de aminoácidos, en 0-7 posiciones de aminoácidos, en 0-6 posiciones de aminoácidos, en 0-5 posiciones de aminoácidos, en 0-
 15 4 posiciones de aminoácidos, en 0-3 posiciones de aminoácidos, en 0-2 posiciones de aminoácidos, o en 0-1 posiciones de aminoácidos) y (b) comprende uno o más de: Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 111; y Pro en la posición 114 (numeración de la posición en relación con SEQ ID NO: 13), algunos de dichos conjugados comprenden una
 20 secuencia polipeptídica la cual comprende una Ala o una Leu en la posición 48. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual comprende una Ala en la posición 48. En algunos casos, la parte polipeptídica del conjugado comprende adicionalmente una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 13 seleccionadas a partir

154

153

del grupo que consiste de H47Q; V51A; Q52P/E; A53T; F55S; L56V; F57L; Y58H; M61I; N113K; V114E; y E160D. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica que comprende adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. Algunos conjugados de conformidad con este aspecto comprenden al menos un residuo removido de lisina y/o al menos un residuo removido de histidina, y/o al menos un residuo introducido de lisina.

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado que exhibe una actividad de interferón-alfa y que comprende al menos una porción no polipeptídica conjugada a al menos un residuo de lisina, o al grupo amino N terminal, de un polipéptido de interferón-alfa que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos (tal como en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos) a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A; I24P; F48A/L; T51P; S55A; F65A; F68P; F90A; M93P; L111A; V114P; F124A; I127P; y E160D. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica que comprende adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. Algunos conjugados de conformidad con este aspecto comprenden al

155

154

menos un residuo removido de lisina y/o al menos un residuo removido de histidina, y/o al menos un residuo introducido de lisina.

La invención también provee un conjugado que exhibe una actividad de interferón-alfa y que comprende al menos una porción no polipeptídica conjugada a al menos un residuo de lisina, o al grupo amino N terminal, de un polipéptido interferón-alfa que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 0 a 16 posiciones de aminoácidos (tal como en 0-15 posiciones de aminoácidos, en 0-14 posiciones de aminoácidos, en 0-13 posiciones de aminoácidos, en 0-12 posiciones de aminoácidos, en 0-11 posiciones de aminoácidos, en 0-10 posiciones de aminoácidos, en 0-9 posiciones de aminoácidos, en 0-8 posiciones de aminoácidos, en 0-7 posiciones de aminoácidos, en 0-6 posiciones de aminoácidos, en 0-5 posiciones de aminoácidos, en 0-4 posiciones de aminoácidos, en 0-3 posiciones de aminoácidos, en 0-2 posiciones de aminoácidos, o en 0-1 posiciones de aminoácidos) a partir de SEQ ID NO: 38 y (b) comprende uno o más de: Ala en la posición 21; Pro en la posición 24; Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 90; Pro en la posición 93; Ala en la posición 111; Pro en la posición 114; Ala en la posición 124; Pro en la posición 127; y Glu en la posición 160 (numeración de la posición en relación con SEQ ID NO: 38). Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual comprende una Ala o una Leu en la posición 48. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica la cual comprende una Ala en la posición 48. En algunos casos, la parte polipeptídica del conjugado comprende adicionalmente una o más sustituciones a SEQ ID NO: 38 seleccionadas a partir del grupo que consiste de P26L; H47Q; V51T; F55P/S; L56V; Y58H; L60M; F90Y; M93L;

+56

155

N95D; N113K; V114E; R125Q; T132K; y F154L. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica que comprende adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. Algunos conjugados de conformidad con este aspecto comprenden al menos un residuo removido de lisina y/o al menos un residuo removido de histidina, y/o al menos un residuo introducido de lisina.

10 Algunos conjugados de la invención comprenden una secuencia polipeptídica que comprende una sustitución de un residuo de aminoácido para un residuo diferente de aminoácido, o una delección de un residuo de aminoácido, la cual remueve una o más lisinas, tal como, uno o más de K31, K50, K71, K84, K122, K133, K134, K135, y/o K165 a partir de un polipéptido de la invención tal como, por ejemplo, uno de SEQ ID NOs: 2-35 y 37-44. El uno o más residuos de lisina a ser removidos se pueden sustituir con cualquier otro aminoácido, se pueden sustituir con una Arg (R) o Gln (Q), o se pueden deletar.

15 En los casos en donde se emplearon químicas de conjugación amina reactiva, se puede evitar de manera ventajosa o minimizar el potencial para conjugación a los residuos de histidina. Por lo tanto, algunos conjugados de la invención comprenden una secuencia polipeptídica que comprende una sustitución o una delección la cual remueve una o más histidinas, por ejemplo, H7, H11, H34, y/o H47 (relativa a SEQ ID NO: 1) a partir de cualquier secuencia polipeptídica de la invención tal como, por ejemplo, una de una de SEQ ID NOs: 2-35 y 37-44. El uno o más residuos de histidina a ser removidos se pueden sustituir con cualquier otro aminoácido, se pueden sustituir con una

20

157

Arg (R) o Gln (Q), o se pueden deletar. Algunos de dichos conjugados comprenden las sustituciones H34Q; H47Q; o H34Q+H47Q.

Alternativamente, o en adición, algunos conjugados de la invención comprenden una secuencia polipeptídica que comprende una modificación la cual introduce una lisina dentro de una posición que está ocupada en la secuencia parental (por ejemplo, una de SEQ ID NOs: 2-35 y 37-44) por un residuo de aminoácido que está expuesto a la superficie de la molécula, por ejemplo, uno que tiene al menos 25%, tal como al menos 50% de su cadena lateral expuesta a la superficie. Algunos de dichos conjugados comprenden una secuencia polipeptídica que comprende una o más de las siguientes sustituciones, relativas a SEQ ID NO: 1, la cual introduce un residuo de lisina dentro de una posición la cual se pronostica que está expuesta en la superficie de la molécula con más de una ASA fraccional al 25%: D2K, L3K, P4K, Q5K, T6K, H7K, S8K, L9K, G10K, R12K, R13K, M16K, A19K, Q20K, R22K, R23K, I24K, S25K, L26K, F27K, S28K, L30K, R33K, H34K, D35K, R37K, Q40K, E41K, E42K, D44K, N46K, H47K, Q49K, V51K, Q52K, E59K, Q62K, Q63K, N66K, S69K, T70K, D72K, S74K, A75K, D78K, E79K, T80K, L81K, E83K, I87K, F90K, Q91K, N94K, D95K, E97K, A98K, V100K, M101K, Q102K, E103K, V104K, G105K, E107K, E108K, T109K, P110K, L111K, M112K, N113K, V114K, D115K, L118K, R121K, Q125K, R126K, T128K, L129K, T132K, E133K, Y136K, S137K, P138K, A146K, M149K, R150K, S153K, F154K, N157K, Q159K, E160K, S161K, L162K, R 163K, S164K, y E 166K, dichas posiciones de los residuos de aminoácidos relativas a SEQ ID NO: 1:

Algunos de dichos conjugados de la invención comprenden una secuencia polipeptídica que comprende uno o más de las siguientes sustituciones, relativas a SEQ

157

ID NO: 1, la cual introduce un residuo de lisina dentro de una posición la cual se pronostica que está expuesta en la superficie de la molécula con más de una ASA fraccional al 50%: D2K, L3K, P4K, Q5K, T6K, H7K, S8K, L9K, R12K, R13K, M16K, A19K, S25K, F27K, S28K, R33K, H34K, D35K, R37K, E41K, D44K, N46K, H47K, Q49K, N66K, A75K, D78K, E79K, T80K, E83K, I87K, F90K, Q91K, N94K, D95K, M101K, Q102K, E103K, G105K, E107K, E108K, T109K, P110K, L111K, V114K, DI 15K, L118K, R121K, Q125K, R126K, L129K, T132K, E133K, P138K, R150K, E160K, L162K, R163K, S164K y E166K, dichas posiciones de los residuos de aminoácidos relativas a SEQ ID NO: 1.

Se debe entender que aunque los ejemplos de modificaciones al polipéptido parental generalmente se proveen en la presente invención en relación con la secuencia SEQ ID NO: 1 (o relativa a alguna otra secuencia especificada), las modificaciones descritas también se pueden elaborar en posiciones equivalentes de aminoácidos de otros polipéptidos de la invención (incluyendo SEQ ID NOs: 2-35 y 37-44 y variantes de los mismos) descritos en la presente invención. Por lo tanto, como un ejemplo, se entiende que la sustitución H47K relativa a SEQ ID NO: 1 corresponde a Q47K en SEQ ID NO: 37, y así sucesivamente.

Las porciones no polipeptídicas contempladas para este aspecto de la invención incluyen moléculas poliméricas, tales como cualesquiera de las moléculas mencionadas en la sección titulada "conjugación a una molécula polimérica", tal como PEG o mPEG o mPEG2. La conjugación entre el polipéptido que contiene lisina y la molécula polimérica se puede lograr de cualquier forma adecuada, por ejemplo como se describe en la sección titulada "conjugación a una molécula polimérica", por ejemplo utilizando un método de un paso o de la manera paso a paso referida en dicha sección.

189

Cualquier método ejemplar para PEGilar el polipéptido de interferón-alfa es unir covalentemente el PEG a los residuos de lisina utilizando los PEGs reactivos a lisina, tal como se describe en el ejemplo 5 a continuación. Numerosos PEGs altamente específicos, reactivos a lisina (tales como por ejemplo, succinimidil propionato (SPA), succinimidil butanoato (SBA), N-hidroxilsuccinimida (NHS), y aldehído (por ejemplo, ButyrALD)) y PEGs lineales o ramificados de diferente tamaño (por ejemplo, 2-40 kDa, tales como 2 kDa, 5 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, o 40 kDa) están comercialmente disponibles, por ejemplo a partir de Nektar Therapeutics Inc., Huntsville, AL, EUA, o SunBio, Anyang City, Corea del sur.

En otro aspecto, la invención incluye una composición que comprende una población de conjugados en donde la mayoría de los conjugados de dicha población contiene cada uno una porción no polipeptídica particular (tal como, una molécula polimérica particular, por ejemplo, un PEG particular, tal como un PEG lineal o un PEG ramificado) covalentemente unida a un residuo particular de lisina o grupo amino N-terminal del polipéptido. Por ejemplo, una composición "monoconjugada" (tal como, un "monoPEGilado") de la invención comprende uno o más "isómeros posicionales" de dicho conjugado, en donde cada isómero posicional contiene una porción no polipeptídica particular (por ejemplo, una molécula PEG particular) covalentemente unida a un residuo particular de lisina del polipéptido.

La invención incluye una composición monoPEGilada que comprende una población de conjugados, en donde la mayoría de los conjugados de dicha población son isómeros posicionales cada uno conteniendo una molécula PEG particular (tal como, un PEG lineal o ramificado, tal como una molécula mPEG o mPEG2 de 2 kDa, 5 kDa, 12

kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, o 40 kDa) covalentemente unida a un residuo particular de lisina de un polipéptido de la invención.

Algunos de dichos isómeros posicionales contiene una molécula de PEG particular covalentemente unida a un residuo de lisina seleccionado a partir de K31, K50, K71, K84, K122, K134, K135, y K165. Algunos de dichos isómeros posicionales contiene una molécula de PEG particular covalentemente unida a un residuo de lisina seleccionado a partir de K31, K122, K135, y K165. Algunos de dichos isómeros posicionales contiene una molécula de PEG particular covalentemente unida a un residuo de lisina seleccionado a partir de K31, K122, y K135, tal como, una molécula particular de PEG covalentemente unida a un residuo de lisina seleccionado a partir de K31 y K122; K31 y K135; o K122 y K135.

El ejemplo 5 en la presente invención describe la preparación de composiciones monoPEGiladas de la invención. Una composición monoPEGilada de un polipéptido de la invención identificada en la presente invención como 14epi 18 (SEQ ID NO: 13) reaccionó con un PEG ramificado de 40 kDa (mPEG2-NHS) de conformidad con el procedimiento del ejemplo 5 contiene predominantemente dos isómeros posicionales, una con una porción PEG particular covalentemente unida a Lys122 y otra con una porción PEG particular covalentemente unida a Lys135. Por consiguiente, la invención incluye una composición (por ejemplo una composición monoPEGilada), dicha composición comprendiendo un polipéptido conjugado que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13 en donde una porción PEG covalentemente unida a Lys 122 o Lys 135. La invención también incluye una composición (por ejemplo una composición monoPEGilada), dicha composición que comprende un polipéptido conjugado que

comprende la secuencia SEQ ID NO: 13 en donde una porción PEG de 40 kDa (por ejemplo, una porción PEG ramificado de 40 kDa) está covalentemente unida a Lys122 o Lys135.

Una composición monoPEGilada de otro polipéptido de la invención
5 ejemplar, identificado en la presente invención como 25epi 19 (SEQ ID NO: 38), cuando se hace reaccionar con un PEG ramificado de 40 kDa (mPEG2-NHS) de conformidad con el procedimiento del ejemplo 5 predominantemente contiene tres isómeros posicionales, uno con una porción PEG particular covalentemente unida a Lys 31, otro con una porción PEG particular covalentemente unida a Lys 122, y otro con una porción PEG particular
10 covalentemente unida a Lys 135. Por consiguiente, la invención incluye una composición (por ejemplo una composición monoPEGilada), dicha composición comprendiendo un polipéptido conjugado que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38 en donde una porción PEG está covalentemente unida a Lys31, Lys122, o Lys135. La invención también incluye una composición (por ejemplo una composición monoPEGilada), dicha composición que
15 comprende a polipéptido conjugado que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38 en donde una porción PEG de 40 kDa (por ejemplo, una porción PEG ramificado de 40 kDa) está covalentemente unida a Lys31, Lys122, o Lys135.

Conjugado de la invención en donde la porción no polipeptídica se une a un
20 residuo de cisteína

En un aspecto, la invención se refiere a un conjugado que exhibe una actividad de interferón-alfa y que comprende al menos una porción no polipeptídica conjugada a al menos un residuo de cisteína de un polipéptido de interferón-alfa que

comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos (tal como en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos) a partir de SEQ ID NO: y (b) comprende una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: seleccionadas a partir del grupo que consiste de F48A/L; V51P; F55A; F65A; F68P; L111A; y V114P.

Algunos conjugados de conformidad con este aspecto comprenden al menos un residuo introducido de cisteína.

En otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado que exhibe una actividad de interferón-alfa y que comprende al menos una porción no polipeptídica conjugada a al menos un residuo de cisteína de un polipéptido de interferón-alfa que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos (tal como en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos) a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A; I24P; F48A/L; T51P; S55A; F65A;

162

F68P; F90A; M93P; L111A;VI 14P; F124A; I127P; y E160D. Algunos conjugados de conformidad con este aspecto comprenden al menos un residuo introducido de cisteína.

Por ejemplo, algunos conjugados de la invención comprenden una secuencia polipeptídica que comprende adicionalmente una o más de las siguientes sustituciones, relativas a SEQ ID NO: 1, la cual introduce un residuo de cisteína dentro de una posición la cual se pronostica que está expuesta en la superficie de la molécula con más de una ASA fraccional al 25%: D2C, L3C, P4C, Q5C, T6C, H7C, S8C, L9C, G10C, R12C, R13C, M16C, A19C, Q20C, R22C, R23C, I24C, S25C, L26C, F27C, S28C, L30C, K31C, R33C, H34C, D35C, R37C, Q40C, E41C, E42C, D44C, N46C, H47C, Q49C, K50C, V51C, Q52C, E59C, Q62C, Q63C, N66C, S69C, T70C, K71C, D72C, S74C, A75C, D78C, E79C, T80C, L81C, E83C, K84C, I87C, F90C, Q91C, N94C, D95C, E97C, A98C, V100C, M101C, Q102C, E103C, V104C, G105C, E107C, E108C, T109C, P110C, L111C, M112C, N113C, V114C, D115C, L118C, R121C, K122C, Q125C, R126C, T128C, L129C, T132C, E133C, K134C, K135C, Y136C, S137C, P138C, A146C, M149C, R150C, S153C, F154C, N157C, Q159C, E160C, S161C, L162C, R163C, S164C, K165C y E166C, dichas posiciones de los residuos de aminoácidos relativas a SEQ ID NO: 1.

Algunos de dichos conjugados de la invención comprenden una secuencia polipeptídica que comprende adicionalmente una o más de las siguientes sustituciones, relativas a SEQ IDNO: 1, la cual introduce un residuo de cisteína dentro de una posición la cual se pronostica que está expuesta en la superficie de la molécula con más de una ASA fraccional al 50%: D2C, L3C, P4C, Q5C, T6C, H7C, S8C, L9C, R12C, R13C, M16C, A19C, S25C, F27C, S28C, K31C, R33C, H34C, D35C, R37C, E41C, D44C, N46C, H47C, Q49C, K50C, N66C, K71C, A75C, D78C, E79C, T80C, E83C, K84C, I87C, F90C, Q91C,

TEA

N94C, D95C, M101C, Q102C, E103C, G105C, E107C, E108C, T109C, P110C, L111C, V114C, D115C, L118C, R121C, K122C, Q125C, R126C, L129C, T132C, E133C, K135C, P138C, R150C, E160C, L162C, R163C, S164C, K165C y E166C, dichas posiciones de los residuos de aminoácidos relativas a SEQ ID NO: 1.

5 Se debe entender que aunque generalmente se proveen en la presente invención los ejemplos de modificaciones al polipéptido parental en relación con la secuencia SEQ ID NO: (o relativa a alguna otra secuencia especificada), las modificaciones descritas también se pueden elaborar en posiciones equivalentes de aminoácidos de otros polipéptidos de la invención (incluyendo SEQ ID NOs: 2-35 y 37-44
10 y variantes de las mismas) descritas en la presente invención. Por lo tanto, como un ejemplo, se entiende que la sustitución H47C relativa a SEQ ID NO: 1 corresponde a Q47C en SEQ ID NO: 37, y así sucesivamente.

En algunos casos, solamente un residuo particular de cisteína se introduce con el objeto de evitar la formación de enlaces disulfuro entre dos o más residuos
15 introducidos de cisteína.

En los interferones alfa, los enlaces disulfuro se forman entre las cisteínas en las posiciones 1/99 y 29/139. El enlace disulfuro 29/139 es esencialmente para la actividad biológica, mientras que el enlace 1/99 se puede reducir sin afectar significativamente la actividad biológica (Beilharz M. W. et al. (1986) J. Interferon Res. 6
20 (6): 677-685). Por lo tanto, en otro aspecto de la invención uno de C1 o C99 se remueve, preferiblemente mediante sustitución, por ejemplo C1S o C99S, dejando así al otro residuo de cisteína disponible para conjugación con una porción no polipeptídica.

Las porciones no polipeptídicas contempladas en este aspecto de la invención incluyen moléculas poliméricas, tales como cualesquiera de las moléculas mencionadas en la sección titulada "conjugación a una molécula polimérica", tales como PEG o mPEG. La conjugación entre el polipéptido que contiene cisteína y la molécula polimérica se puede lograr de cualquier forma adecuada, por ejemplo como se describe en la sección titulada "conjugación a una molécula polimérica", por ejemplo utilizando un método de un paso o de la manera paso a paso referida en dicha sección. Un método ejemplar para PEGilar el polipéptido de interferón-alfa es unir covalentemente el PEG a los residuos de cisteína utilizando PEGs reactivos a cisteína. Numerosos PEGs altamente específicos, reactivos a cisteína con diferentes grupos (por ejemplo ortopiridil-disulfuro (OPSS), maleimida (MAL) y vinilsulfona (VS)) y PEGs lineales o ramificados de diferente tamaño (por ejemplo, 2-40 kDa, tales como 2 kDa, 5 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, o 40 kDa) están comercialmente disponibles, por ejemplo a partir de Nektar Therapeutics Inc., Huntsville, AL, EUA, o SunBio, Anyang City, Corea del sur.

Porción no polipeptídica del conjugado de la invención

Como se indicó anteriormente, la porción no polipeptídica del conjugado de la invención generalmente se selecciona a partir del grupo que consiste de una molécula polimérica, un compuesto lipófilo, una porción de azúcar (por ejemplo, por medio de N-glicosilación in vivo) y un agente derivado orgánico. Todos estos agentes pueden conferir propiedades deseables a la parte polipeptídica del conjugado, tales como inmunogenicidad reducida, vida media funcional in vivo incrementada, vida media en suero incrementada, biodisponibilidad incrementada y/o AUC_{sc} incrementada. La parte

165

polipeptídica del conjugado frecuentemente está conjugada a solamente un tipo de porción no polipeptídica, pero también se puede conjugar a dos o más diferentes tipos de porciones no polipeptídicas, por ejemplo a una molécula polimérica y a una porción de azúcar, etc. La conjugación a dos o más porciones diferentes no polipeptídicas se puede realizar simultáneamente o secuencialmente. La elección de la porción/porciones no polipeptídicas, depende especialmente del efecto deseado que se desea lograr por la conjugación. Por ejemplo, se ha encontrado que las porciones de azúcar son particularmente útiles para reducir la inmunogenicidad, mientras que las moléculas poliméricas tales como PEG son de uso particular para incrementar la vida media funcional in vivo y/o la vida media en suero. Utilizando una combinación de una molécula polimérica y una porción de azúcar puede mejorar la reducción en inmunogenicidad y el incremento en vida media funcional in vivo o en vida media en suero.

En las siguientes secciones se describen "la conjugación a un compuesto lipófilo", "conjugación a una molécula polimérica", "conjugación a una porción de azúcar" y "conjugación a un agente derivado orgánico", conjugación a tipos específicos de porciones no polipeptídicas.

Conjugación a un compuesto lipófilo

Para la conjugación a un compuesto lipófilo los siguientes grupos polipeptídicos pueden funcionar como grupos de unión: el N terminal o C terminal del polipéptido, los grupos hidroxilo de los residuos de aminoácidos Ser, Thr o Tyr, los grupos ϵ -amino de Lys, el grupo SH de Cys o el grupo carboxilo de Asp y Glu. El polipéptido y el compuesto lipófilo se pueden conjugar entre sí ya sea directamente o mediante el uso de

767

un enlazador. El compuesto lipófilo puede ser un compuesto natural tal como un ácido graso saturado o insaturado, una dicetona de ácido graso, un terpeno, una prostaglandina, una vitamina, un carotenoide o esteroide, o un compuesto sintético tal como un ácido carbónico, un alcohol, una amina y ácido sulfónico con uno o más alquilo, arilo, alquenilo o otros múltiples compuestos insaturados. La conjugación entre el polipéptido y el compuesto lipófilo, opcionalmente a través de un enlazador se puede realizar de conformidad con los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe por Bodanszky en Peptide Synthesis, John Wiley, New York, 1976 y en WO 96/12505.

10

Conjugación a una molécula polimérica

La molécula polimérica a ser acoplada al polipéptido puede ser cualquier molécula polimérica adecuada, tal como un homopolímero o heteropolímero natural o sintético, típicamente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 300-100,000 Da, tal como aproximadamente 1000-50,000 Da, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 1000- 40,000 Da. Más particularmente, la molécula polimérica, tal como PEG, en particular mPEG, típicamente tendrá un peso molecular de aproximadamente 2, 5, 10, 12, 15, 20, 30, 40 o 50 kDa, en particular un peso molecular de aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 12 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 30 kDa o aproximadamente 40 kDa. La molécula PEG puede estar ramificada (por ejemplo, mPEG2), o puede no estar ramificada (por ejemplo, lineal).

162

Cuando se utiliza aproximadamente en las moléculas poliméricas en la presente invención, la palabra "aproximadamente" indica un peso molecular promedio aproximado y refleja el hecho de que habrá normalmente una cierta distribución de peso molecular en una preparación polimérica dada.

5 Los ejemplos de homopolímeros incluyen un poliol (por ejemplo poli-OH), una poliamina (por ejemplo poli-NH₂) y un ácido policarboxílico (por ejemplo poli-COOH). Un heteropolímero es un polímero del cual comprende uno o más diferentes grupos de acoplamiento, tales como un grupo hidroxilo y un grupo amina.

10 Los ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas a partir del grupo que consiste de óxido de polialquileno (PAO), incluyendo polialquilenglicol (PAG), tal como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEGs ramificados (PEG2), poli-vinil alcohol (PVA), policarboxilato, poli-(vinilpirrolidona), anhídrido de ácido polietilén-co-maléico, anhídrido de ácido poliestirén-co-málico, dextrán incluyendo carboximetil-dextrán, o cualquier otro
15 biopolímero adecuado para reducir la inmunogenicidad y/o incrementar la vida media funcional in vivo y/o vida media en suero. Generalmente, los polímeros derivados de polialquilenglicol son biocompatibles, no tóxicos, no antigénicos, no inmunogénicos, tienen diversas propiedades de solubilidad en agua, y se excretan fácilmente a partir de organismos vivos.

20 PEG es la molécula polimérica preferida a ser utilizada, puesto que solamente tiene pocos grupos reactivos capaces de formar enlaces cruzados en comparación con por ejemplo polisacáridos tal como dextran. En particular, el PEG monofuncional, por ejemplo monometoxipolietilenglicol (mPEG), es de interés puesto que

169

168

su química de acoplamiento es relativamente simple (solamente un grupo reactivo está disponible para conjugación con grupos de unión en el polipéptido). Consecuentemente, se elimina el riesgo de formación de enlaces cruzados, los polipéptido conjugados resultantes son más homogéneos y la reacción de las moléculas poliméricas con el polipéptido es más fácil de controlar.

Para llevar a cabo la unión covalente de las moléculas poliméricas al polipéptido, los grupos terminales hidroxilo de la molécula poliméricas se deben proveer en forma activa, por ejemplo con grupos funcionales reactivos (ejemplos de los cuales incluyen grupos amino primarios, hidrazida (HZ), tiol, succinato (SUC), succinimidil succinato (SS), succinimidil succinamida (SSA), succinimidil propionato (SPA), succinimidil butanoato (SBA), succinimidil carboximetilato (SCM), benzotriazol carbonato (BTC), N-hidroxisuccinimida (NHS), aldehído, nitrofenilcarbonato (NPC), y tresilato (TRES)). Las moléculas poliméricas activadas de manera adecuada esté comercialmente disponibles, por ejemplo a partir de Nektar Therapeutics, Inc., Huntsville, AL, EUA; PolyMASC Pharmaceuticals plc, RU; o SunBio Corporation, Anyang City, Corea del sur. Alternativamente, las moléculas poliméricas se pueden activar mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en WO 90/13540. Los ejemplos específicos de moléculas poliméricas lineales o ramificadas activadas adecuadas para uso en la presente invención se describen en the Nektar Therapeutics, Inc. 2003 Catalog ("Nektar Molecule Engineering: Poliyethylen Glycol and Derivatives for Advanced Pegylation, Catalog 2003"), incorporado como referencia en la presente invención. Los ejemplos específicos de polímeros PEG activados incluyen los siguientes PEGs lineales: NHS-PEG, SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-

170

PEG, SG-PEG, SCM-PEG, NOR-PEG, BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, OPSS-PEG, IODO-PEG, y MAL-PEG, y PEGs ramificados, tales como PEG2-NHS, PEG2-MAL, y aquellos descritos en US 5,932,462 y US 5,643,575, ambos incorporados en la presente invención como referencias. Además, las siguientes publicaciones, incorporados en la presente invención como referencias, describen moléculas poliméricas útiles y/o químicas de PEGilación: US 5,824,778, US 5,476,653, WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, US 4,902,502, US 5,281,698, US 5,122,614, US 5,219,564, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO 95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, US 5,736,625, WO 98/05363, EP 809 996, US 5,629,384, WO 96/41813, WO 96/07670, US 5,473,034, US 5,516,673, EP 605 963, US 5,382,657, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 y EP 154 316.

La conjugación del polipéptido y las moléculas poliméricas activadas se lleva a cabo mediante cualquier método convencional, por ejemplo como se describe en las siguientes referencias (las cuales también describen métodos adecuados para la activación de moléculas poliméricas): Harris y Zalipsky, eds., Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications, AZC, Washington; R. F. Taylor, (1991), "Protein immobilisation. Fundamental and applications", Marcel Dekker, N. Y.; S. S. Wong, (1992), "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson et al., (1993), "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, N.Y.

170

Para la PEGilación de residuos de cisteína el polipéptido usualmente se trata con un agente reductor, tal como ditioneitol (DDT) antes de la PEGilación. El agente reductor se remueve subsecuentemente mediante cualquier método convencional, tal como mediante desalado. La conjugación de PEG a un residuo de cisteína típicamente

5 tomar lugar en un regulador de pH adecuado a pH 6-9 a temperaturas variables a partir de 4°C a 25°C por periodos de hasta aproximadamente 16 horas. Los ejemplos de polímeros PEG activados para el acoplamiento a residuos de cisteína incluyen los siguientes PEG lineales y ramificados: vinilsulfona-PEG (PEG-VS), tal como vinilsulfona-mPEG (mPEG-VS); ortopiridil-disulfuro-PEG (PEG-OPSS), tal como ortopiridil-disulfuro-

10 mPEG (mPEG- OPSS); y maleimida-PEG (PEG-MAL), tal como maleimida-mPEG (mPEG-MAL) y maleimida ramificada-mPEG2 (mPEG2-MAL).

La pegilación de lisinas frecuentemente emplea PEG-N-hidroxilsuccinimida (por ejemplo, mPEG-NHS o mPEG2-NHS), o ésteres tales como PEG succinimidil propionato (por ejemplo, mPEG-SPA) o PEG succinimidil butanoato (por ejemplo, mPEG-

15 SBA). Uno o más PEGs se pueden unir a una proteína dentro de los primeros 30 minutos a pH 8-9.5 a temperatura ambiente si se mezclan aproximadamente cantidades equimolares de PEG y proteína. Una relación molar de PEG con respecto a los grupos amino de proteína de 1-5 a 1 usualmente será adecuada. El incremento de pH incrementa la velocidad de la reacción, mientras que la disminución del pH reduce la

20 velocidad de la reacción. Estos ésteres activos altamente reactivos se pueden acoplar a pH fisiológico, pero los derivados menos reactivos típicamente requieren un mayor pH. También se pueden emplear bajas temperaturas si se utiliza una proteína lábil. Bajo condiciones de baja temperatura, se puede utilizar un tiempo de reacción más largo.

172

La PEGilación N-terminal se facilita por la diferencia entre los valores de pKa del grupo α -amino del aminoácido N-terminal (~7.6 a 8.0) y el grupo ϵ -amino de lisina (~10). La PEGilación del grupo amino N-terminal frecuentemente emplea PEG-aldehídos (tal como mPEG-propionaldehído o mPEG-butilaldehído), los cuales son más selectivos para aminas y por lo tanto reaccionan menos probablemente con el grupo imidazol de la histidina; además, los reactivos PEG utilizados para la conjugación de lisina (tales como mPEG-SPA, mPEG-SBA, o mPEG- NHS) también se pueden utilizar para la conjugación de la amina N-terminal. La conjugación de un PEG-aldehído al grupo amino N terminal típicamente tomar lugar en un regulador de pH adecuado (tal como, regulador de pH con acetato de sodio 100 mM o bifosfato sódico 100 mM con cianoborohidruro sódico 20 mM) a pH ~5.0 durante toda la noche a temperaturas variables de aproximadamente 4°C a 25°C. Los métodos y químicas útiles de PEGilación N-terminal también se describen en la Patente de E.U.A. 5,985,265 y Patente de E.U.A. 6,077,939, ambas incorporadas en la presente invención como referencias.

Típicamente, los polímeros PEG o mPEG lineales tendrán un peso molecular de aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 12 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 20 kDa, o aproximadamente 30 kDa. Los polímeros PEG ramificados (PEG2 o mPEG2) típicamente tendrán un peso molecular de aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 20 kDa, o aproximadamente 40 kDa. En algunos casos, se pueden utilizar los reactivos PEG2 ramificados de mayor peso molecular, tales como PEG2 de 20 kDa o 40 kDa, incluyendo por ejemplo PEGilación mPEG2- NHS para la lisina, PEGilación mPEG2-MAL para la cisteína, o PEGilación del MPEG2-aldehído por N-terminal (todos disponibles a partir de Nektar Therapeutics, Inc,

172

Huntsville AL). La estructura ramificada del compuesto PEG2 resulta en un volumen molecular relativamente grande, de manera que menos moléculas unidas (o, una molécula unida) pueden impartir las características deseadas de la molécula PEGilada.

La persona experta en la técnica está consciente de que el método de activación y/o la química de conjugación a ser utilizado dependen de los grupos de unión del polipéptido de interferón-alfa así como los grupos funcionales del polímero (por ejemplo, siendo amino, hidroxilo, carboxilo, aldehído o sulfhidrilo). La PEGilación se puede dirigir hacia la conjugación de todos los grupos de unión disponibles al polipéptido (por ejemplo dichos grupos de unión que se exponen en la superficie del polipéptido) o que se pueden dirigir hacia los grupos de unión específicos, por ejemplo residuos de cisteína, residuos de lisina, o el grupo amino N-terminal.

Además, la conjugación se puede lograr en un paso o de manera paso a paso (por ejemplo, se describe en WO 99/55377).

En algunos casos, la conjugación del polímero se lleva a cabo bajo condiciones que tienen el objetivo de reaccionar tanto como sea posible de los grupos poliméricos de unión con las moléculas poliméricas. Esto se logra por medio de un exceso molar adecuado del polímero en relación con el polipéptido. Las relaciones molares típicas de moléculas poliméricas activadas con respecto al polipéptido son de hasta aproximadamente 1000-1, tal como hasta aproximadamente 200-1 o hasta aproximadamente 100-1. En algunos casos, la relación puede ser de alguna manera menor, sin embargo, tal como hasta aproximadamente 50-1, 10-1 o 5-1. También se pueden utilizar relaciones equimolares.

194

También se contempla de conformidad con la invención acoplar las moléculas poliméricas al polipéptido a través de un enlazador. Los enlazadores adecuados se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. Un ejemplo preferido es cloruro cianúrico (Abuchowski et al., (1977), J. Biol. Chem., 252, 3578-3581; US 4,179,337; Shafer et al., (1986), J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed., 24, 375-378).

De manera subsecuente las moléculas poliméricas activadas por conjugación residual son bloqueadas de conformidad con los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante la adición de una amina primaria a la mezcla de reacción, y las moléculas poliméricas inactivadas resultantes se remueven mediante un método adecuado.

El acoplamiento covalente in vitro de una porción de azúcar con respecto a los residuos de aminoácidos de interferón-alfa se puede utilizar para modificar o incrementar el número o perfil de los sustituyentes de azúcar. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el carbohidrato(s) a ser unido a a) arginina e histidina (Lundblad y Noyes, Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida), b) grupos carboxilo libres (por ejemplo del residuo aminoácido C-terminal, asparagina o glutamina), c) grupos sulfhidrilo libres tales como aquel de la cisteína, d) grupos hidroxilo libres tales como aquellos de la serina, treonina, tirosina o hidroxiprolina, e) residuos aromáticos tales como aquellos de la fenilalanina o triptofano o f) el grupo amida de la glutamina. Estos residuos de aminoácidos constituyen ejemplos de grupos de unión para una porción de azúcar, la cual se puede introducir y/o remover en el polipéptido de interferón-alfa. Los métodos adecuados de acoplamiento in vitro se describen en WO 87/05330 y en Aplin et al., CRC Crit Rev. Biochem., pp. 259-306, 1981.

El acoplamiento in vitro de porciones de azúcar o PEG a residuos de Gln unidos a la proteína o al péptido también se puede llevar a cabo por las transglutaminasas (TGasas), por ejemplo como se describe por Sato et al., 1996 Biochemistry 35, 13072-13080 o en EP 725145.

5

Acoplamiento a una porción de azúcar

Con el objeto de lograr la glicosilación in vivo de un polipéptido de interferón-alfa que ha sido modificado mediante la introducción de uno o más sitios de glicosilación, la secuencia nucleotídica que codifica la parte polipeptídica del conjugado se inserta en un hospedero de expresión eucarionte para glicosilación. La célula hospedera de expresión se puede seleccionar a partir de células fungales (hongos filamentosos o levadura), células de insecto, células animales de mamífero, a partir de células vegetales transgénicas o a partir de animales transgénicos. Además, la glicosilación se puede lograr en el cuerpo humano cuando se utiliza una secuencia nucleotídica que codifica la parte polipeptídica de un conjugado de la invención o un polipéptido de la invención en terapia génica. En un aspecto, la célula hospedera es una célula de mamífero, tal como una célula CHO, una célula COS, una célula BHK o HEK, por ejemplo HEK293, o una célula de insecto, tal como una célula SF9, o una célula de levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* o cualquier otro hospedero para glicosilación adecuado, por ejemplo como se describe adicionalmente a continuación. Opcionalmente, las porciones de azúcar unidas al polipéptido de interferón-
a mediante glicosilación in vivo se modifican adicionalmente mediante el uso de glicosiltransferasas, por ejemplo utilizando la tecnología de GlycoAdvance™

10

15

20

comercializado por Neose, Horsham, PA, EUA. Así, es posible incrementar, por ejemplo, la sialiación del polipéptido de interferón-alfa glicosilado después de la expresión y glicosilación in vivo por las células CHO.

5 Acoplamiento a un agente derivado orgánico

La modificación covalente del polipéptido de interferón-alfa se puede llevar a cabo mediante la reacción de un grupo(s) de unión al polipéptido con un agente derivado orgánico. Los agentes y métodos para derivación adecuados se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los residuos cisteinilo más comúnmente se hacen reaccionar con α -haloacetatos (y aminos correspondientes), tal como ácido cloroacético o cloroacetamida, para producir derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de cisteinilo también se derivan mediante la reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(4-imidazolil) propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alkilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil 2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol. Los residuos de histidilo se derivan mediante la reacción con dietilpirocarbonato a pH 5.5-7.0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción preferiblemente se lleva a cabo en cacodilato de sodio 0.1 M a pH 6.0. Los residuos de lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con ácido succínico o otros anhídridos del ácido carboxílico. La derivación con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para la derivación de los residuos que contienen α -amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencensulfónico; O-

176

metilisourea; 2,4-pentanediona; y reacción con glioxilato catalizada por transaminasa. Los residuos de arginilo se modifican mediante la reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre éstos fenilglioxal, 2,3-butanediona, 1,2- ciclohexanediona, y ninhidrina. La derivación de los residuos de arginina requiere que la reacción se lleve a

5 cabo en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional de la guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo arginina guanidino. Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo o residuo de aminoácido C-terminal) se modifican selectivamente mediante la reacción con carbodiimidas ($R-N=C=N-R'$), en donde R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como

10 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4- etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten hacia residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones de amonio.

Bloqueo de un sitio funcional

15 Puesto que la conjugación excesiva del polímero puede llevar a una pérdida de la actividad del polipéptido de interferón- α al cual el polímero está conjugado, puede ser ventajoso remover los grupos de unión localizados en el sitio funcional o bloquear el sitio funcional antes de la conjugación. Estas últimas estrategias constituyen aspectos

adicionales de la invención (la primera estrategia se ejemplificó adicionalmente en la

20 parte previa de la descripción, por ejemplo mediante la remoción de residuos de lisina los cuales se pueden localizar cercanamente a un sitio funcional). Más específicamente, de conformidad con la segunda estrategia, la conjugación entre el polipéptido de interferón- α polipéptido y la porción no polipeptídica se lleva a cabo bajo condiciones en donde el

178

177

sitio funcional del polipéptido se bloquea por una molécula auxiliar capaz de unirse al sitio funcional del polipéptido. Preferiblemente, la molécula auxiliar es una la cual específicamente reconoce un sitio funcional del polipéptido, tal como un receptor, en particular el receptor tipo I del interferón. Alternativamente, la molécula auxiliar puede ser un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal que reconoce al polipéptido de interferón-alfa. En particular, la molécula auxiliar puede ser un anticuerpo monoclonal neutralizante.

El polipéptido se deja interactuar con la molécula auxiliar antes de llevar a cabo la conjugación. Esto asegura que el sitio funcional del polipéptido se cubra o proteja y consecuentemente no está disponible para la derivación mediante la porción no polipeptídica tal como un polímero. Después de su elución a partir de la molécula auxiliar, el conjugado entre la porción no polipeptídica y el polipéptido se puede recuperar con al menos un sitio funcional parcialmente conservado.

La conjugación subsecuente del polipéptido que tiene un sitio funcional bloqueado al polímero, un compuesto lipófilo, un agente derivado orgánico o cualquier otro compuesto se lleva a cabo de manera normal, por ejemplo como se describió en las secciones anteriormente tituladas "conjugación a....".

Sin importar la naturaleza de la molécula auxiliar a ser utilizada para proteger el sitio funcional del polipéptido a partir de la conjugación, es deseable que la molécula auxiliar se encuentre libre a partir de o comprenda solamente unos pocos grupos de unión para la porción no polipeptídica de elección en las partes de la molécula en donde la conjugación a dichos grupos podría impedir la separación del polipéptido conjugado a partir de la molécula auxiliar. Así, se puede obtener la conjugación selectiva

179

178

a los grupos de unión presente en partes no protegidas del polipéptido y es posible reutilizar a la molécula auxiliar para ciclos repetidos de conjugación. Por ejemplo, si la porción no polipeptídica es una molécula de polímero tal como PEG, la cual tiene el grupo amino épsilon de una lisina o residuo de aminoácido N-terminal como un grupo de unión, es deseable que la molécula auxiliar se encuentre sustancialmente libre a partir de grupos amino épsilon que se pueden conjugar, preferiblemente libre a partir de cualquier grupo amino épsilon. Por consiguiente, en algunos casos la molécula auxiliar es una proteína o péptido capaz de unirse al sitio funcional del polipéptido, dicha proteína o péptido se encuentre libre de cualquier grupo de unión que se pueden conjugar para la porción no polipeptídica de elección.

En un aspecto adicional la molécula auxiliar se asocia inicialmente de manera covalente a una fase sólida tal como materiales para empaquetamiento en columna, por ejemplo Sephadex o glóbulos de agarosa, o a una superficie, por ejemplo recipiente para reacción. Subsecuentemente, el polipéptido se carga sobre el materia de columna que porta la molécula auxiliar y la conjugación se lleva a cabo de conformidad con los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo: como se describió en las secciones anteriormente tituladas "conjugación a....". Este procedimiento permite que el polipéptido conjugado se separe a partir de la molécula auxiliar mediante elución. El polipéptido conjugado se eluye mediante técnicas convencionales bajo condiciones fisicoquímicas que no llevan a una degradación sustancial del polipéptido conjugado. La fase fluida que contiene el polipéptido conjugado se separa a partir de la fase sólida a la cual la molécula auxiliar permanece covalentemente unida. La separación se puede lograr que otras maneras: por ejemplo, la molécula auxiliar se puede derivar con una

180

129

segunda molécula (por ejemplo biotina) que se puede reconocer por un enlazador específico (por ejemplo estreptavidina). El enlazador específico se puede asociar a una fase sólida por lo tanto permitiendo la separación del polipéptido conjugado a partir del complejo de molécula auxiliar-segunda molécula a través del paso sobre una segunda columna de fase sólida la cual retendrá, después de la elución subsecuente, al complejo de molécula auxiliar-segunda molécula, pero no al polipéptido conjugado. El polipéptido conjugado se puede liberar a partir de la molécula auxiliar en cualquier manera apropiada. La desprotección se puede lograr al proveer condiciones en las cuales la molécula auxiliar se disocia del sitio funcional del interferón- α al cual está unida. Por ejemplo, un complejo entre un anticuerpo al cual un polímero está conjugado y un anticuerpo anti-idiotípico se puede disociar mediante el ajuste del pH hacia un pH ácido o alcalino.

Conjugación de un polipéptido marcado de interferón- α

En otro aspecto el polipéptido de interferón- α polipéptido se expresa como una proteína difusión con una marca, por ejemplo una secuencia de aminoácidos o péptido elaborado a partir de típicamente 1-30, tal como 1-20 o 1-15 o 1-10 o 1-5 residuos de aminoácidos, por ejemplo añadidos al extremo N terminal o al extremo C terminal del polipéptido. Además de permitir la purificación rápida y fácil, la marca es una herramienta conveniente para lograr la conjugación entre el polipéptido marcado y la porción no polipeptídica. En particular, la marca se puede utilizar para lograr la conjugación en placas para microtitulación u otros vehículos, tales como glóbulos paramagnéticos, a los cuales el polipéptido marcado se puede inmovilizar vía la marca. La conjugación el

181

polipéptido marcado en, por ejemplo, placas para microtitulación tiene la ventaja de que el polipéptido marcado se puede inmovilizar en las placas para microtitulación directamente a partir del caldo de cultivo (en principio sin ninguna purificación) y se puede someter a conjugación. Así, se puede reducir el número total de pasos en el procedimiento (desde la expresión hasta la conjugación). Además, la marca puede funcionar como una molécula espaciadora asegurando una accesibilidad mejorada al polipéptido inmovilizado a ser conjugado. La conjugación utilizando un polipéptido marcado se puede realizar a cualesquiera de las porciones no polipeptídicas descritas en la presente invención, por ejemplo a una molécula polimérica tal como PEG.

La identidad de la marca específica a ser utilizada no es crítica siempre y cuando la marca sea capaz de ser expresada con el polipéptido y sea capaz de ser inmovilizada en una superficie adecuada o material vehículo. Numerosas marcas adecuadas se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo a partir de Unizyme Laboratories, Dinamarca. Los anticuerpos en contra de dichas marcas están comercialmente disponibles, por ejemplo a partir de ADI, Aves Lab y Research Diagnostics.

Polinucleótidos de la invención

La invención provee ácidos nucleicos aislados o recombinantes (también referidos en la presente invención como polinucleótidos), colectivamente referidos como "ácidos nucleicos (o polinucleótidos) de la invención", los cuales codifican los polipéptidos de la invención. Los polinucleótidos de la invención son útiles en una variedad de aplicaciones. Como se discutió anteriormente, los polinucleótidos son útiles en la

producción de los polipéptidos de la invención. Además, los polinucleótidos de la invención se pueden incorporar dentro de vectores de expresión útiles para terapia génica, vacunación de ADN, e inmunoterapia, como se describe con mayor detalle a continuación.

5 En un aspecto, la invención provee polinucleótidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia de ácido nucleico la cual codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de SEQ ID NOs: 2-35 y 37-44; o, una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la misma. Las secuencias de ácidos nucleicos ejemplares de conformidad con este aspecto de la invención incluyen, pero no se limitan a, SEQ ID NOs: 59-61, cada una de las cuales codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 10; SEQ ID NOs: 62-64 y 89, cada una de las cuales codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13; SEQ ID NOs: 65-67, cada una de las cuales codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 15; SEQ ID NOs: 68-70, cada una de las cuales codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 23; SEQ ID NOs: 71-73, cada una de las cuales codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 27; SEQ ID NOs: 74-76, cada una de las cuales codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 30; SEQ ID NOs: 77-79, cada una de las cuales codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 37; SEQ ID NOs: 80-82 y 90, cada una de las cuales codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38; SEQ ID NOs: 83-85, cada una de las cuales codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 41; y SEQ ID NOs: 86-

182

88, cada una de las cuales codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 44.

La invención también provee polinucleótidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos (tal como en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos) a partir de SEQ ID NO: y (b) comprende una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: seleccionadas a partir del grupo que consiste de F48A/L, V51P, F55A, F65A, F68P, L111A, y V114P; o, una secuencia de ácido nucleico complementaria a la misma. Algunos polipéptidos codificados por polinucleótidos de la invención comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. En algunos casos el polipéptido codificado exhibe una actividad de interferón-alfa.

La invención también provee polinucleótidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos (tal como en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 posiciones

184

183

de aminoácidos, por ejemplo, en 1-15 posiciones de aminoácidos, en 1-14 posiciones de aminoácidos, en 1-13 posiciones de aminoácidos, en 1-12 posiciones de aminoácidos, en 1-11 posiciones de aminoácidos, en 1-10 posiciones de aminoácidos, en 1-9 posiciones de aminoácidos, en 1-8 posiciones de aminoácidos, en 1-7 posiciones de aminoácidos, en 1-6 posiciones de aminoácidos, en 1-5 posiciones de aminoácidos, en 1-4 posiciones de aminoácidos, en 1-3 posiciones de aminoácidos, o en 1-2 posiciones de aminoácidos) a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende una o más sustituciones relativas a SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A, I24P, F48A/L, T51P, S55A, F65A, F68P, F90A, M93P, L111A, V114P, F124A, I127P, y E160D; o, una secuencia de ácido nucleico complementaria a la misma. Algunos polipéptidos codificados por los polinucleótidos de la invención comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, tal como una metionina añadida al extremo N terminal. En algunos casos el polipéptido codificado exhibe una actividad de interferón-alfa.

La invención también provee polinucleótidos aislados o recombinantes cada uno de los cuales comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos) a cualquiera de SEQ ID NOs: 1-35, en donde la secuencia de aminoácidos comprende una o más de: Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición

185

111; y Pro en la posición 114, numeración de la posición en relación con SEQ ID NO: 1; o, una secuencia de ácido nucleico complementaria a la misma. Algunos polipéptidos codificados por los polinucleótidos de la invención comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, como una metionina añadida al extremo N terminal. En algunos

5 casos el polipéptido codificado exhibe una actividad de interferón-alfa.

La invención también provee aislados o recombinantes polinucleótidos cada uno de los cuales comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos aproximadamente 91%, al menos

10 aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos) a cualquiera de SEQ ID NOs: 36-44, en donde la secuencia de aminoácidos comprende una o más de: Ala en la posición 21; Pro

15 en la posición 24; Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 90; Pro en la posición 93; Ala en la posición 111; Pro en la posición 114; Ala en la posición 124; Pro en la posición 127; y Asp en la posición 160, numeración de la posición en relación con SEQ ID NO: 36; o, una secuencia de ácido nucleico complementaria a la misma. Algunos

20 polipéptidos codificados por los polinucleótidos de la invención comprenden adicionalmente uno o más aminoácidos adicionales, tal como una metionina añadida al extremo N terminal. En algunos casos el polipéptido codificado exhibe una actividad de interferón-alfa.

185

Aspectos adicionales

Cualquiera de los polinucleótidos de la invención (los cuales incluyen aquellos anteriormente descritos) pueden codificar una proteína de fusión que comprende al menos una secuencia adicional de aminoácidos, tal como, por ejemplo, una secuencia para secreción/localización, una secuencia útil para solubilización o inmovilización (por ejemplo, para exhibición en superficie celular) del polipéptido, una secuencia útil para detección y/o purificación del polipéptido (por ejemplo, una subsecuencia para purificación del polipéptido, tal como un epítope marca, una secuencia de polihistidina, y o los similares). En otro aspecto, la invención provee células que comprenden uno o más polinucleótidos de la invención. Dichas células pueden expresar uno o más polipéptidos codificados por los polinucleótidos de la invención.

La invención también provee vectores que comprenden cualesquiera de los polinucleótidos de la invención. Dichos vectores pueden comprender un plásmido, un cósmido, un fago, a virus, o un fragmento de un virus. Dichos vectores pueden comprender un vector de expresión, y, si se desea, el ácido nucleico está operativamente asociado a un promotor, incluyendo aquellos discutidos en la presente invención y a continuación. Además, en otro aspecto, la invención provee composiciones que comprenden un excipiente o vehículo y al menos uno de cualesquiera de los polinucleótidos de la invención, o vectores, células, u hospedero que comprende dichos ácidos nucleicos. Dichas composiciones pueden ser composiciones farmacéuticas, y el excipiente o vehículo puede ser un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

187

196

La invención también incluye composiciones que comprenden dos o más ácidos nucleicos de la invención, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, como sustratos para recombinación). La composición puede comprender una librería de ácidos nucleicos recombinantes, en donde la librería contiene al menos 2, al menos 3, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 50, o al menos 100 o más ácidos nucleicos anteriormente descritos. Los ácidos nucleicos se clonan opcionalmente dentro de vectores de expresión, proveyendo librerías de expresión.

Los polinucleótidos de la invención y fragmentos de los mismos, así como vectores que comprenden dichos polinucleótidos, se pueden emplear para usos terapéuticos o profilácticos en combinación con vehículo adecuado, tal como un vehículo farmacéutico. Dichas composiciones comprenden una cantidad del compuesto terapéuticamente y/o profilácticamente efectiva, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo o excipiente incluye, pero no se limita a, solución salina, solución salina con pH regulado, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos. La formulación se debe ajustar el modo de administración. Los métodos para la administración de ácidos nucleicos, polipéptidos, y proteínas se conocen bien en la técnica, y se discuten adicionalmente a continuación.

La invención también incluye composiciones producidas mediante la digestión de uno o más de cualesquiera de los ácidos nucleicos de la invención con una endonucleasa de restricción, una RNAsa, o una ADNsa (por ejemplo, como se lleva a cabo en ciertos formatos de recombinación anteriormente mencionados); y composiciones producidas por la fragmentación o rompimiento de uno o más ácidos nucleicos de la invención mediante medios mecánicos (por ejemplo, sonicación,

188

aplicación en vórtex, y o los similares), los cuales también se pueden utilizar para proveer sustratos para la recombinación en los métodos descritos en la presente invención. La invención también provee composiciones producidas por la escisión de al menos uno de cualesquiera de los ácidos nucleicos de la invención. La escisión puede comprender la

5 escisión mecánica, química, o enzimática, y la escisión enzimática puede comprender la escisión con una endonucleasa de restricción, una RNAsa, o una ADNsa.

También se incluyen en la invención las composiciones producidas mediante un procedimiento que comprende la incubación de uno o más de los ácidos nucleicos fragmentados de la invención en la presencia de trifosfatos de ribonucleótido o

10 deoxirribonucleótido y una polimerasa de ácido nucleico. Esta composición resultante forma una mezcla para recombinación para muchos de los formatos de recombinación anteriormente mencionados. La polimerasa de ácido nucleico puede ser una ARN polimerasa, una ADN polimerasa, o una ADN polimerasa dirigida por ARN (por ejemplo, una "reverso transcriptasa"); la polimerasa puede ser, por ejemplo, una ADN polimerasa

15 termoestable (por ejemplo, VENT, TAQ, o los similares).

Similarmente, las composiciones que comprenden series de oligonucleótidos que corresponden a más de un ácido nucleico de la invención son útiles como sustratos para recombinación y son una característica de la invención. Por

conveniencia, estos oligonucleótidos fragmentados, rotos, o mezclas de oligonucleótido

20 sintetizados se refieren como series de ácidos nucleicos fragmentados.

La invención también provee un ácido nucleico aislado o recombinante que codifican un polipéptido que exhibe una actividad de interferón-alfa, producido mediante la mutación o recombinación de al menos un ácido nucleico de la invención.

Elaboración de polinucleótidos

Los polinucleótidos, oligonucleótidos, y fragmentos de ácido nucleico de la invención se pueden preparar mediante métodos estándares en fase sólida, de conformidad con los métodos sintéticos conocidos. Típicamente, los fragmentos de hasta aproximadamente 100 bases se sintetizan individualmente, luego se unen (por ejemplo, mediante métodos de ligación enzimática o química, o métodos de recombinación mediados por polimerasa) para formar esencialmente cualquier secuencia continua deseada. Por ejemplo, los polinucleótidos y oligonucleótidos de la invención se pueden preparar mediante síntesis química utilizando, por ejemplo, el método clásico de fosforamidita descrito por, por ejemplo, Beaucage et al. (1981) Tetrahedron Letters 22: 1859-69, o el método descrito por Matthes et al. (1984) EMBO J 3: 801-05, por ejemplo, como se practica típicamente en los métodos de síntesis automatizada. De conformidad con el método de fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automatizado de ADN, se purifican, fijan, ligan y clonan dentro de los vectores apropiados.

Además, se puede ordenar de manera habitual esencialmente cualquier polinucleótido a partir de cualquier variedad de fuentes comerciales, tal como Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) y muchas otras. Similarmente, los péptidos y anticuerpos se pueden ordenar de manera habitual a partir de cualquiera de una variedad de fuentes, por ejemplo, Celtek Peptides (Nashville, TN); Washington Biotechnology, Inc. (Baltimore MD); Global Peptide Services (Ft. Collin CO), y muchos otros.

189

Ciertos polinucleótidos de la invención también se pueden obtener mediante el análisis de las librerías de ADNc (por ejemplo, librerías generadas mediante ácidos nucleicos homólogos recombinantes como en métodos típicos de recombinación de secuencia recursiva) utilizando sondas de oligonucleótidos se pueden hibridar con o

5 polinucleótidos amplificados mediante PCR los cuales codifican polipéptidos de interferón-alfa y fragmentos de esos polipéptidos. Los procedimientos para el análisis y aislamiento de las clonas de ADNc se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. Dichas técnicas se describen en, por ejemplo, Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymol. Vol. 152, Acad. Press, Inc., San Diego, CA

10 ("Berger"); Sambrook, anteriormente mencionado, y Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, anteriormente mencionado. Algunos polinucleótidos de la invención se pueden obtener mediante la creación de una secuencia que se presenta de manera natural, por ejemplo, mediante mutagénesis, recombinación de secuencia recursiva (por ejemplo, recambio), o recombinación de oligonucleótido. En otros casos, dichos

15 polinucleótidos se pueden realizar en silico o a través de métodos de recombinación de oligonucleótido como se describió en las referencias anteriormente citadas.

Como se describe con mayor detalle en la presente invención, los polinucleótidos de la invención incluyen polinucleótidos de codifican polipéptidos de la invención, secuencias polipeptídicas complementarias a estas secuencias polipeptídicas,

20 y polinucleótidos de hibridan bajo al menos condiciones severas con las secuencias definidas en la presente invención. Una secuencia codificante se refiere a una secuencia polipeptídica que codifica un polipéptido particular o dominio, región, o fragmentos de dicho polipéptido. Una secuencia codificante puede codificar (codifica para) un polipéptido

191

de la invención que exhibe una actividad de interferón alfa como se describió anteriormente. Los polinucleótidos de la invención pueden estar en la forma de ARN o en la forma de ADN, e incluyen ARNm, ARNc, ARN y ADN sintéticos, y ADNc. Los polinucleótidos pueden estar en cadena doble o en cadena sencilla, y si están en cadena sencilla, pueden ser la cadena codificante o la cadena no codificante (anti-sentido, complementaria). Los polinucleótidos de la invención incluyen la secuencia codificante de un polipéptido de la invención (i) en aislamiento, (ii) en combinación con una o más secuencias codificantes adicionales, de manera que codifiquen, por ejemplo, una proteína de fusión, una pre-proteína, una prepro-proteína, o los similares, (iii) en combinación con secuencias no codificantes, tales como intrones, elementos control, tal como un promotor (por ejemplo, un promotor que se presenta de manera natural o recombinante o con recambio), un elemento terminador, o regiones no traducidas hacia 5' y/o 3' efectivas para la expresión de la secuencia codificante en un hospedero adecuado, y/o (iv) en un vector, célula, o ambiente del hospedero en el cual la secuencia codificante es un gen heterólogo.

Los polinucleótidos de la invención también se pueden encontrar en combinación con formulaciones de composición típicas de ácidos nucleicos, incluyendo en la presencia de vehículos, reguladores de pH, adyuvantes, excipientes, y o los similares, o como se conocen por aquellos expertos en la técnica. Los fragmentos de polinucleótido típicamente comprenden al menos aproximadamente 200 bases nucleotídicas, tal como al menos aproximadamente 250, 300, 350, 400, 450, 460, 470, o más bases. Los fragmentos nucleotídicos de los polinucleótidos de la invención se pueden hibridar bajo condiciones altamente severas a una secuencia polipeptídica descrita en la

1a1

presente invención y/o que codifica secuencias de aminoácidos que tienen al menos una de las propiedades de los polipéptidos de la invención descritas en la presente invención.

Secuencias codificantes modificadas

5 Como se entenderá por aquellos expertos en la técnica, puede ser ventajoso modificar una secuencia codificante para mejorar su expresión en un hospedero particular. El código genético es redundante con 64 codones posibles, pero la mayoría de los organismos preferiblemente utilizan una subpoblación de estos codones. Los codones que se utilizan más frecuentemente en una especie se consideran codones
10 óptimos, y aquellos que no se utilizan muy frecuentemente se clasifican como codones raros por de bajo uso (véase, por ejemplo, Zhang, S. P. et al. (1991) Gene 105: 61-72). Los codones se pueden sustituir para reflejar el uso preferido del codón del hospedero, un procedimiento algunas veces denominado "optimización del codón" o "control para las tendencia de codón en las especies codon."

15 Se puede preparar la secuencia codificante modificada que contiene codones preferidos por un hospedero procarionte o eucarionte particular (véase, por ejemplo, Murray, E. et al. (1989) Nuc Acids Res 17: 477-508; Griswold et al., (2003) Protein Expr. Purif. 27(1): 134-42), por ejemplo, para incrementar la velocidad de traducción o para producir los transcritos de ARN recombinante que tienen propiedades
20 deseables, tal como una vida media más larga, en comparación con los transcritos producidos a partir de una secuencia no optimizada. Los codones para paro de la traducción también se pueden modificar para reflejar las preferencias del hospedero. Por ejemplo, los codones de paro preferidos para *S. cerevisiae* y para mamíferos son UAA y

113

1a2

UGA respectivamente. El codón de paro preferido para plantas monocotiledóneas es UGA, mientras que los insectos y E. coli prefieren utilizar UAA como el codón de paro (Dalphin, M. E. et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24: 216-218).

Las secuencias polipeptídicas de la presente invención se pueden diseñar con el objeto de alterar una secuencia codificante de la invención por una variedad de razones, incluyendo pero no limitadas a, alteraciones las cuales modifican la clonación, procesamiento y/o expresión del producto del gen. Por ejemplo, se pueden introducir alteraciones utilizando técnicas las cuales se conocen bien en la técnica, por ejemplo, mutagénesis sitio dirigida, para insertar nuevos sitio de restricción, para alterar los patrones de glicosilación, para introducir o grupos de unión (por ejemplo, para pegilación u otra conjugación), para cambiar la preferencia del codón, para introducir sitios de procesamiento, etc.

Variaciones silenciosas

Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, la inspección del cuadro de codones a continuación (cuadro 5) muestra que todos los codones AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, y CGU codifican aminoácidos de glicina. Por lo tanto, en cada posición en una secuencia de ácidos nucleicos en donde una arginina se especifica por un codón, el codón se puede alterar a cualesquiera de los codones correspondientes anteriormente descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas". Se debe entender que U en una secuencia de ARN corresponde a T en una secuencia de ADN.

194

193

CUADRO 5

Cuadro de codón

Aminoácido	Codon(es)
Alanina Ala A	GCA GCC GCG GCU
cisteína Cys C	UGC UGU
ácido aspártico Asp D	GAC GAU
ácido glutámico Glu E	GAA GAG
fenilalanina Phe F	UUC UUU
Glicina Gly G	GGA GGC GGG GGU
histidina His H	CAC CAU
Isoleucina Ile I	AUA AUC AUU
lisina Lys K	AAA AAG
Leucina Leu L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina Met M	AUG
Asparagina Asn N	AAC AAU
Prolina Pro P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina Gln Q	CAA CAG
Arginina Arg R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina Ser S	AGC AGU UCA UCC UCU
Treonina Thr T	ACA ACC ACG ACU
Valina Val V	GUA GUC GUG GUU
Triptofano Trp W	UGG
Tirosina Tyr Y	UAC UAU

Por lo tanto se apreciará por aquellos expertos en la técnica que debido a la degeneración del código genético, se puede producir una multitud de secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención, algunas de las cuales pueden contener una mínima identidad de secuencia con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos explícitamente descritas en la presente invención. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG y UGC, los cuales son ordinariamente el único codón para metionina y triptofano, respectivamente) se puede modificar mediante técnicas estándares para codificar un polipéptido funcionalmente

195

idéntico. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico la cual codifica un polipéptido está implícita en cualquier secuencia descrita. La invención también provee todas y cada una de las posibles variaciones de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la invención que se pueden elaborar mediante la selección de combinaciones basadas en las posibles elecciones del codón. Estas combinaciones se elaboran de conformidad con el código genético por triplete estándar (codón) (por ejemplo, como se establece en el cuadro 5), como se aplica para la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la invención. Todas las variaciones de cada ácido nucleico en la presente invención se proveen específicamente y se describen por consideración de la secuencia en combinación con el código genético. Un experto en la técnica es completamente capaz de generar cualquier sustitución silenciosa de las secuencias listadas en la presente invención.

Uso de los polinucleótidos

Los polinucleótidos de la invención tienen una variedad de usos en, por ejemplo, la producción recombinante (por ejemplo, expresión) de los polipéptidos de la invención típicamente a través del expresión de un vector plasmídico de expresión que comprende una secuencia que codifica el polipéptido o un fragmento del mismo; como terapéuticos; como profilácticos; como herramientas diagnósticas; como inmunógenos; como adyuvantes; como sondas diagnósticas para la presencia de ácidos nucleicos complementarios o parcialmente complementarios (incluyendo para la detección de un ácido nucleico de interferón- α de tipo silvestre), como sustratos para reacciones adicionales, por ejemplo, reacciones de recombinación de secuencia recursiva o

reacciones de mutación para producir nuevas variantes y/o variantes mejoradas, y o los similares.

Vectores, promotores, y sistemas de expresión

5 La presente invención también incluye construcciones recombinantes que comprenden uno o más de las secuencias de ácidos nucleicos como se describió anteriormente de manera general. Las construcciones comprenden un vector, tal como, un plásmido, un cósmido, un fago, un virus, un cromosoma bacteriano artificial (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), y o los similares, dentro de los cuales se ha
10 insertado una secuencia de ácido nucleico de la invención, en una orientación hacia adelante o reversa. En algunos casos, la construcción comprende secuencia reguladoras adicionales, incluyendo, por ejemplo, un promotor, una secuencia de ácido nucleico operativamente asociada. Se conoce una gran cantidad de vectores y promotores adecuados por aquellos expertos en la técnica, y están comercialmente disponibles.

15 Los textos generales que describen las técnicas de biología molecular útiles en la presente invención, incluyendo el uso de vectores, promotores y muchos otros tópicos relevantes, incluyen Berger, anteriormente mencionado; Sambrook (1989), anteriormente mencionado, y Ausubel, anteriormente mencionado. Los ejemplo de técnicas adecuadas para dirigir a las personas expertas en la técnica a través métodos de
20 amplificación in vitro, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación por Qp-replicasa y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA), por ejemplo, para la producción de ácidos nucleicos homólogos de la invención se encuentran en Berger, Sambrook, y

lab

Ausubel, todos anteriormente mencionados, así como Mullis et al. (1987) la Patente de Estados Unidos No. 4,683,202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds.) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) ("Innis"); Amheim & Levinson (octubre 1, 1990) C&EN 36-47; The Journal of NIH Research (1991) 3: 81-94; 5 (Kwoh et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86: 1173- 1177; Guatelli et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87: 1874-1878; Lomeli et al. (1989) J Clin Chem 35: 1826-1831; Landegren et al. (1988) Science 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8: 291-294; Wu y Wallace (1989) Gene 4: 560-569; Barringer et al. (1990) Gene 89: 117-122, y Sooknanan y Malek (1995) Biotechnology 13: 563- 564. Los métodos mejorados para 10 clonación in vitro de ácidos nucleicos amplificados se describen en Wallace et al., Patente de Estados Unidos No. 5,426,039. Los métodos mejorados para la amplificación de ácidos nucleicos grandes mediante PCR se resumen en Cheng et al. (1994) Nature 369: 684-685 y las preferencias en estos, se generaron en dichos amplicones de PCR de hasta 40 kilobases (kb). Un experto apreciará que esencialmente cualquier ARN se puede 15 convertir hacia un ADN de cadena doble adecuado para digestión por restricción, expansión por PCR y secuenciación utilizando reverso transcriptasa y una polimerasa. Véase Ausubel, Sambrook y Berger, todos anteriormente mencionados.

La presente invención también provee células hospederas que se transducen con vectores de la invención, y la producción de polipéptidos de la invención 20 mediante técnicas recombinantes. Las células hospederas generalmente se diseñan (por ejemplo, transduced, transforman o transfectan) con los vectores de esta invención, los cuales pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en la forma de un plásmido, una partícula viral, un fago,

148

198

etc. Las células hospederas diseñadas se pueden cultivar en medio nutriente convencional como sea apropiado para activar los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y o los similares, son aquellas previamente utilizadas con la célula

5 hospedera seleccionada para expresión, y será evidente a aquellos expertos en la técnica y en las referencias citadas en la presente invención, incluyendo, por ejemplo, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, tercera edición, Wiley-Liss, New York y las referencias citadas en éste.

Los polipéptidos de la invención también se pueden producir en células no

10 de mamífero tales como plantas, levaduras, hongos, bacterias y los similares. Además de Sambrook, Berger y Ausubel, los detalles con respecto al cultivo celular se encuentran en, por ejemplo, Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg y Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin

15 Heidelberg NY); Atlas & Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Los polinucleótidos de la presente invención y fragmentos de los mismos se pueden incluir en cualquiera de una variedad de vectores de expresión para la expresión de un polipéptido. Dichos vectores incluyen secuencias de ADN cromosomal, no

20 cromosomal y sintético, por ejemplo, derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN del fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados a partir de combinaciones de plásmidos y ADN del fago, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, virus de viruela, pseudorabia, virus adeno-asociado, retrovirus y muchos otros. Se puede utilizar cualquier

199

vector que transduce el material genético dentro de una célula, y, si se desea la replicación, el cual es replicable y viable en el hospedero relevante.

La secuencia de ácido nucleico en el vector de expresión está operativamente asociada a una secuencia para el control de la transcripción apropiada (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Los ejemplos de dichos promotores incluyen: el promotor LTR o SV40, el promotor lac o trp de *E. coli*, el promotor PL del fago lambda, el promotor de CMV, y otros promotores que se sabe que controlan la expresión de los genes en células procariontes o eucariontes o sus virus. El vector de expresión también contiene un sitio de unión ribosoma para el inicio de la traducción, y un denominador de la transcripción. El vector incluye opcionalmente secuencias apropiadas para la amplificación de la expresión, por ejemplo, un potenciador. Además, los vectores de expresión opcionalmente comprenden uno o más genes marcadores para selección para proveer un rasgo fenotípico para la selección de células hospederas transformadas, tales como dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para el cultivo de células eucariontes, o tales como resistencia a tetraciclina o a ampicilina en *E. coli*.

El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada que codifica un polipéptido de la invención, así como un promotor o secuencia control apropiada, se puede emplear para transformar un hospedero apropiado para permitir al hospedero que exprese el polipéptido. Los ejemplos de hospedero de expresión apropiados incluyen: células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces*, y *Salmonella typhimurium*; células fungales, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Neurospora crassa*; células de insecto tales como *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*; células de mamífero tales como CHO, COS, BHK, HEK 293 o melanoma de Bowes;

células vegetales, etc. Se entiende que no todas las células o líneas celulares se necesitan para ser capaces de producir polipéptidos completamente funcionales de la invención o fragmentos de los mismos; por ejemplo, los fragmentos antigénicos del polipéptido se pueden producir en un sistema bacteriano o en otro sistema de expresión.

5 La invención no se limita por las células hospederas empleadas.

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar numerosos vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido o fragmentos del mismo. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades de un polipéptido o fragmentos del mismo para la inducción de anticuerpos, pueden ser deseables los vectores que dirigen el alto nivel de expresión de las proteínas de fusión que son fácilmente purificadas. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores para clonación y expresión multifuncional de *E. coli* tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en los cuales la secuencia codificante nucleotídica puede estar ligada dentro del vector en-marco con secuencias para el amino-terminal Met y los 7 residuos subsecuentes de beta-galactosidasa de manera que se produce una proteína híbrida; los vectores pIN (Van Heeke & Schuster (1989) J Biol Chem 264: 5503-5509); vectores pET (Novagen, Madison WI); y los similares.

Similamente, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* numerosos vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH se pueden utilizar para la producción de los polipéptidos de la invención. Para revisiones, véase Ausubel, anteriormente mencionado, Berger, anteriormente mencionado, y Grant et al. (1987) Methods in Enzymology 153: 516-544.

En las células hospederas de mamífero, se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión, tales como sistemas basados en virus. En los casos en donde se

200

utiliza un adenovirus como un vector de expresión, una secuencia codificante se liga de manera opcional dentro de un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste del promotor tardío y de la secuencia líder tripartita. La inserción en una región no esencial E1 o E3 del genoma viral resulta en virus viable capaz de expresar un polipéptido de la invención en células hospederas infectadas (Logan y Sheik (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81: 3655-3659). Además, los potenciadores de la transcripción, tal como potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), se utilizan para incrementar la expresión en células hospederas de mamífero. Las células hospederas, medios, sistemas de expresión, y métodos de producción incluyen aquellos conocidos para la clonación y expresión de diversos interferones-alfa de mamífero (por ejemplo, interferones-alfa de humano).

Elementos adicionales de expresión

Las señales específicas de inicio pueden ayudar en la traducción eficiente de una secuencia codificante del polinucleótido de la invención y/o fragmentos del mismo. Estas señales pueden incluir, por ejemplo, el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. En los casos en donde se inserta una secuencia codificante, su codón de inicio y secuencias cascada arriba dentro del vector de expresión apropiado, no se necesitan señales para el control de la traducción adicionales. Sin embargo, en los casos en donde solamente se inserta una secuencia codificante (por ejemplo, una secuencia codificante de la proteína madura), o una porción de la misma, se deben proveer señales exógenas para el control transcripcional del ácido nucleico incluyendo el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debe estar en el marco de lectura correcto para

200

asegurar la transcripción de todo el inserto. Los elementos transcripcionales exógenos y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión se puede mejorar por la inclusión de potenciadores apropiados al sistema celular en uso (véase, por ejemplo, Scharf D. et al. (1994) Results Probl Cell Differ 20: 125-62; y Bittner et al. (1987) Methods in Enzymol 153: 516-544).

Secuencia de secreción/localización

Los polinucleótidos que codifican polipéptidos de la invención también se pueden fusionar, por ejemplo, en-marco al ácido nucleico que codifica una secuencia para secreción/localización, para dirigir la expresión del polipéptido hacia un compartimento celular deseado, membrana, o organelo, o para dirigir la secreción del polipéptido hacia el espacio periplásmico o dentro del medio de cultivo de la célula. Dichas secuencias se conocen por aquellos expertos en la técnica, e incluyen líderes de secreción o péptidos señal, secuencias para direccionamiento hacia organelos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de retención en ER, secuencias de tránsito a la mitocondria, secuencias de tránsito al cloroplasto), secuencias de localización/ancraje a la membrana (por ejemplo, secuencias para el paro de la transferencia, secuencias de anclaje GPI), y los similares.

20

Hospederos de expresión

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a las células hospederas que contienen cualesquiera de los ácidos nucleicos anteriormente

202

mencionados, vectores, u otras construcciones de la invención. La célula hospedera puede ser una célula eucarionte, tal como una célula de mamífero, una célula de levadura, o una célula vegetal, o la célula hospedera puede ser una célula procarionte, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción dentro de la célula

5 hospedera se puede llevar a cabo mediante la transfección con fosfato de calcio, transfección mediante DEAE-Dextran, electroporación, pistola de genes o pistola para vacunas, inyección, u otras técnicas comunes (véase, por ejemplo, Davis, L., Dibner, M., y Battey, I. (1986) Basic Methods in Molecular Biology) para los métodos in vivo, ex vivo o in vitro.

10 Una cepa de célula hospedera opcionalmente se elige por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Dichas modificaciones de la proteína incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento post-traducciona el cual escinde una forma "pre" o una forma "prepro" de

15 la proteína también puede ser importante para la inserción adecuada, plegamiento y/o función. Diferentes células hospederas tales como células de E. coli, Bacillus sp., células de levadura o células de mamífero tales como CHO, HeLa, BHK, MDCK, HEK 293, WI38, etc. tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades post-traduccionales y se pueden elegir para asegurar la correcta modificación

20 y procesamiento de la proteína de la proteína externa introducida.

La expresión estable se puede utilizar para producción de proteínas recombinantes a largo plazo, o para producción de alto rendimiento de proteínas recombinantes. Por ejemplo, las líneas celulares las cuales expresan de manera estable

204

un polipéptido de la invención se transducen utilizando vectores de expresión los cuales contienen orígenes de replicación o elementos para expresión endógena y un gen marcador de selección. Después de la introducción del vector, las células se pueden dejar crecer por 1-2 días en un medio enriquecido antes de que sean cambiados hacia el medio para selección. El propósito del marcador de selección es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células las cuales expresan de manera exitosa las secuencias introducidas. Por ejemplo, el agrupamiento de células establemente transformadas resistentes se puede hacer proliferar utilizando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas al tipo celular.

10 Las células hospederas transformadas con una secuencia nucleotídica que codifican un polipéptido de la invención se cultivan opcionalmente bajo condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada a partir del cultivo de tejido. El polipéptido producido mediante una célula recombinante se puede secretar, unir a la membrana, o contener intracelularmente, dependiendo de la secuencia y/o del vector utilizado. Como se entenderá por aquellos expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen los polinucleótidos que codifican polipéptidos de la invención se pueden diseñar con secuencias señal las cuales dirigen la secreción de los polipéptidos maduros a través de una membrana de célula procarionte o eucarionte.

20 Secuencias adicionales

Los polinucleótidos de la presente invención opcionalmente comprenden una secuencia codificante fusionada en marco a una secuencia marcadora la cual, por ejemplo, facilita la purificación y/o detección del polipéptido codificado. Dichas

204

subsecuencias para purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metal tales como módulos de histidina-triptofano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, una secuencia la cual se une a la glutatona (por ejemplo, GST), una marca de hemaglutinina (HA) (que corresponde a un epítope derivado a partir de la proteína de hemaglutinina de la influenza; Wilson, I. et al. (1984) Cell 37: 767), secuencias de la proteína de unión a maltosa, el epítope FLAG utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad de FLAGS, y los similares. La inclusión de una secuencia para asociación de las proteasa-polipéptido escindido entre el dominio para purificación y la secuencia polipeptídica es útil para facilitar la purificación.

10 Por ejemplo, un vector de expresión adecuado para uso en las composiciones y métodos descritos en la presente invención se provee para la expresión de una proteína de fusión que comprende un polipéptido de la invención fusionado a una región de polihistidina separado por un sitio de escisión a enteroquinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación sobre IMIAC (cromatografía por afinidad de iones en metal inmovilizado, como se describe en Porath et al. (1992) Protein Expression and Purification 3: 263-281) aunque el sitio de escisión de la enteroquinasa provee un método para la separación del polipéptido deseado a partir de la región de polihistidina. Los vectores pGEX (Promega; Madison, WI) se utilizan opcionalmente para expresar polipéptidos externos como proteínas de fusión con glutatona S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante absorción a los glóbulos de ligando-agarosa (por ejemplo, glutatona-agarosa en el caso de fusiones GST) seguido por elución en la presencia del ligando libre.

206

205

Una construcción adicional en las composiciones y métodos descritos en la presente invención se provee para las proteínas, y sus ácidos nucleicos codificantes, que comprenden polipéptidos de la invención (o uno o más fragmentos de los mismos), por ejemplo, como se describe en la presente invención, fusionados a una molécula de Ig, por ejemplo, **chamela de IgG Fc de humano ("fragmento cristalizabile", o unión al complemento del fragmento), dominio CH2 y dominio CH3 (y las secuencias nucleotídicas que los codifican). Fc es la porción del anticuerpo responsable para la unión a los receptores de anticuerpo en las células y el componente C1q del complemento. Estas proteínas de fusión o fragmentos de las mismas y sus ácidos nucleicos codificantes son**

5 **opcionalmente útiles como fármacos profilácticos y/o terapéuticos o como herramientas diagnósticas (véase también, por ejemplo, Challita-Eid, P. et al. (1998) J Immunol 160: 3419-3426; Sturmhoefel, K. et al. (1999) Cancer Res 59: 4964-4972).**

Producción y recuperación de polipéptido

15 Después de la transducción de una cepa hospedera adecuada y del crecimiento de la cepa hospedera hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se induce mediante medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan por un periodo adicional. Típicamente las células se cosechan mediante centrifugación, se fragmentan mediante

20 medios físicos o químicos, y el extracto sin purificar resultante se retiene para una purificación adicional. Las células eucariontes o microbianas empleadas en la expresión de las proteínas se pueden fragmentar mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelamiento-descongelamiento, sonicación, fragmentación

207

mecánica, o uso de agentes para lisado celular, u otros métodos, los cuales se conocen bien por aquellos expertos en la técnica.

Como se mencionó, están disponibles muchas referencias para el cultivo y producción de muchas células, incluyendo células de origen bacteriano, de origen vegetal, animal (especialmente de mamífero) y de origen de arqueobacterias. Véase, por ejemplo, Sambrook, Ausubel, y Berger (todos anteriormente mencionados), así como Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, tercera edición, Wiley-Liss, New York y las referencias citadas en éste; Doyle y Griffiths (1997) *Mammalian Cell Culture: Essential Techniques* John Wiley and Sons, NY; Humason (1979) *Animal Tissue Techniques*, cuarta edición W. H. Freeman and Company; y Ricciardelli et al. (1989) *In vitro Cell Dev Biol* 25: 1016-1024. Para el cultivo y regeneración de células vegetales véase, por ejemplo, Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg y Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) y *Plant Molecular Biology* (1993) R.R.D. Croy (ed.) Bios Scientific Publishers, Oxford, R.U. ISBN 0 12 198370 6. Los medios para cultivo celular generalmente se establecen en Atlas y Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL. Información adicional para el cultivo celular se encuentra en la literatura comercial disponible tal como the Life Science Research Cell Culture Catalogue a partir de Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, MO) ("Sigma-LSRCCC") y, por ejemplo, el catálogo de Plant Culture y suplementos también a partir de Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, MO) ("Sigma-PCCS").

209

Los polipéptidos de la invención se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes mediante cualesquiera de numerosos métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o con etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía por interacción hidrófoba, cromatografía por afinidad (por ejemplo, utilizando cualesquiera de los sistemas de marcado mencionados en la presente invención), cromatografía en hidroxilapatita, y cromatografía en lectina. Se pueden utilizar los pasos para replegamiento de la proteína, como se desee, para completar la configuración de la proteína madura o de los fragmentos de la misma. Finalmente, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) se puede emplear en los pasos finales de purificación. Además de las referencias mencionadas, anteriormente mencionadas, una variedad de métodos de purificación se conocen bien en la técnica, incluyendo, por ejemplo, aquellos establecidos en Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; Bollag et al. (1996) *Protein Methods*, 2a Edición Wiley-Liss, NY; Walker (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ; Harris y Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3a Edición Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, segunda edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ.

209

229

Sistemas de expresión in vitro

Los sistemas de transcripción/traducción libres de célula también se pueden emplear para producir los polipéptidos de la invención utilizando los polinucleótidos de la presente invención. Varios de dichos sistemas están comercialmente disponibles. Una guía general para los protocolos de transcripción y traducción in vitro se encuentran en Tymms (1995) In vitro Transcription and Translation Protocols: Methods in Molecular Biology Volumen 37, Garland Publishing, NY.

Usos y aplicaciones in vivo

Los polinucleótidos que codifican un polipéptido de la invención, o complementos de los polinucleótidos (incluyendo por ejemplo, moléculas antisentido o moléculas de ribozima), se administran opcionalmente a una célula para lograr un procedimiento terapéuticamente útil o para expresar un producto terapéuticamente útil.

Estas aplicaciones in vivo, incluyendo la terapia génica, incluyen una multitud de técnicas por medio de las cuales la expresión del gen se puede alterar en las células. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, la introducción de genes para la expresión de, por ejemplo, polipéptidos terapéuticamente y/o profilácticamente útiles, tales como los polipéptidos de la presente invención.

Expresión del polipéptido in vivo

Los polinucleótidos que codifican polipéptidos de la invención son particularmente útiles para aplicaciones terapéuticas in vivo, utilizando técnicas bien

210

209

conocidas por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, las células cultivadas se diseñan ex vivo con al menos un polinucleótido (ADN o ARN) de la invención y/u otras secuencias polipeptídicas que codifican, por ejemplo, al menos uno de un antígeno, citocina, otra molécula coestimulante, adjuvant, etc., y los similares, con las células
 5 diseñadas siendo regresadas entonces al paciente. Las células también se pueden diseñar in vivo para la expresión de uno o más polipéptidos in vivo, including polipéptidos y/o péptidos antigénicos de la invención.

Se conocen numerosos vectores virales adecuados para la transducción y expresión en el organismo in vivo. Dichos vectores incluyen vectores retrovirales (véase, por ejemplo, Miller, Curr Top Microbiol Immunol (1992) 158: 1-24; Salmons y Gunzburg (1993) Human Gene Therapy 4: 129-141; Miller et al. (1994) Methods in Enzymology 217: 581-599) y vectores adeno-asociados (revisado en Carter (1992) Curr Opinion Biotech 3: 533-539; Muzyczka (1992) Curr Top Microbiol Immunol. 158: 97-129). Otros vectores virales que se utilizan incluyen los vectores adenovirales, los vectores del herpes viral y
 15 los vectores del virus Sindbis, como se describe generalmente en, por ejemplo, Jolly (1994) Cancer Gene Therapy 1: 51-64; Latchman (1994) Molec Biotechnol 2: 179-195; y Johanning et al. (1995) Nucl Acids Res 23: 1495-1501.

En un aspecto, se pueden utilizar un vector del virus de la viruela. El vector viral de la viruela se transfecta con una secuencia polipeptídica que codifica un
 20 polipéptido de la invención, tal como un polipéptido eIL-2, y es útil en aplicaciones por profilácticas, terapéuticas y diagnósticas en donde se desea la mejoría de una respuesta inmune, tal como por ejemplo, proliferación incrementada o mejorada de la célula T. véase los vectores virales discutidos en, por ejemplo, Berencsi et al., J Infect Dis (2001)

341

210

183 (8): 1171-9; Rosenwirth et al., Vaccine 2001 Feb 8; 19 (13-14): 1661-70; Kittlesen et al., J Immunol (2000) 164 (8): 4204-11; et al. Gene Ther 2000 7 (19): 1680-9; Kanesa-
 thasan et al., Vaccine (2000) 19 (4-5): 483-91; (2000) Drug 60 (2): 249-71. Las
 composiciones que comprenden dichos vectores y un excipiente adecuado también son
 5 una característica de la invención.

La terapia génica y las vacunas genéticas proveen métodos para combatir
 la enfermedades infecciosas crónicas (por ejemplo, infección por VIH, hepatitis viral), así
 como enfermedades no infecciosas incluyendo cáncer y algunas formas de defectos
 congénitos tales como deficiencias enzimáticas, y dichos métodos se pueden emplear
 10 con polinucleótidos de la invención, incluyendo, por ejemplo, vectores y células que
 comprende dichos polinucleótidos. Se han utilizado varios métodos para la introducción
 de ácidos nucleicos y vectores dentro de células in vivo, ex vivo e in vitro y se pueden
 emplear con polinucleótidos de la invención, y vectores que comprenden dichos
 polinucleótidos. Estos métodos incluyen administración del gen basado en liposoma
 15 (Debs y Zhu (1993) WO 93/24640 y Patente de Estados Unidos No. 5,641,662; Mannino y
 Gould-Fogerite (1988) BioTechniques 6 (7): 682-691; Patente de Estados Unidos No.
 5,279,833; Brigham (1991) WO 91/06309; y Felgner et al. (1987) Proc Natl Acad Sci USA
 84: 7413-7414; Brigham et al. (1989) Am J Med Sci 298: 278-281; Nabel et al. (1990)
 Science 249: 1285-1288; Hazinski et al. (1991) Am J Resp Cell Molec Biol 4: 206-209; y
 20 Wang y Huang (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84: 7851-7855); administración del gen
 mediada por vector adenoviral, por ejemplo, para tratamiento del cáncer (véase, por
 ejemplo, Chen et al. (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91: 3054-3057; Tong et al. (1996)
 Gynecol Oncol 61: 175-179; Clayman et al. (1995) Cancer Res. 5: 1-6; O'Malley et al.

212

(1995) *Cancer Res* 55: 1080-1085; Hwang et al. (1995) *Am J Respir Cell Mol Biol* 13: 7-16; Haddada et al. (1995) *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995 (Pt. 3): 297-306; Addison et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8522-8526; Colak et al. (1995) *Brain Res* 691: 76-82; Crystal (1995) *Science* 270: 404-410; Elshami et al. (1996) *Human Gene Ther* 7: 141-148; Vincent et al. (1996) *J Neurosurg* 85: 648-654), y muchos otros. También se han utilizado los vectores retrovirales defectuosos en la replicación que contienen secuencias polipeptídicas terapéuticas como parte del genoma retroviral, particularmente con respecto a los vectores simples MuLV. Véase, por ejemplo, Miller et al. (1990) *Mol Cell Biol* 10: 4239 (1990); Kolberg (1992) *J NIH Res* 4: 43, y Cometta et al. (1991) *Hum Gene Ther* 2: 215). También se ha utilizado el transporte de ácido nucleico acoplado a los sistemas de transporte basados en catión, específicos del ligando (Wu y Wu (1988) *J Biol Chem*, 263: 14621-14624). Los vectores de expresión de ADN desnudo también han sido descritos (Nabel et al. (1990), anteriormente mencionado); Wolff et al. (1990) *Science*, 247: 1465-1468). en general, éstos métodos se pueden adaptar a la invención mediante incorporación de los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención dentro de los vectores apropiados.

Los textos generales los cuales describen protocolos de terapia génica, los cuales se pueden adaptar a la presente invención mediante la introducción de los ácidos nucleicos de la invención dentro de los pacientes, incluyen, por ejemplo, Robbins (1996) *Gene Therapy Protocols*, Humana Press, NJ, y Joyner (1993) *Gene Targeting: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Inglaterra.

212

Tecnología antisentido

Además de la expresión de los ácidos nucleicos de la invención como ácidos nucleicos para reemplazo de genes, los ácidos nucleicos también son útiles para la supresión de la expresión mediante sentido y antisentido, por ejemplo, para sub-regular la expresión de un ácido nucleico de la invención, una vez, o cuando, la expresión del ácido nucleico ya no se desea en la célula. Similarmente, los ácidos nucleicos de la invención, o subsecuencias o secuencias antisentido de las mismas, también se pueden utilizar para bloquear la expresión de los ácidos nucleicos homólogos que se presentan de manera natural. Se conoce en la técnica una variedad de tecnologías sentido y antisentido, por ejemplo, como se establece adicionalmente en Lichtenstein y Nellen (1997) Antisense Technology: A Practical Approach IRL Press at Oxford University, Oxford, Inglaterra, y en Agrawal (1996) Antisense Therapeutics Humana Press, NJ, y las referencias citadas en éste.

15

Uso como sondas

También se contemplan los usos de los polinucleótidos, también referidos en la presente invención como oligonucleótidos, típicamente que tienen al menos 12 bases, preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 20, al menos 30, o al menos 50 o más bases, las cuales hibridan bajo condiciones altamente severas con un polinucleótido de la invención, o fragmentos del mismo. Los polinucleótidos se pueden utilizar como sondas, iniciadores, agentes sentido y antisentido, y los similares, de conformidad con los métodos como se mencionó anteriormente.

20

214

Hibridación del ácido nucleico

Los ácidos nucleicos "hibridan" cuando se asocian, típicamente en solución.

Los ácidos nucleicos hibridan debido a una variedad de fuerzas fisicoquímicas bien caracterizadas, tales como formación de puentes de hidrógeno, exclusión por solvente, apilamiento de bases y los similares. Una guía extensiva a la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays, " (Elsevier, New York) (en adelante "Tijssen"), así como en Ausubel, anteriormente mencionado. Hames y Higgins (1995) Gene Probes 1, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (Hames y Higgins 1) y Hames y Higgins (1995) Gene Probes 2, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (Hames y Higgins 2) proveen detalles sobre la síntesis, marcado, detección y cuantificación de ADN y ARN, incluyendo oligonucleótidos.

Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí bajo al menos condiciones severas. La frase "que hibrida específicamente con", se refiere a la unión, la formación de duplex, o la hibridación de una molécula solamente con una secuencia nucleotídica particular bajo condiciones severas cuando la secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, total celular) de ADN o ARN. "Sustancialmente unido(s)" se refiere a la hibridación complementaria entre una sonda de ácido nucleico y un ácido nucleico blanco y comprende inconsistencias menores que se pueden acomodar mediante la reducción de la severidad del medio para hibridación para lograr la detección deseada de la secuencia polipeptídica blanco.

"Condiciones de lavado para hibridación severa" y "condiciones para hibridación severa" en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico, tales como las hibridaciones Southern y Northern, son dependientes de secuencia, y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Una guía extensiva a la hibridación de los ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993), anteriormente mencionado, y en Hames y Higgins 1 y Hames y Higgins 2, anteriormente mencionado.

Para propósitos de la presente invención, generalmente, la hibridación "altamente severa" y las condiciones de lavado se seleccionan para que sean de aproximadamente 5°C o al menos más baja que el punto de fundido térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica definida y pH (como se menciona a continuación, las condiciones altamente severas también se pueden referir en términos comparativos). La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica definida y pH) a la cual 50% de la secuencia se hibrida con una sonda perfectamente coincidente. En otras palabras, la T_m indica la temperatura a la cual el duplex de ácido nucleico está 50% desnaturalizado bajo las condiciones dadas y representa una medición directa de la estabilidad del híbrido de ácido nucleico. Por lo tanto, la T_m corresponde a la temperatura que corresponde al punto medio en la transición a partir de la hélice hacia enrollamiento al azar; esto depende de la longitud, composición de nucleótidos, y fuerza iónica para largas extensiones de nucleótidos. Típicamente, bajo "condiciones severas", una sonda hibridará con su subsecuencia blanco, pero no con otras secuencias. Las "condiciones muy severas" se seleccionan para que igualen a la T_m para una sonda particular.

Después de la hibridación, el material de ácido nucleico que no ha hibridado se puede remover mediante una serie de lavados, la severidad de los cuales

215

se puede ajustar dependiendo de los resultados deseados. Las condiciones de lavado a baja severidad (por ejemplo, utilizando ya sea una alta concentración de sales y una baja temperatura) incrementan la sensibilidad, pero pueden producir señales de hibridación no específicas y una alta cantidad de señales de fondo. Las condiciones de alta severidad (por ejemplo, utilizando una baja concentración de sales y una mayor temperatura que es cercana a la temperatura para hibridación) disminuye la formación de señal de fondo, típicamente permaneciendo solamente la señal específica. Véase, Rapley, R. y Walker, J. M. eds., *Molecular Biomechanics Handbook* (Humana Press, Inc. 1998) (en adelante "Rapley y Walker"), el cual se incorpora en la presente invención como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

La T_m de un duplex de ADN-ADN se puede estimar utilizando la ecuación (1): $T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 C + 16.6 (\log_{10} M) + 0.41 (\%G + C) - 0.72 (\%f) - 500/n$, en donde M es la molaridad de los cationes monovalentes (usualmente Na^+), $(\%G + C)$ es el porcentaje de los nucleótidos de guanosina (G) y citosina (C), $(\%f)$ es el porcentaje de formalina y n es el número de bases nucleotídicas (por ejemplo, longitud) del híbrido. Véase, Rapley y Walker, anteriormente mencionado.

La T_m de un duplex ARN-ADN se puede estimar utilizando la ecuación (2): $T_m (^{\circ}\text{C}) = 79.8^{\circ}\text{C} + 18.5 (\log_{10} M) + 0.58 (\%G + C) - 11.8(\%G + C)^2 - 0.56 (\%f) - 820/n$, en donde M es la molaridad de los cationes monovalentes (usualmente Na^+), $(\%G + C)$ es el porcentaje de los nucleótidos de guanosina (G) y citosina (C), $(\%f)$ es el porcentaje de formamida y n es el número de bases nucleotídicas (por ejemplo, longitud) del híbrido. Id. Las ecuaciones 1 y 2 anteriormente mencionadas típicamente son precisas solamente para híbridos en duplex más largos de aproximadamente 100-200 nucleótidos. Id.

217

La T_m de las secuencias de ácido nucleico más cortas de 50 nucleótidos se puede calcular como sigue:

$T_m (^{\circ}\text{C}) = 4(\text{G} + \text{C}) + 2(\text{A} + \text{T})$, en donde A (adenina), C, T (timina), y G son los números de los nucleótidos correspondientes.

- 5 Un ejemplo de condiciones de hibridación severas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios los cuales tienen más de 100 residuos complementarios en un filtro en un Southern o northern blot es 50% de formalina (o formamida) con 1 mg de heparina a 42°C, con la hibridación que se lleva a cabo durante toda la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado severas es un lavado con 0.2x SSC a 65°C por 15 minutos (véase Sambrook, anteriormente mencionado, para una descripción del regulador de pH de SSC). Frecuentemente, el lavado de alta severidad se precede por un lavado de baja severidad para remover la señal de fondo de la sonda. Un ejemplo de un lavado de baja severidad es con 2x SSC a 40°C por 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente severas es NaCl 0.15M a 72°C por 15 aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de un lavado con severidad media para un duplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 1x SSC a 45°C por 15 minutos. Un ejemplo de un lavado de baja severidad para un duplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es 4-6x SSC a 40°C por 15 minutos. Para sondas cortas (por ejemplo, aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones de severidad típicamente incluyen concentraciones salinas menores de aproximadamente 1.0 M del ion Na^+ , típicamente aproximadamente 0.01 a 1.0 M de concentración del ion Na^+ (u otras sales) a pH 7.0 a 8.3, y la temperatura típicamente es de al menos aproximadamente 30°C. Las
- 10
- 15
- 20

condiciones severas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes tal como formamida.

En general, una relación de la señal con respecto al ruido de fondo de 2x o 2.5x-5x (o mayor) que aquella observada para una sonda no relacionada en el ensayo particular de hibridación indica la detección de una hibridación específica. La detección de al menos la hibridización severa entre dos secuencias en el contexto de la presente invención indica una similitud u homología estructural relativamente fuerte a, por ejemplo, los ácidos nucleicos de la presente invención provistos en la secuencia listada en la presente invención.

Como se mencionó, las condiciones "altamente severas" se seleccionan para que sean de aproximadamente 5°C o menores que el punto de fundido térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica definida y pH. Las secuencias blanco que están cercanamente relacionadas o que son idénticas a la secuencia nucleotídica de interés (por ejemplo, "sonda") se pueden identificar bajo condiciones altamente severas.

Las condiciones de baja severidad son apropiadas para secuencias que son menos complementarias. Véase, por ejemplo, Rapley y Walker; Sambrook, todos anteriormente mencionados.

La hibridación comparativa también se puede utilizar para identificar los ácidos nucleicos de la invención, y este método de hibridación comparativa es un método preferido para distinguir a los ácidos nucleicos de la invención. La detección de hibridación altamente severa entre dos secuencias nucleotídicas en el contexto de la presente invención indica una similitud/homología estructural relativamente fuerte a, por ejemplo, los ácidos nucleicos provistos en el listado de secuencia en la presente

218

219

218

invención. La hibridación altamente severa entre dos secuencias nucleotídicas demuestra un grado de similitud o de homología de la estructura, composición de bases nucleotídicas, arreglo u orden que es mayor que aquella detectada para las condiciones de hibridación severas. En particular, la detección de la hibridación altamente severa en el contexto de la presente invención indica una fuerte similitud estructural u homología estructural (por ejemplo, estructura nucleotídica, composición de bases, arreglo u orden) a, por ejemplo, los ácidos nucleicos provistos en el listado de secuencia en la presente invención. Por ejemplo, es deseable identificar ácidos nucleicos prueba los cuales hibriden con los ácidos nucleicos ejemplares en la presente invención bajo condiciones severas.

10

Por lo tanto, una medida de hibridación severa es la capacidad de hibridar con uno de los ácidos nucleicos listados de la invención (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos SEQ ID NOS: 59-88, y secuencias polipeptídicas complementarias a las mismas) bajo condiciones altamente severas (o condiciones muy severas, o condiciones de hibridación ultra-altamente severas, o condiciones de hibridación ultra-ultra altamente severas). La hibridación severa (incluyendo, por ejemplo, condiciones de hibridación altamente severa, ultra-altamente severa, o ultra-ultra altamente severa) y las condiciones de lavado se puede determinar fácilmente de manera empírica para cualquier ácido nucleico prueba.

20

Por ejemplo, para la determinación de la hibridación altamente severa y condiciones de lavado, la hibridación y las condiciones de lavado se incrementan gradualmente (por ejemplo, al incrementar la temperatura, disminuir la concentración de sal, incrementar la concentración del detergente y/o incrementar la concentración de

220

solventes orgánicos, tal como formalina, en la hibridación o lavado), hasta que se alcance un criterio de selección deseado. Por ejemplo, la hibridación y las condiciones de lavado gradualmente se incrementan hasta que una sonda que comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas a partir de SEQ ID NOS: 59-88, y

5 secuencias polipeptídicas complementarias a las mismas, se unan a un blanco complementario de manera perfectamente coincidente (de nuevo, un ácido nucleico que comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas a partir de SEQ ID NOS: 59-88, y secuencias polinucleotídicas complementarias a las mismas), con una relación de señal de fondo con respecto al ruido de fondo que es al menos 2.5x, y

10 opcionalmente 5x o más tan alta como aquella observada para la hibridación de la sonda a un blanco no coincidente. En este caso, el blanco no coincidente es un ácido nucleico que corresponde a, por ejemplo, una secuencia conocida de ácido nucleico de interferón-alfa (por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos de interferón-alfa presente en una base de datos pública tal como GenBank o GENESEQ en el momento de la presentación

15 de la presente solicitud).

Se dice que un ácido nucleico prueba se hibrida específicamente a una sonda de ácido nucleico cuando se hibrida a al menos $\frac{1}{2}$ a la sonda complementaria perfectamente coincidente, por ejemplo, con una relación de la señal al ruido de fondo de al menos $\frac{1}{2}$ tan alta como la hibridación de la sonda al blanco bajo condiciones en las

20 cuales la sonda perfectamente coincidente se une al blanco complementario perfectamente coincidente con una relación de señal de fondo con respecto al ruido de fondo que es al menos aproximadamente 2.5x-10x, típicamente 5x-10x tan alta como aquella observada para la hibridación a cualesquiera de los ácidos nucleicos blanco no

228

coincidentes tal como, por ejemplo, una secuencia conocida de ácido nucleico de interferón-alfa como se estableció anteriormente. Para algunos de dichos ácidos nucleicos, las condiciones de severidad se seleccionan de tal manera que un oligonucleótido perfectamente complementario al oligonucleótido codificante se hibrida al oligonucleótido codificante con al menos aproximadamente una relación de la señal con respecto al ruido de fondo 5x mayor que para la hibridación del oligonucleótido perfectamente complementario a un ácido nucleico control que corresponde a una secuencia conocida de interferón-alfa como se estableció anteriormente.

La hibridación ultra altamente severa y condiciones de lavado son aquellas en las cuales la severidad de la hibridación y las condiciones de lavado se incrementan hasta que la relación de la señal con respecto al ruido de fondo para la unión de la sonda al ácido nucleico blanco complementario perfectamente coincidente es de al menos 10x tan alta como aquella observada para la hibridación a cualesquiera de los ácidos nucleicos blanco no coincidentes, tal como, por ejemplo, una secuencia conocida de ácido nucleico de interferón-alfa como se estableció anteriormente. Se dice que un ácido nucleico blanco el cual hibrida con una sonda bajo dichas condiciones, con una relación de la señal al ruido de fondo de al menos aquella del ácido nucleico blanco complementario perfectamente coincidente se une a la sonda bajo condiciones ultra altamente severas.

De manera similar, incluso se pueden determinar niveles más elevados de severidad mediante el incremento gradual de las condiciones de hibridación y/o de lavado del ensayo relevante para hibridación. Por ejemplo, aquellos en los cuales la severidad de la hibridación y las condiciones de lavado se incrementan hasta que la relación de la

002

221

señal con respecto al ruido de fondo para la unión de la sonda al ácido nucleico blanco complementario perfectamente coincidente es de al menos 10x, 20x, 50x, 100x, o 500x o más tan alta como aquella observada para la hibridación a cualesquiera de los ácidos nucleicos blanco no coincidentes, tal como, por ejemplo, una secuencia conocida de ácido nucleico de interferón-alfa como se estableció anteriormente. Se dice que un ácido nucleico blanco el cual hibrida con una sonda bajo dichas condiciones, con una relación de la señal al ruido de fondo de al menos $\frac{1}{2}$ a aquella del ácido nucleico blanco complementario perfectamente coincidente se une a la sonda bajo condiciones ultra-ultra-altamente severas.

0 Los ácidos nucleicos blanco que hibrida con uno o más ácidos nucleicos representados por SEQ ID NOS: 59-88 bajo condiciones de alta severidad, ultra-alta severidad y ultra-ultra alta severidad son una característica de la invención. Los ejemplos de dichos ácidos nucleicos incluyen aquellos con una o unas pocas sustituciones de aminoácidos silenciosos o conservativos en comparación con una secuencia dada de ácido nucleico.

Usos terapéuticos

Diversos polipéptidos de interferón-alfa y conjugados de interferón-alfa han sido aprobados o actualmente se encuentran en desarrollo clínico para el tratamiento de una variedad de condiciones tales como hepatitis crónica C, hepatitis crónica B, leucemia de célula pilosa, melanoma maligno, linfoma folicular, Condiloma Acuminatum, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, linfoma no de Hodgkin, leucemia mielógena crónica, carcinoma de célula basal, mieloma múltiple, tumores carcinoides, cáncer de vejiga

223

222

urinaria, enfermedad de Crohn, linfoma cutáneo de célula T, carcinoma de célula renal, esclerosis múltiple, y SIDA. Por consiguiente, la presente invención incluye un método para el tratamiento de una condición la cual responde al interferón-alfa, tal como por ejemplo una condición anteriormente descrita, que comprende administrar a un sujeto

5 que padece de la condición una composición que comprende un polipéptido de la invención o un conjugado de la invención en una cantidad efectiva para mejorar un síntoma asociado con la condición. La invención también incluye el uso de una composición que comprende un polipéptido de la invención o un conjugado de la invención (por ejemplo, una "composición de la invención") para el tratamiento de una

10 condición la cual responde al interferón-alfa, tal como una condición anteriormente descrita, o cualquier otra condición la cual responde a un polipéptido de la invención o a un conjugado de la invención.

Tratamiento de infecciones virales y condiciones asociadas con la infección

15 viral

En un aspecto, la invención provee un método para el tratamiento de un sujeto infectado con un virus, que comprende administrar al sujeto una composición de la invención en una cantidad efectiva para disminuir el nivel del virus en el sujeto y/o para mejorar un síntoma o condición asociada con la infección viral. Las infecciones virales

20 ejemplares contempladas por los métodos de tratamiento de la invención incluye, pero no se limitan a, infección por un virus de la familia Flaviviridae, tal como, por ejemplo, virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus oriental del Nilo, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue, o virus de la diarrea viral de bovino; infección por un virus de

224

223

la familia HepaADNviridae, tal como, por ejemplo, virus de la hepatitis B; infección por un virus de la familia Picomaviridae, tal como, por ejemplo, virus de la encefalomiocarditis, rinovirus de humano, o virus de la hepatitis A; infección por un virus de la familia Retroviridae, tal como, por ejemplo, virus de inmunodeficiencia de humano, virus de

5 inmunodeficiencia de simio, virus linfotrópico T de humano, o virus del sarcoma de Rous; infección por un virus de la familia Coronaviridae, tal como, por ejemplo, coronavirus del SARS; infección por un virus de la familia Rhabdoviridae, tal como, por ejemplo, virus de la rabia o virus de la estomatitis vesicular, infección por un virus de la familia Paramyxoviridae, tal como, por ejemplo, virus sincitial respiratorio o virus de la

10 Parainfluenza, infección por un virus de la familia Papillomaviridae, tal como, por ejemplo, papilomavirus de humano, e infección por un virus de la familia Herpesviridae, tal como, por ejemplo, virus del Herpes Simplex.

Los siguientes ejemplos no limitantes se proveen para el tratamiento de infecciones virales ejemplares y enfermedades y condiciones asociadas con dichas

15 infecciones utilizando polipéptidos y conjugados de la invención, incluyendo los programas de dosificación sugeridos para polipéptidos y conjugados de la invención y métodos para monitorear la eficiencia de dichos tratamientos. Los programas de dosificación de los polipéptidos o conjugados de la invención para el tratamiento de otras

20 infecciones virales y enfermedades y condiciones asociadas con las infecciones virales, y métodos para monitorear la eficiencia de dichos tratamientos, se pueden averiguar por un experto en la técnica.

228

Virus de la hepatitis C

En un aspecto la invención provee un método para el tratamiento de un paciente infectado con el virus de la hepatitis C (HCV), que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de una composición de la invención que comprende uno o más polipéptidos o conjugados de la invención. La invención también provee una composición para uso en el tratamiento de un paciente infectado con HCV, que comprende uno o más polipéptidos o conjugados de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Un paciente diagnosticado como infectado con HCV incluye un paciente que exhibe ARN de HCV en la sangre y/o que exhibe anticuerpo anti-HCV en el suero.

Una composición que comprende un polipéptido de la invención generalmente se administrará a una dosis y frecuencia similar a la que se emplea en regímenes terapéuticos contra HCV utilizando polipéptidos de interferón-alfa clínicamente aprobados, tales como, por ejemplo ROFERON®-A (interferón alfa-2a, recombinante; Hoffmann-La Roche Inc.), INTRON® A (interferón alfa-2b, recombinante; Schering Corporation), y INFERGEN® (interferón alfacon-1; InterMune, Inc.). Los programas de dosificación ejemplares recomendados de ROFERON o INTRON A para el tratamiento de HCV crónico es de 3 millones de UI (aproximadamente 15 microgramos (mcg)) tres veces a la semana mediante inyección subcutánea por, por ejemplo, 24 a 48 semanas. Un programa de dosificación ejemplar recomendado de INFERGEN para el tratamiento de HCV crónico es 9 mcg tres veces a la semana mediante inyección subcutánea por, por ejemplo, 24 a 48 semanas. Dependiendo de numerosos factores (incluyendo pero no limitados a la actividad y las farmacocinéticas del polipéptido de la invención y la talla y

225

altura del paciente), el polipéptido se puede administrar en cantidades menores (tal como, por ejemplo, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 mcg) y/o menos frecuentemente (tal como una vez a la semana o dos veces a la semana) en comparación con lo anteriormente descrito.

5 De manera similar, una composición que comprende un conjugado de la invención generalmente se administrará a una dosis y frecuencia similar a aquella que se emplea en regímenes terapéuticos para HCV utilizando conjugados de interferón-alfa clínicamente aprobados, tales como, por ejemplo, PEGASYS® (Peginterferón alfa-2a; Hoffmann-La Roche, Inc.) o PEG-INTRON® (peginterferón alfa-2b; Schering Corporation). Un programa de dosificación ejemplar recomendado de PEGASYS para el tratamiento de HCV crónico es 180 mcg una vez a la semana mediante inyección subcutánea por, por ejemplo, 24 a 48 semanas. Dependiendo de numerosos factores (incluyendo pero no limitados al peso molecular, actividad, y farmacocinéticas del conjugado de la invención y la talla y salud del paciente), el conjugado se puede
10
15 administrar en cantidades menores (tal como, por ejemplo, aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, o 150 mcg) y/o menos frecuentemente (tal como una vez cada 10 días, o una vez cada 2 semanas) en comparación con lo anteriormente descrito.

En algunos casos el polipéptido o conjugado de la invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, el
20 polipéptido o conjugado de la invención se puede administrar en combinación con un fármaco antiviral de molécula pequeña tal como Ribavirin, el cual se vende bajo los nombres COPEGUS® (Hoffmann-La Roche, Inc) y REBETOL® (Schering Corporation). Alternativamente, o además de un fármaco antiviral de molécula pequeña, el polipéptido o

227

226.

conjugado de la invención se puede administrar en combinación con una o más citocina adicionales, tal como, por ejemplo, IFN-gamma, el cual se vende bajo el nombre Actimmune® (interferón gamma-lb; InterMune, Inc.), IL-2, el cual se vende bajo el nombre PROLEUKIN® IL-2 (aldesleukin interleucina-2 recombinante de humano (rhIL-2); Chiron Corp.), o IL-12 (interleucina-12).

La cantidad precisa y frecuencia de administración del polipéptido o conjugado de la invención dependerá de numerosos factores tales como la actividad específica y las propiedades farmacocinéticas del polipéptido o del conjugado, así como la naturaleza de la condición a ser tratada (tal como, el genotipo del virus de la hepatitis C a ser tratada), entre otros factores conocidos por aquellos expertos en la técnica. Normalmente, la dosis debe ser capaz de prevenir o de disminuir la severidad o extensión de la indicación a ser tratada. Dicha dosis puede ser denominada una cantidad "efectiva" o "terapéuticamente efectiva". Será evidente a aquellos expertos en la técnica de una cantidad efectiva de una polipéptido, conjugado o composición de la invención depende, entre otros, de la condición a ser tratada, la dosis, el programa de administración, si el polipéptido o conjugado o composición se administra sola o en combinación con otros agentes terapéuticos, la vida media en suero y otras propiedades farmacocinéticas del polipéptido, conjugado o composición, así como la talla, edad, y salud general del paciente. La dosis y frecuencia de administración se pueden averiguar por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas.

La efectividad del tratamiento se puede determinar mediante la medición de la carga viral, por ejemplo mediante la determinación del título o nivel de virus en suero o plasma utilizando los métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante

-228

el monitoreo de los niveles de ARN viral utilizando pruebas basadas en PCR cuantitativo, tal como la prueba COBAS AMPLICOR® HCV, v2.0 o la prueba COBAS AMPLICOR HCV MONITOR®, v2.0 (ambas a partir de Roche Diagnostics). En algunos casos, una cantidad efectiva de una composición de la invención es aquella que es adecuada para lograr una reducción en la carga viral en al menos 2 unidades log, al menos 3 unidades log, al menos 4 unidades log, al menos 5 unidades log, al menos 6 unidades log o al menos 7 unidades log durante el curso del tratamiento, en comparación con la carga viral antes del tratamiento (la cual generalmente se encuentra en el intervalo de 10^5 - 10^7 copias de ARN de HCV/ml para los pacientes con HCV crónico). En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad la cual es suficiente para reducir la carga viral a niveles que esencialmente son indetectables, tal como, por ejemplo, menor de aproximadamente 500 copias/ml suero o menor de aproximadamente 100 copias/ml suero. La invención incluye un método para la reducción del nivel de ARN de HCV en suero de un paciente infectado con HCV, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el nivel de ARN de HCV en comparación con el nivel de ARN de HCV presente antes del inicio del tratamiento.

La efectividad del tratamiento se puede determinar alternativamente o además mediante la medición de un parámetro indicativo de una condición asociada con la infección por HCV, tal como, por ejemplo, daño hepático. Por ejemplo, el nivel de alaninaaminotransferasa en suero (ALT) se puede medir utilizando un ensayo estándar. En general, un nivel de ALT menor de aproximadamente 50 unidades internacionales/ml (UI/ml) en suero se considera normal. Un nivel mayor de ALT puede ser indicativo de

228

daño hepático en proceso. En algunos casos, una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad efectiva para reducir el nivel de ALT, en un paciente con un nivel de ALT mayor del normal, a menos de aproximadamente 50 UI/ml de suero. Por lo tanto, la invención incluye un método para la reducción del nivel de ALT en suero de un

5 paciente infectado con HCV que exhibe un nivel inicial de ALT mayor de 50 UI/ml, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el nivel de ALT a menos de aproximadamente 50 UI/ml.

Virus de inmunodeficiencia de humano

10 En otro aspecto la invención provee un método para el tratamiento de un paciente infectado con virus de inmunodeficiencia de humano (VIH), tal como VIH-1 o VIH-2, o una enfermedad o condición asociada con infección por VIH, tal como, por ejemplo, sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de una composición de la invención que comprende uno o

15 más polipéptidos o conjugados de la invención, opcionalmente en asociación con otros agentes terapéuticos antivirales como se describe a continuación. La invención también provee una composición para uso en el tratamiento de un paciente infectado con HIV o una enfermedad o condición asociada con infección por VIH, que comprende uno o más polipéptidos o conjugados de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente

20 aceptable. Un paciente diagnosticado como infectado con HIV incluye un paciente que exhibe niveles detectables de ARN de VIH o ADN proviral en la sangre, y/o que exhibe niveles detectables del antígeno p24 o del anticuerpo anti-VIH en suero.

229

Una composición que comprende un polipéptido de la invención generalmente se administrará a una dosis y frecuencia similar a aquella que se emplea en regímenes terapéuticos para tratar VIH utilizando polipéptidos de interferón-alfa tales como, por ejemplo ROFERON®-A (interferón alfa-2a, recombinante; Hoffmann-La Roche Inc.), INTRON® A (interferón alfa-2b, recombinante; Schering Corporation), e INFERGEN® (interferón alfacon-1; InterMune, Inc.). Como se mencionó anteriormente, los programas de dosificación ejemplares recomendados de ROFERON o INTRON A para el tratamiento de HCV crónico es de 3 millones de UI (aproximadamente 15 microgramos (mcg)) tres veces a la semana mediante inyección subcutánea por, por ejemplo, 24 a 48 semanas, y un programa de dosificación ejemplar recomendado de INFERGEN para el tratamiento de HCV crónico es de 9 mcg tres veces a la semana mediante inyección subcutánea por, por ejemplo, 24 a 48 semanas. Un programa de dosificación ejemplar recomendado de ROFERON para el tratamiento de sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA es de 36 millones de unidades diariamente por 10 a 12 semanas, luego 36 millones de unidades 3 veces a la semana. Un programa de dosificación ejemplar recomendado de INTRON A para el tratamiento de sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA es de 30 millones de UI/m² tres veces a la semana administrado subcutáneamente. Dichos programas de dosificación proveen intervalos útiles para la dosificación de un polipéptido de la invención para el tratamiento de HIV o una enfermedad o condición asociada con infección por VIH. Dependiendo de numerosos factores (incluyendo pero no limitados a la actividad y las farmacocinéticas del polipéptido de la invención y la talla, edad y salud del paciente), el polipéptido de la invención se

puede administrar en cantidades menores y/o menos frecuentemente en comparación con lo anteriormente descrito.

De manera similar, una composición que comprende un conjugado de la invención generalmente se administrará a una dosis y frecuencia similar a aquella que se emplea en regímenes terapéuticos contra VIH utilizando conjugados de interferón-alfa, tales como, por ejemplo, PEGASYS® (Peginterferón alfa-2a; Hoffmann-La Roche, Inc.) o PEG-INTRON® (peginterferón alfa-2b; Schering Corporation). Un programa de dosificación ejemplar de PEG-INTRON para el tratamiento de VIH es entre aproximadamente 1.0 mcg/kg/semana y 3.0 mcg/kg/semana mediante inyección subcutánea por, por ejemplo, 24 a 48 semanas. Dicho programa de dosificación provee un intervalo útil para la dosificación de un conjugado de la invención para el tratamiento del VIH. Dependiendo de numerosos factores (incluyendo pero no limitados al peso molecular, actividad, y farmacocinéticas del conjugado de la invención y la talla, edad y salud del paciente), el conjugado se puede administrar en cantidades menores (tal como, por ejemplo, aproximadamente 0.1, 0.25, 0.50, o 0.75 mcg/kg/semana) y/o menos frecuentemente (tal como una vez cada 10 días, o una vez cada 2 semanas) en comparación con lo anteriormente descrito.

En algunos casos el polipéptido o conjugado de la invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los tratamientos clínicos de la infección por VIH-1 en el hombre incluyen terapias de combinación de múltiples fármacos generalmente denominadas Terapia Antiretroviral Altamente Activa ("HAART"- por sus siglas en inglés). El polipéptido o conjugado de la invención se puede administrar así en combinación con HAART u otros compuestos terapéuticos antivirales.

Los componentes típicos de la HAART, los cuales incluyen diversas combinaciones de inhibidores de la nucleótido reverso transcriptasa ("NRTI"), inhibidores de la no nucleósido reverso transcriptasa ("NNRTI") e inhibidores de la VIH proteasa ("PI"), se describen, por ejemplo, en A. M. Vandamme et al. (1998) Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 9: 187-203; "Drugs for HIV Infection" en The Medical Letter Vol. 39 (publicación 1015) diciembre 5, 1997, páginas 111-116; y Solicitud de Patente publicada de los Estados Unidos US 20020182179 A1; cada uno de los cuales se incorpora como referencia en la presente invención. Si los pacientes infectados con VIH también se infectan con HCV, el polipéptido o conjugado de la invención se puede administrar en combinación con un fármaco antiviral tal como Ribavirin, el cual se vende bajo los nombres COPEGUS® (Hoffmann-La Roche, Inc) y REBETOL® (Schering Corporation), junto con HAART.

La cantidad precisa y frecuencia de administración del polipéptido o conjugado de la invención, y administración de agentes terapéuticos adicionales tales como HAART y/o Ribavirin, dependerá de numerosos factores tales como la actividad específica y las propiedades farmacocinéticas del polipéptido o del conjugado, así como la naturaleza de la condición a ser tratada (tal como, la presencia de infecciones virales adicionales tal como HCV), entre otros factores conocidos por aquellos expertos en la técnica. Normalmente, la dosis debe ser capaz de prevenir o disminuir la severidad o extensión de la indicación a ser tratada. Dicha dosis se puede denominar una cantidad "efectiva" o "terapéuticamente efectiva". Será evidente a aquellos expertos en la técnica que una cantidad efectiva de un polipéptido, conjugado o composición de la invención depende, entre otros, de la condición a ser tratada, la dosis, el programa de

232

administración, si el polipéptido o conjugado o composición se administra sola o en combinación con otros agentes terapéuticos, la vida media en suero y otras propiedades farmacocinéticas del polipéptido, conjugado o composición, así como la talla, edad, y salud general del paciente. La dosis y frecuencia de administración se puede averiguar por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas.

Además de los usos generales anteriormente descritos, un polipéptido o conjugado de la invención se puede administrar a las siguientes subpoblaciones de pacientes infectados con VIH: como una terapia adyuvante, por ejemplo a HAART como se describió anteriormente; como monoterapia o terapia de combinación en pacientes en etapa temprana cuando la carga viral generalmente es alta; como un agente combinado antiviral e inmunomodulador for pacientes que se someten a interrupciones del tratamiento estructurado (STI) o "fármacos de días feriados"; como terapia salvaje en pacientes cuyas opciones de HAART están limitadas; como un método de tratamiento antiviral para mantener la carga viral en monitoreo sin iniciar la terapia de HAART con el objeto de retrasar la aparición de virus resistentes a HAART.

La efectividad del tratamiento se puede determinar mediante la medición de la carga viral, por ejemplo mediante la determinación del título o nivel de virus en suero o plasma utilizando los métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante el monitoreo de los niveles de ARN viral de VIH-1 utilizando pruebas cuantitativas basadas en RT-PCR, tal como la prueba AMPLICOR HIV-1MONITOR®, v1.5 (Roche Diagnostics). En algunos casos, una cantidad efectiva de una composición de la invención es aquella que es adecuada para lograr una reducción en la carga viral en al menos 0.5 unidades log, al menos 1 unidad log, al menos 2 unidades log, al menos 3

234

unidades log, al menos 4 unidades log, al menos 5 unidades log, al menos 6 unidades log o al menos 7 unidades log durante el curso del tratamiento, en comparación con la carga viral antes del tratamiento. En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad la cual es suficiente para reducir la carga viral a niveles que esencialmente son indetectables, tal como, por ejemplo, menor de aproximadamente 50-100 copias de ARN de HIV-1 por ml de suero. La invención incluye un método para la reducción del nivel de ARN de HIV en suero de un paciente infectado con HIV, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el nivel de ARN de HIV en comparación con el nivel de ARN de HIV presente antes del inicio del tratamiento.

La efectividad del tratamiento se puede determinar alternativamente o además mediante marcadores en suero para la replicación de HIV, tal como la presencia del antígeno de VIH p24 en la sangre. En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad que es suficiente para reducir el nivel de antígeno p24 en la sangre a 50%, 25%, 10% o 5% del nivel presente antes del inicio del tratamiento. En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad que es suficiente para reducir el nivel del antígeno p24 a un nivel el cual es esencialmente indetectable. La invención incluye un método para la reducción del nivel del antígeno p24 en suero de un paciente infectado con HIV, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el nivel del antígeno p24 en comparación con el nivel del antígeno p24 presente antes del inicio del tratamiento.

234

Virus de la hepatitis B

En otro aspecto, la invención provee un método para el tratamiento de un paciente infectado con virus de la hepatitis B (HBV), que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de una composición de la invención que comprende uno o más polipéptidos o conjugados de la invención. La invención también provee una composición para uso en el tratamiento de un paciente infectado con HBV, que comprende uno o más polipéptidos o conjugados de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un paciente diagnosticado como infectado con HBV exhibe antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) detectable en el suero. La infección crónica por HBV se clasifica adicionalmente ya sea como "replicativa" o "no replicativa". En la infección replicativa, el paciente usualmente tiene una concentración relativamente alta de ADN viral en suero y HBeAg detectable, la cual es una proteína alternativamente procesada del gen pre-núcleo de HBV que se sintetiza bajo condiciones de alta replicación viral. No obstante, en las cepas extrañas de la HBV con mutaciones en el gen pre-núcleo, la infección replicativa se puede presentar en la ausencia de HBeAg detectable en suero. Los pacientes con hepatitis crónica B e infección replicativa tienen una prognosis generalmente muy mala y una mayor posibilidad de desarrollar cirrosis y/o carcinoma hepatocelular que aquellos sin HBeAg. En la infección no replicativa, la velocidad de replicación viral en el hígado es lenta, la concentración de ADN de HBV en suero generalmente es baja y el antígeno Be de la hepatitis (HBeAg) no se detecta.

Una composición que comprende un polipéptido de la invención generalmente se administrará a una dosis y frecuencia similar a aquella que se emplea

236

en regímenes terapéuticos contra HBV utilizando polipéptidos de interferón-alfa clínicamente aprobados, tal como, por ejemplo INTRON® A (interferón alfa-2b, recombinante; Schering Corporation). Un programa de dosificación ejemplar recomendado de INTRON A para el tratamiento de HBV crónico en adultos es de 30 a 35 millones de UI por semana mediante inyección subcutánea o intramuscular, ya sea como 5 millones de UI por día (qd) o como 10 millones de UI tres veces a la semana (tiw) por 16 semanas. Dependiendo de numerosos factores (incluyendo, pero no limitados a, la actividad y las farmacocinéticas del polipéptido de la invención, y la talla y salud del paciente), el polipéptido de la invención se puede administrar en cantidades menores (tal como, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, o 25 millones de UI por semana) y/o menos frecuentemente (tal como una vez a la semana o dos veces a la semana) en comparación con lo anteriormente descrito.

De manera similar, una composición que comprende un conjugado de la invención generalmente se administrará a una dosis y frecuencia similar a aquella que se emplea en regímenes terapéuticos contra HBV utilizando conjugados de interferón-alfa actualmente empleados en ensayos clínicos, tal como, por ejemplo, PEGASYS® (Peginterferón alfa-2a; Hoffmann-La Roche, Inc.). Los programas de dosificación ejemplar de PEGASYS para el tratamiento de HBV crónico es entre 90 mcg-270 mcg inyectados una vez a la semana por un total de 24 semanas. Dependiendo de numerosos factores (incluyendo pero no limitados al peso molecular, actividad, y farmacocinéticas del conjugado de la invención y la talla y salud del paciente), el conjugado se puede administrar en cantidades menores (tal como, por ejemplo, aproximadamente 25, 50, 75,

230

100, 125, 150, o 200 mcg) y/o menos frecuentemente (tal como una vez cada 10 días, o una vez cada 2 semanas) en comparación con lo anteriormente descrito.

En algunos casos el polipéptido o conjugado de la invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, el polipéptido o conjugado de la invención se puede administrar en combinación con fármacos antivirales tal como lamivudine (también conocido como 3TC), el cual se vende bajo el nombre Epivir-HBV® (GlaxoSmithKline), o adefovir dipivoxil, el cual se vende bajo el nombre Hepsera® (Gilead Sciences).

La cantidad precisa y frecuencia de administración del polipéptido o conjugado de la invención dependerá de numerosos factores tales como la actividad específica y las propiedades farmacocinéticas del polipéptido o del conjugado, así como la naturaleza de la condición a ser tratada (tal como, por ejemplo, en el caso de la infección crónica por HBV, en donde la infección es replicativa o no replicativa), entre otros factores conocidos por aquellos expertos en la técnica. Normalmente, la dosis debe ser capaz de prevenir o disminuir la severidad o extensión de la indicación a ser tratada. Dicha dosis se puede denominar una cantidad "efectiva" o "terapéuticamente efectiva". Será evidente a aquellos expertos en la técnica que una cantidad efectiva de una polipéptido, conjugado o composición de la invención depende, entre otros, de la condición a ser tratada, la dosis, el programa de administración, si el polipéptido o conjugado o composición se administra sola o en combinación con otros agentes terapéuticos, la vida media en suero y otras propiedades farmacocinéticas del polipéptido, conjugado o composición, así como la talla, edad, y salud general del paciente. La dosis y

238

237

frecuencia de administración se pueden averiguar por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas.

La efectividad del tratamiento se puede determinar por ejemplo mediante la medición de la carga viral, por ejemplo el nivel de ADN viral en suero o plasma, utilizando los métodos conocidos en la técnica. Los métodos para monitoreo de los niveles de ADN de HBV incluyen pruebas cuantitativas basadas en PCR, tales como la prueba COBAS AMPLICOR HBV MONITOR®, v2.0 o la prueba AMPLICOR HBV MONITOR®, v2.0 (ambas a partir de Roche Diagnostics). En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad que es suficiente para reducir el ADN viral a, por ejemplo, menos de aproximadamente 500,000 copias/ml suero o menor de aproximadamente 100,000 copias/ml suero o menor de aproximadamente 10,000 copias/ml suero, o a niveles los cuales son esencialmente indetectables (tal como, por ejemplo, menor de aproximadamente 1000 copias/ml suero, menor de aproximadamente 500 copias/ml suero, o menor de aproximadamente 200 copias/ml de suero). La invención incluye un método para la reducción del nivel de ADN de HBV en suero de un paciente infectado con HBV, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el nivel de ADN de HBV en comparación con el nivel de ADN de HBV presente antes del inicio del tratamiento.

La efectividad del tratamiento se puede determinar alternativamente o además mediante la medición de otros marcadores en suero para la replicación del HBV, tal como HBeAg. En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad que es suficiente para reducir el nivel de HBeAg en suero a 50%, 25%, 10% o 5% del nivel presente antes del inicio del tratamiento. En algunos

239

casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad que es suficiente para reducir el nivel de HBeAg a un nivel el cual es esencialmente indetectable. La invención incluye un método para la reducción del nivel de HBeAg en suero de un paciente infectado con HBV, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el nivel de HBeAg en comparación con el nivel de HBeAg presente antes del inicio del tratamiento.

Como se discutió anteriormente, otro marcador en suero indicativo de la infección por HBV es HBsAg. Por lo tanto, la efectividad del tratamiento se puede determinar alternativamente o además mediante la medición del nivel de HBsAg en el suero. En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad que es suficiente para reducir el nivel de HBsAg en suero a 50%, 25%, 10% o 5% del nivel presente antes del inicio del tratamiento. En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad que es suficiente para reducir el nivel de HBsAg a un nivel el cual es esencialmente indetectable. La invención incluye un método para la reducción del nivel de HBsAg en suero de un paciente infectado con HBV, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el nivel de HBsAg en comparación con el nivel de HBsAg presente antes del inicio del tratamiento.

La efectividad del tratamiento se puede determinar alternativamente o además mediante la medición de un parámetro indicativo de una condición asociada con la infección por HBV, tal como, por ejemplo, daño hepático. Por ejemplo, el nivel de alaninaaminotransferasa en suero (ALT) se puede medir utilizando un ensayo estándar. En general, un nivel de ALT menor de aproximadamente 50 unidades internacionales/ml

239

(UI/ml) en suero se considera normal. Un nivel mayor de ALT puede ser indicativo de daño hepático en proceso. En algunos casos, una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad efectiva para reducir el nivel de ALT, en un paciente con un nivel de ALT mayor del normal, a menos de aproximadamente 50 UI/ml de suero. Por lo tanto, la invención incluye un método para la reducción del nivel de ALT en suero de un paciente infectado con HBV que exhibe un nivel inicial de ALT mayor de 50 UI/ml, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el nivel de ALT a menos de aproximadamente 50 UI/ml.

10

Virus linfotrópico T de humano tipo 1

En otro aspecto la invención provee un método para el tratamiento de un paciente infectado con virus linfotrópico T de humano tipo 1 (HTLV-1), o una enfermedad o condición asociada con la infección por HTLV-1, tal como, por ejemplo, leucemia de célula T de adulto/linfoma (ATLL), mielopatía asociada con HTLV-1 (HAM), Paraparesis espástica tropical (TSP), uveítis, o artropatía. El método comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de una composición de la invención que comprende uno o más polipéptidos o conjugados de la invención. La invención también provee una composición para uso en el tratamiento de un paciente infectado con HTLV-1, o una enfermedad o condición asociada con la infección por HTLV-1, la composición que comprende uno o más polipéptidos o conjugados de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Un paciente diagnosticado con infección por HTLV-1 incluye un paciente que exhibe ADN proviral de HTLV-1 en la sangre y/o anticuerpo a un antígeno HTLV-1 en el suero.

241

Una composición que comprende un polipéptido de la invención generalmente se administrará a una dosis y frecuencia similar a aquella que se emplea en regímenes terapéuticos contra HCV o en oncología utilizando polipéptidos de interferón-alfa clínicamente aprobados, tales como, por ejemplo ROFERON®-A (interferón alfa-2a, recombinante; Hoffmann-La Roche Inc.) e INTRON® A (interferón alfa-2b, recombinante; Schering Corporation). Los programas de dosificación ejemplares recomendados de ROFERON o INTRON A para el tratamiento de HCV crónico es de 3 millones de UI (aproximadamente 15 microgramos (mcg)) tres veces a la semana mediante inyección subcutánea por, por ejemplo, 24 a 48 semanas. Un programa de dosificación ejemplar recomendado de ROFERON para el tratamiento de leucemia de célula pilosa es de 3-5 millones de unidades diariamente mediante inyección subcutánea por 16 a 24 semanas, luego 3 millones de unidades 3 veces a la semana para mantenimiento. Un programa de dosificación ejemplar recomendado de INTRON A para el tratamiento de leucemia de célula pilosa es de 2 millones de UI/m² (metro cuadrado de superficie corporal) administrado subcutáneamente 3 veces a la semana por 6 meses. Dichos programas de dosificación proveen intervalos útiles para la dosificación de un polipéptido de la invención para el tratamiento de la infección por HTLV-1, o una enfermedad o condición asociada con la infección por HTLV-1 tal como leucemia de célula T de adulto/linfoma (ATLL), mielopatía asociada con HTLV-1 (HAM), o Paraparesis espástica tropical (TSP). Dependiendo de numerosos factores (incluyendo pero no limitados a la actividad y las farmacocinéticas del polipéptido de la invención y la talla, edad y salud del paciente), el polipéptido se puede administrar en cantidades menores y/o menos frecuentemente en comparación con lo anteriormente descrito.

De manera similar, una composición que comprende un conjugado de la invención generalmente se administrará a una dosis y frecuencia similar a aquella que se emplea en regímenes terapéuticos contra HCV o en oncología utilizando conjugados de interferón-alfa clínicamente aprobados, tales como, por ejemplo, PEGASYS® (Peginterferón alfa-2a; Hoffmann-La Roche, Inc.) o PEG-INTRON® (peginterferón alfa-2b; Schering Corporation). Un programa de dosificación ejemplar recomendado de PEGASYS para el tratamiento de HCV crónico es de 180 mcg una vez a la semana mediante inyección subcutánea por, por ejemplo, 24 a 48 semanas. Un programa de dosificación ejemplar recomendado de PEG-INTRON para el tratamiento de leucemia mielógena crónica es de 6 mcg/kg de peso corporal una vez a la semana mediante inyección subcutánea por, por ejemplo, 52 semanas. Dichos programas de dosificación proveen intervalos útiles para la dosificación de un conjugado de la invención para el tratamiento de la infección por HTLV-1, o una enfermedad o condición asociada con la infección por HTLV-1 tal como leucemia de célula T de adulto/linfoma (ATLL), mielopatía asociada con HTLV-1 (HAM), o Paraparesis espástica tropical (TSP). Dependiendo de numerosos factores (incluyendo pero no limitados al peso molecular, actividad, y farmacocinéticas del conjugado de la invención y la talla, edad y salud del paciente), el conjugado se puede administrar en cantidades menores y/o menos frecuentemente en comparación con lo anteriormente descrito.

En algunos casos el polipéptido o conjugado de la invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, el polipéptido o conjugado de la invención se puede administrar en combinación con un fármaco antiretroviral tal como zidovudine (AZT) y/o lamivudine (3TC). Este también se

puede administrar en combinación con trasplante de célula madre sanguínea periférica, quimioterapia convencional, o alta dosis de quimioterapia con trasplantes autólogos o alogénicos de médula ósea. Alternativamente, el polipéptido o conjugado de la invención se puede combinar con otra inmunoterapia, por ejemplo con anticuerpos monoclonales al receptor de anti-interleucina-2 o inyección de células T citotóxicas dirigidas en contra de los antígenos virales.

La cantidad precisa y frecuencia de administración del polipéptido o conjugado de la invención dependerá de numerosos factores tales como la actividad específica y las propiedades farmacocinéticas del polipéptido o del conjugado, así como la naturaleza de la condición a ser tratada, entre otros factores conocidos por aquellos expertos en la técnica. Normalmente, la dosis debe ser capaz de prevenir o disminuir la severidad o extensión de la indicación a ser tratada. Dicha dosis se puede denominar una cantidad "efectiva" o "terapéuticamente efectiva". Será evidente a aquellos expertos en la técnica que una cantidad efectiva de una polipéptido, conjugado o composición de la invención depende, entre otros, de la condición a ser tratada, la dosis, el programa de administración, si el polipéptido o conjugado o composición se administra sola o en combinación con otros agentes terapéuticos, la vida media en suero y otras propiedades farmacocinéticas del polipéptido, conjugado o composición, así como la talla, edad, y salud general del paciente. La dosis y frecuencia de administración se pueden averiguar por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas.

La efectividad del tratamiento se puede determinar mediante la medición de la carga viral de HTLV-1, tal como, por ejemplo, midiendo el nivel de ADN proviral de HTLV-1 en la sangre utilizando los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo

243

mediante PCR cuantitativo como se describe por Saito et al., (2004) J. Infect Dis. 189 (1): 29-40. En algunos casos, una cantidad efectiva de una composición de la invención es aquella que es adecuada para lograr una reducción en la carga viral en al menos 0.5 unidades log, tal como al menos 1 unidad log, al menos 2 unidades log, al menos 3 unidades log, al menos 4 unidades log, al menos 5 unidades log, al menos 6 unidades log, o al menos 7 unidades log durante el curso del tratamiento, en comparación con la carga viral antes del tratamiento. En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad la cual es suficiente para reducir la carga viral a niveles que esencialmente son indetectables. La invención incluye un método para la reducción del nivel de ADN proviral de HTLV-1 en la sangre de un paciente infectado con HTLV-1, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el nivel de ADN proviral de HTLV-1 en comparación con aquel presente antes del inicio del tratamiento.

La efectividad del tratamiento se puede determinar alternativamente o además mediante la medición del título de un anticuerpo anti-HTLV-1 en el suero, utilizando los métodos conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante pruebas comercialmente disponibles tal como INNO-LIA™ HTLV I/II (Innogenetics; Gent Belgium) y Abbott HTLV-I/HTLV-II EIA (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL). En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad que es suficiente para reducir el título de un anticuerpo anti-HTLV-1 en el suero a 50%, 25%, 10% o 5% del título presente antes del inicio del tratamiento. En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad que es suficiente para reducir el título de un anticuerpo anti-HTLV-1 en el suero a un nivel el cual es esencialmente

245

244

indetectable. La invención incluye un método para la reducción del título de un anticuerpo anti-HTLV-1 en el suero de un paciente infectado con HTLV-I, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el título del anticuerpo anti-HTLV-1 en el suero en comparación con aquel presente antes del inicio del tratamiento.

Papilomavirus de humano

En otro aspecto la invención provee un método para el tratamiento de un paciente infectado con papilomavirus de humano (HPV), o una enfermedad o condición asociada con la infección por HPV, tal como, por ejemplo, verrugas de manos y pies, y lesiones de las membranas mucosas de las cavidades orales, anales y genitales. Aunque muchos tipos de HPV son relativamente inofensivos, muchos otros tipos se extienden a través del contacto sexual y da lugar a verrugas genitales o venéreas (denominadas condiloma acuminatum) los cuales da lugar a cáncer cervical y otros cánceres genitales.

El método comprende administrar al paciente infectado con HPV una cantidad efectiva de una composición de la invención que comprende uno o más polipéptidos o conjugados de la invención. La invención también provee una composición para uso en el tratamiento de un paciente infectado con HPV, o una enfermedad o condición asociada con la infección por HPV, la composición que comprende uno o más polipéptidos o conjugados de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Un paciente diagnosticado con infección por HPV incluye un paciente que exhibe ADN viral de HPV en biopsias de tejido genital, y algunas veces (pero no siempre) exhibe lesiones visibles en los tejidos genitales.

245

245

Una composición que comprende un polipéptido de la invención generalmente se administrará a una dosis y frecuencia similar a aquella que se emplea en regímenes terapéuticos contra HPV utilizando polipéptidos de interferón-alfa clínicamente aprobados, tal como, por ejemplo, INTRON® A (interferón alfa-2b, recombinante; Schering Corporation). Una dosis recomendada de INTRON A para el tratamiento del condiloma acuminatum es de 1.0 millones de UI inyectadas dentro de cada lesión, por hasta 5 lesiones, utilizando una jeringa de tuberculina o una jeringa similar y una aguja de calibre 25 a 30, tres veces a la semana en días alternos, por 3 semanas. pacientes con 6 a 10 condilomas pueden recibir un segundo curso de tratamiento (secuencial) en el programa de dosis anteriormente mencionado, para tratar hasta cinco condilomas adicionales por curso de tratamiento. Los pacientes con más de 10 condilomas pueden recibir secuencias adicionales dependiendo de qué tan grande es el número de condilomas presentes. El interferón se puede aplicar alternativamente o además tópicamente, por ejemplo en forma de una crema o ungüento (como se describe por ejemplo en Stentella et al. (1996) Clin. Exp. Obstet. Gynecol. 23 (1): 29-36). Dichos programas de dosificación proveen intervalos útiles para la dosificación de un polipéptido de la invención para el tratamiento de la infección por HPV, o una enfermedad o condición asociada con la infección por HPV tal como condiloma acuminatum. Dependiendo de numerosos factores (incluyendo pero no limitados a la actividad y las farmacocinéticas del polipéptido de la invención y la talla, edad y salud del paciente), el polipéptido de la invención se puede administrar en cantidades menores y/o menos frecuentemente en comparación con lo anteriormente descrito. De manera similar, una composición que comprende un conjugado de la invención generalmente se administrará,

247

246

por ejemplo intralesionalmente o tópicamente, a una dosis efectiva para reducir la cantidad de ADN viral de HPV en los tejidos afectados o para reducir el tamaño/o número de las lesiones genitales en el individuo infectado.

En algunos casos el polipéptido o conjugado de la invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, el polipéptido o conjugado de la invención se puede administrar en combinación con un terapéuticos anti-HPV tal como Podofilox (Condylox) y/o Podophyllin (Pododerm, Podocon-25).

La cantidad precisa y frecuencia de administración del polipéptido o conjugado de la invención dependerá de numerosos factores tales como la actividad específica y las propiedades farmacocinéticas del polipéptido o del conjugado, así como la naturaleza de la condición a ser tratada, entre otros factores conocidos por aquellos expertos en la técnica. Normalmente, la dosis debe ser capaz de prevenir o disminuir la severidad o extensión de la indicación a ser tratada. Dicha dosis se puede denominar una cantidad "efectiva" o "terapéuticamente efectiva". Será evidente a aquellos expertos en la técnica que una cantidad efectiva de una polipéptido, conjugado o composición de la invención depende, entre otros, de la condición a ser tratada, la dosis, el programa de administración, si el polipéptido o conjugado o composición se administra sola o en combinación con otros agentes terapéuticos, la vida media en suero y otras propiedades farmacocinéticas del polipéptido, conjugado o composición, así como la talla, edad, y salud general del paciente. La dosis y frecuencia de administración se pueden averiguar por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas.

248

247

La efectividad del tratamiento se puede determinar mediante la medición de la carga viral de HPV, tal como, por ejemplo, midiendo el nivel de ADN viral de HPV en biopsias de tejido. En algunos casos, una cantidad efectiva de una composición de la invención es aquella que es adecuada para lograr una reducción en la carga viral en al menos 0.5 unidades log, tal como al menos 1 unidad log, al menos 2 unidades log, al menos 3 unidades log, al menos 4 unidades log, al menos 5 unidades log, al menos 6 unidades log, o al menos 7 unidades log durante el curso del tratamiento, en comparación con la carga viral antes del tratamiento. En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad la cual es suficiente para reducir la carga viral a niveles que esencialmente son indetectables. La invención incluye un método para la reducción del nivel de ADN viral de HPV en tejido de un paciente infectado con HPV, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el nivel de ADN viral de HPV en comparación con aquel presente antes del inicio del tratamiento.

La efectividad del tratamiento se puede determinar alternativamente o además mediante la observación del tamaño o número de lesiones genitales (condilomas) en el individuo infectado. En algunos casos una cantidad efectiva de una composición de la invención es una cantidad que es suficiente para reducir el tamaño y/o número de condilomas en el individuo infectado. La invención incluye un método para la reducción del tamaño y/o número de condilomas en un paciente infectado con HPV, que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una cantidad efectiva para reducir el tamaño y/o número de condilomas en el paciente en comparación con aquel presente antes del inicio del tratamiento.

249

248

Formulaciones y rutas de administración

Las formulaciones terapéuticas del polipéptido o conjugado de la invención típicamente se administran en una composición que incluye uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden preparar de manera conocida per se en la técnica para resultar en un polipéptido farmacéutico que es adecuadamente estable para almacenamiento y es adecuado para la administración a humanos o animales.

Forma del fármaco

El polipéptido o conjugado de la invención se puede utilizar "tal como se encuentra" y/o en una forma de sal del mismo. Las sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales con metales alcalinos o metales térreos alcalinos, tales como sodio, potasio, calcio y magnesio, así como por ejemplo sales de zinc. Estas sales o complejos pueden estar presentes como una estructura cristalina y/o amorfa.

Excipientes

"Farmacéuticamente aceptable" significa un vehículo o excipientes que a las dosis y concentraciones empleadas no ocasionan ningún efecto adverso en los pacientes a los cuales se administra. Dichos vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990); Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis

250

(2000); y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3a edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

Mezcla de fármacos

5 La composición de la invención se puede administrar sola o en conjunción con otros agentes terapéuticos. El ribavirin, por ejemplo, frecuentemente se co-administra con IFN-alfa y se ha mostrado que incrementa la eficiencia en tratamientos antivirales, tal como el tratamiento para HCV. Se ha desarrollado una variedad de moléculas pequeñas tanto en contra de blancos virales (proteasas virales, polimerasa viral, ensamblaje de los

10 complejos de replicación viral) y blancos hospederos (proteasas del hospedero requeridas para el procesamiento viral, cinasas del hospedero requeridas para la fosforilación de los blancos virales tal como NS5A e inhibidores de factores del hospedero requeridas para utilizar de manera eficiente el IRES viral). Se pueden co-administrar otras

15 citocinas, tales como por ejemplo IL-2, IL-12, IL-23, IL-27, o IFN-gamma. Estos agentes se pueden incorporar como parte de la misma composición farmacéutica o se pueden administrar separadamente a partir del polipéptido o conjugado de la invención, ya sea concurrentemente o de conformidad con otro programa de tratamiento. Además, el polipéptido, conjugado o composición de la invención se puede utilizar como un adyuvante a otras terapias.

20

Pacientes

250

Un "paciente" para los propósitos de la presente invención incluye tanto humanos como otros mamíferos. Por lo tanto los métodos son aplicables tanto a terapia para humanos como para aplicaciones veterinarias.

5 Tipos de composición y rutas de administración

La composición farmacéutica que comprende el polipéptido o conjugado de la invención se puede formular en una variedad de formas, por ejemplo como líquido, gel, liofilizado, o como un sólido comprimido. La forma preferida dependerá de la indicación particular a ser tratada y será evidente para aquellos expertos en la técnica.

10 La administración de las formulaciones de la presente invención se puede llevar a cabo en una variedad de formas, incluyendo, pero no limitadas a, administración oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, intracerebralmente, intranasalmente, transdermalmente, intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonarmente, vaginalmente, rectalmente, intraocularmente, o en de cualquier otra manera aceptable.

15 Las formulaciones se pueden administrar continuamente mediante infusión, aunque es aceptable la inyección de bolo, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como bombas (por ejemplo, bombas osmóticas subcutáneas) o implante. En algunos casos las formulaciones se pueden aplicar directamente como una solución o aspersión.

20 Parenterales

Un ejemplo de una composición farmacéutica es una solución diseñada para administración parenteral. Aunque en muchos casos las formulaciones en solución farmacéutica se proveen en forma líquida, apropiada para uso inmediato, dichas

252

251

formulaciones parenterales también se pueden proveer en forma congelada o liofilizada. En el último caso, la composición se debe descongelar antes de su uso. Esta última forma se utiliza para mejorar la estabilidad del compuesto activo contenido en la composición bajo una amplia variedad de condiciones de almacenamiento, como se reconoce por aquellos expertos en la técnica que liofilizan preparaciones, éstas son generalmente más estables que sus contrapartes líquidas. Dichas preparaciones liofilizadas se reconstituyen antes de su uso mediante la adición de uno o más diluyentes adecuados farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

10 Los parenterales se pueden preparar para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mediante la mezcla, como se ha apropiada, del polipéptido que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables típicamente empleados en la técnica (todos los cuales se denominan "excipientes"), por ejemplo
15 agentes para regulación de pH, agentes estabilizantes, conservadores, isotonicantes, detergentes no iónicos, antioxidantes y/u otros aditivos misceláneos.

Los agentes para regulación de pH ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Estos están presentes típicamente a una concentración que tiene un intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50
20 mM. Los agentes para regulación de pH adecuados para uso con la presente invención incluye tanto ácidos orgánicos e inorgánicos y sales de los mismos tales como reguladores de pH de citrato (por ejemplo, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico, etc.),

253

252

reguladores de pH de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido succínico-succinato disódico, etc.), reguladores de pH de tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato de sodio, mezcla de ácido tartárico-tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc.), reguladores de pH de fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), reguladores de pH de gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato de sodio, mezcla de ácido glucónico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico-gluconato de potasio, etc.), regulador de pH de oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido oxálico-oxalato de potasio, etc.), reguladores de pH de lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato de sodio, mezcla de ácido láctico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido láctico-lactato de potasio, etc.) y reguladores de pH de acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato de sodio, mezcla de ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Las posibilidades adicionales son reguladores de pH de fosfato, reguladores de pH de histidina y sales de trimetilamina tal como Tris.

Los conservadores se añaden para retrasar el crecimiento microbiano, y típicamente se añaden en cantidades de aproximadamente 0.2%-1% (p/v). Los conservadores adecuados para uso con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metil paraben, propil paraben, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo cloruro, bromuro o yoduro de benzalconio), cloruro de hexametonio, alquil parabens tales como metil o propil paraben, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol.

254

253

Los isotonicadores se añaden para asegurar la isotonicidad de las composiciones líquidas e incluyen alcoholes de azúcar polihídrica, preferiblemente alcoholes de azúcar trihídrica o superior, tales como glicerina, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol y mannitol. Los alcoholes polihídricos pueden estar presentes en una cantidad entre 0.1% y 25% en peso, típicamente de 1% a 5%, tomando en cuenta las cantidades relativas de los otros ingredientes.

Los estabilizantes se refieren a una amplia categoría de excipientes los cuales pueden tener un intervalo en la función a partir de un agente para formación de masa a un aditivo el cual solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o adherencia a la pared del contenedor. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes de azúcar polihídrica (anteriormente mencionados); los aminoácidos tal como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, mannitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y los similares, incluyendo ciclitóles tal como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; péptidos de bajo peso molecular (por ejemplo <10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero de humano, albúmina de suero de bovino, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como polivinilpirrolidona; monosacáridos tales como xilosa, mannososa, fructuosa y glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa y sacarosa; trisacáridos tal como rafinosa, y polisacáridos tal como dextrán. Los

201

254

estabilizantes típicamente están presentes en el intervalo de 0.1 a 10,000 partes en peso basándose en el peso de la proteína activa.

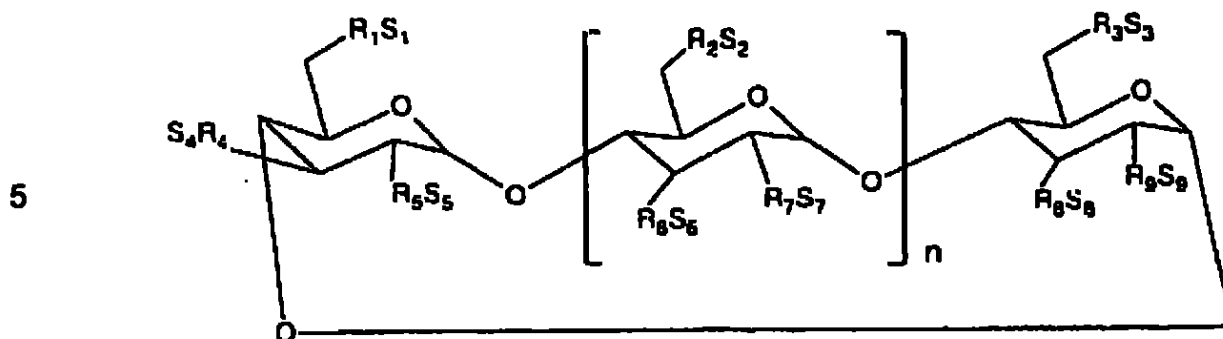
Los agentes tensoactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") pueden estar presentes para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger el polipéptido terapéutico en contra de la agregación inducida por agitación, lo cual también permite que la formulación se exponga a las fuerzas cortantes de superficie sin ocasionar la desnaturalización del polipéptido. Los agentes tensoactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188 etc.), Pluronic® poliols, monoéteres de polioxietilen sorbitano (Tween®-20, Tween®-80, etc.).

Los excipientes misceláneos adicionales incluyen agentes para formación de masa o llenadores (por ejemplo almidón), agentes quelantes (por ejemplo EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E) y cosolventes.

El ingrediente activo también se puede atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante las técnicas de coascervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo hidroximetilcelulosa, gelatina o poli-(metilmetacilato) en sistemas coloidales para administración de fármaco (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, anteriormente mencionado.

En un aspecto de la invención la composición es una composición líquida, tal como una composición acuosa, y comprende un derivado de sulfoalquil éter ciclodextrina de fórmula

256



en donde

10 n es 4, 5 o 6; R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , y R_9 son cada uno, independientemente, -O- o un grupo -O-(alquilo de C_2-C_8)- SO_3^- , en donde al menos uno de R_1 , R_2 o R_3 es independientemente un grupo -O-(alquilo de C_2-C_8)- SO_3^- ; y S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , y S_9 cada uno, independientemente, un catión farmacéuticamente aceptable, incluyendo H^+ .

15 Se debe mencionar que cuando $n=4$, la sulfoalquil éter ciclodextrina también se puede referir como una α -sulfoalquil éter ciclodextrina de manera similar, cuando $n = 5$, se puede emplear el término β -sulfoalquil éter ciclodextrina y cuando $n=6$, la sulfoalquil éter ciclodextrina también se puede referir como una γ -sulfoalquil éter ciclodextrina.

En una modalidad adicional, n es 5 ó 6. En una modalidad preferida $n=6$.

20 En incluso una modalidad adicional R_1 , R_2 o R_3 se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste de - $OCH_2CH_2CH_2SO_3^-$, - $OCH_2CH_2CH_2CH_2SO_3^-$ y - $OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2SO_3^-$. Más preferiblemente, R_1 , R_2 o R_3 es independientemente - $OCH_2CH_2CH_2CH_2SO_3^-$.

256

En una modalidad adicional S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, y S9 cada uno es, independientemente, un catión farmacéuticamente aceptable seleccionado a partir de H⁺, metales alcalinos (por ejemplo Li⁺, Na⁺, K⁺), metales térreos alcalinos (por ejemplo, Ca⁺², Mg⁺²), iones de amonio y cationes de amina tales como los cationes de alquilaminas de (C1-C6), piperidina, pirazinz, alcanolamina de (C1-C6) y cicloalcanolamina de (C4-C8). Más preferiblemente, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, y S9 cada uno es, independientemente, un catión farmacéuticamente aceptable seleccionado a partir del grupo que consiste de H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺, en particular Na⁺.

La sulfoalquil éter ciclodextrina puede contener de 1 a 18 grupos sulfoalquilo (cuando n=4), a partir de 1-21 grupos sulfoalquilo (cuando n=5) o a partir de 1-21 (cuando n=6). En una modalidad preferida de la invención n=5 y el derivado de sulfoalquiléter comprende, en promedio, 2-20 grupos sulfoalquilo (en particular grupos sulfobutilo), tal como 3-10 grupos sulfoalquilo (en particular grupos sulfobutilo), más preferiblemente 4-9 grupos sulfoalquilo (en particular grupos sulfobutilo), incluso más preferiblemente 5-9 grupos sulfoalquilo (en particular grupos sulfobutilo), tal como 6-8 grupos sulfoalquilo (en particular grupos sulfobutilo), por ejemplo 7 grupos sulfoalquilo (en particular grupos sulfobutilo).

En algunos casos el derivado de sulfoalquil éter ciclodextrina es una sal, en particular una sal de sodio, de β-ciclodextrina sulfobutil éter (por ejemplo n=5), la cual en promedio contiene 7 grupos sulfobutilo. Este derivado de sulfoalquil éter ciclodextrina también se denomina SBE7-β-CD y está disponible como Captisol® (Cydex, Overland Park, Kansas).

258

257

El término "alquilo de C1-C6" representa un grupo alquilo de cadena ramificada o recta que tiene de uno a seis átomos de carbono. Los grupos típicos de alquilo de C1-C6 incluyen, pero no se limitan a, metilo etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, ter-butilo, n-pentilo, iso-pentilo, n-hexilo e iso-hexilo.

5 El término "alquilo de C2-C6" representa un grupo alquilo de cadena ramificada o recta que tiene de dos a seis átomos de carbono. Los grupos típicos de alquilo de C2-C6 incluyen, pero no se limitan a, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, ter-butilo, n-pentilo, iso-pentilo, n-hexilo e iso-hexilo.

10 Los detalles adicionales que se refieren a las composiciones que comprenden los polipéptidos descritos en la presente invención y derivados de sulfoalquil éter ciclodextrina se pueden encontrar en WO 03/002152, particularmente en la sección titulada "el derivado de sulfoalquil éter ciclodextrina" en las páginas 37- 49, incorporado en la presente invención como referencia.

15 Las formulaciones parenterales a ser utilizadas para la administración in vivo deben estar estériles. Esto se logra fácilmente, por ejemplo, mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Preparaciones de liberación sostenida

20 Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido o conjugado, las matrices que tienen una forma adecuada tal como una película o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos;

259

copolímeros de L-ácido glutámico y etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradables, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tal como la tecnología ProLease® o Lupron Depot® (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3- hidroxibutírico.

- 5 Aunque los polímeros tales como acetato de etilen-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas por periodos largos tal como hasta o mayor de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por periodos de tiempo más cortos. Cuando los polipéptidos encapsulados permanecen en el cuerpo por un largo tiempo, éstos se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en una pérdida de la actividad biológica y cambios posibles y la inmunogenicidad. Las estrategias racionales se pueden inventar para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr mediante la modificación de residuos de
- 15 sulfhidrilo, liofilización a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones específicas de matriz polimérica.

Administración oral

- 20 Para administración oral, la composición farmacéutica puede estar en forma sólida o líquida, por ejemplo en la forma de una cápsula, tableta, suspensión, emulsión o solución. La composición farmacéutica preferiblemente se elabora en la forma de una unidad de dosis que contiene una cantidad dada del ingrediente activo. Una dosis diaria

adecuada para un humano u otro mamífero puede variar ampliamente dependiendo de la condición del paciente y otros factores, pero se puede determinar por personas expertas en la técnica utilizando métodos de rutina.

Las formas de dosis sólidas para administración oral pueden incluir cápsulas, tabletas, supositorios, polvos y gránulos. En dichas formas de dosis sólidas, el compuesto activo se puede mezclar con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa, o almidón. Algunas formas de dosis también pueden comprender, como en la práctica normal, sustancias adicionales, por ejemplo agentes lubricantes tal como estearato de magnesio. En el caso de las cápsulas, tabletas y píldoras, las formas de dosis también pueden comprender agentes reguladores de pH. Las tabletas y píldoras adicionalmente se pueden preparar con revestimientos entéricos.

Los polipéptidos o conjugados se pueden mezclar con adyuvantes tales como lactosa, sacarosa, almidón en polvo, ésteres de celulosa de ácidos alcanóicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y de calcio de ácidos fosfóricos y sulfúricos, acacia, gelatina, alginato de sodio, polivinil-pirrolidina, y/o polivinil alcohol, y se forma en tabletas o se encapsula para administración convencional. Alternativamente, éstos se pueden disolver en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceites (tales como aceite de maíz, aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón o aceite de ajonjolí), goma tragacanto, y/o diversos reguladores de pH. Otros adyuvantes y modos de administración también se conocen en la técnica farmacéutica. El vehículo o diluyente puede incluir material para retraso de tiempo, tal como gliceril monoestearato o gliceril diestearato solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

260

Las composiciones farmacéuticas se pueden someter a operaciones farmacéuticas convencionales tal como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales tales como conservadores, estabilizantes, agentes humectantes, emulsificantes, reguladores de pH, llenadores, etc., por ejemplo como se describe en otro

5 lugar en la presente invención.

Las formas de dosis líquidas para administración oral pueden incluir emulsiones farmacéuticamente aceptables, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tal como agua. Dichas composiciones también pueden comprender adyuvantes tales como agentes

10 humectantes, edulcorantes, agentes saborizantes y agentes perfumantes.

Administración pulmonar

Las formulaciones adecuadas para uso con un nebulizador, ya sea a chorro o ultrasónica, típicamente comprenderán el polipéptido o conjugado disuelto en agua a

15 una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 0.01 a 25 mg del conjugado por mL de solution, preferiblemente de aproximadamente 0.1 a 10 mg/mL. La formulación también puede incluir un regulador de pH y un azúcar simple (por ejemplo, para estabilización de la proteína y regulación de la presión osmótica), y/o albúmina de suero de humano tiene un intervalo en concentración a partir de 0.1 a 10 mg/ml. Los ejemplos

20 de reguladores de pH que se pueden utilizar son acetato de sodio, citrato y glicina. Preferiblemente, el regulador de pH tendrá una composición y molaridad adecuada para ajustar la solución a un pH en el intervalo de 3 a 9. Generalmente, las molaridades del regulador de pH a partir de 1 mM a 50 mM son adecuadas para este propósito. Los

262

261

ejemplos de azúcar es que se pueden utilizar son lactosa, maltosa, manitol, sorbitol, trehalosa, y xilosa, usualmente en cantidades que tienen un intervalo a partir de 1% a 10% en peso de la formulación.

La formulación en nebulizador también puede contener un agente tensioactivo para reducir o prevenir la agregación inducida por la superficie de la proteína ocasionada por la atomización de la solución en la formación del aerosol. Se pueden emplear varios agentes tensoactivos convencionales, tales como éteres de ácido graso de polioxietileno y alcoholes, y ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitano. Las cantidades generalmente estarán en un intervalo entre 0.001 % y 4% en peso de la formulación. Un agente tensioactivo especialmente preferido para propósitos de esta invención es polioxietileno sorbitano monooleato.

Las formulaciones específicas y métodos para la generación de dispersiones adecuadas de partículas líquidas de la invención se describen en WO 94/20069, US 5,915,378, US 5,960,792, US 5,957,124, US 5,934,272, US 5,915,378, US 5,855,564, US 5,826,570 y US 5,522,385 las cuales se incorporan en la presente invención como referencias.

Las formulaciones para uso con un dispositivo inhalador para dosis medida generalmente comprenderán un polvo finamente dividido. Este polvo se puede producir mediante la liofilización y luego molido de una formulación de conjugado líquido y también puede contener un estabilizante tal como albúmina de suero de humano (HSA). Típicamente, se añade más de 0.5% (p/p) de HSA. Adicionalmente, uno o más azúcares o alcoholes de azúcar se pueden añadir a la preparación si es necesario. Los ejemplos incluyen lactosa, maltosa, manitol, sorbitol, sorbitosa, trehalosa, xilitol, y xilosa. La

263

252

cantidad añadida a la formulación puede tener un intervalo de aproximadamente 0.01 a 200% (p/p), preferiblemente de aproximadamente 1 a 50%, del conjugado presente. Posteriormente dichas formulaciones se liofilizan y se muelen hasta el tamaño de partícula deseado.

5 Las partículas de tamaño adecuado se suspenden entonces en un propelente con la ayuda de un agente tensioactivo. El propelente puede ser cualquier material convencional empleado para este propósito, tal como un clorofluorocarbono, un hidroc fluorocarbono, un hidrof luorocarbono, o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol, y 1,1,1,2-
10 tetrafluoroetano; o combinaciones de los mismos. Los agentes tensoactivos adecuados incluyen sorbitan trioleato y lecitina de soya. El ácido oléico también puede ser útil como un agente tensioactivo. Esta mezcla se carga entonces dentro del dispositivo para administración. Un ejemplo de un inhalador de dosis medida comercialmente disponible adecuado para uso en la presente invención es el inhalador de dosis medida Ventolin,
15 elaborado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC, EUA.

Las formulaciones para inhaladores en polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene un conjugado y también puede incluir un agente formador de masa, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa, o manitol en cantidades que facilitan la dispersión del polvo a partir del dispositivo, por ejemplo, 50% a 90% en peso de la
20 formulación. Las partículas del polvo deben tener propiedades aerodinámicas en el pulmón que corresponden a partículas con una densidad de aproximadamente 1g/cm que tienen un diámetro medio menor de 10 micrómetros, preferiblemente entre 0.5 y 5 micrómetros, más preferiblemente de entre 1.5 y 3.5 micrómetros. Un ejemplo de un

264

263

inhalador en polvo adecuado para uso de conformidad con las enseñanzas en la presente invención es el inhalador en polvo Spinhaler, elaborado por Fisons Corp., Bedford, MA, EUA.

Los polvos para estos dispositivos se pueden generar y/o administrar
5 mediante los métodos descritos en US 5,997,848, US 5,993,783, US 5,985,248, US 5,976574, US 5,922,354, US 5,785,049 y US 5,654,007.

Los dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, incluyen pero no se limitan a nebulizadores, inhaladores de dosis medida, e inhaladores en polvo, todos los cuales son familiares a aquellos expertos en la
10 técnica. Los ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles adecuados para la práctica de esta invención son el nebulizador Ultravent, elaborado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, MO, EUA; el nebulizador Acom II, elaborado por Marquest Medical Products, Englewood, CO, EUA; el inhalador de dosis medida Ventolin, elaborado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC, EUA; el inhalador en polvo
15 Spinhaler, elaborado por Fisons Corp., Bedford, MA, EUA, el dispositivo de "nube permanente" de Nektar Therapeutics, Inc., San Carlos, CA, EUA; el inhalador AIR elaborado por Alkermes, Cambridge, MA, EUA; y el sistema de administración de fármaco pulmonar AERx elaborado por Aradigm Corporation, Hayward, CA, EUA.

20 Equipos

La presente invención también provee equipos incluyendo los polipéptidos, conjugados, polinucleótidos, vectores de expresión, células, métodos, composiciones, y sistemas, y aparatos de la invención. Los equipos de la invención opcionalmente

265

264

comprenden al menos uno de los siguientes de la invención: (1) un aparato, sistema, componente de sistema, o componente de aparato como se describe en la presente invención; (2) al menos un componente de equipo que comprende un polipéptido o conjugado o polinucleótido de la invención; un vector plasmídico de expresión que
5 codifica un polipéptido de la invención; una célula que expresa un polipéptido de la invención; o una composición que comprende al menos uno de dichos componentes; (3) instrucciones para la práctica de cualquier método descrito en la presente invención, incluyendo un método terapéutico o profiláctico, instrucciones para el uso de cualquier componente identificado en (2) o una composición de cualesquiera de dichos
10 componentes; y/o instrucciones para la operación de cualquier aparato, sistema o componente descrito en la presente invención; (4) un contenedor para contener dicho al menos uno de dichos componentes o composiciones, y (5) materiales de empaquetamiento.

En un aspecto adicional, la presente invención se provee para el uso de
15 cualquier aparato, componente, composición, o equipo anteriormente descrito y descrito en la presente invención, para la práctica de cualquier método o ensayo descrito en la presente invención, y/o para el uso de cualquier aparato, componente, composición, o equipo para practicar cualquier ensayo o método descrito en la presente invención.

20

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la presente invención, pero no se limitan al espíritu o alcance de la presente invención en cualquier forma.

266

Materiales y métodos

I. Determinación de los residuos accesibles en la superficie

área de la superficie accesible (ASA)

5 El programa de cómputo Access (B. Lee y F. M. Richards, J. Mol. Biol. 55: 379-400 (1971)) versión 2(© 1983 Yale University) se utilizó para calcular el área de superficie accesible (ASA) de los átomos individuales en la estructura. Este método típicamente utiliza un tamaño de sonda de 1.4 Å y define al área de superficie accesible (ASA) como el área formada por el centro de la sonda. Antes de este cálculo todas las

10 moléculas de agua y todos los átomos de hidrógeno deben ser removidos a partir de la serie coordinada, como se debe hacer con todos los otros átomos no directamente relacionados con la proteína.

ASA fraccional de cadena lateral

15 La ASA fraccional de los átomos de la cadena lateral se calcula mediante la división de la suma del ASA de átomos en la cadena lateral por un valor que representa el ASA de los átomos de la cadena lateral de ese residuo tipo en un tripéptido ALA-x-ALA extendido. Véase Hubbard, Campbell & Thornton (1991) J. Mol. Biol. 220, 507-530. Para este ejemplo el átomo CA se considera como parte de la cadena lateral de los residuos

20 de glicina pero no se considera para los residuos remanentes. Los siguientes valores se utilizan como el estándar al 100% del ASA para la cadena lateral (cuadro 6):

266

5

Ala	69.23	A ²		Leu	140.76	A ²
Arg	200.35	A ²		Lys	162.50	A ²
Asn	106.25	A ²		Met	156.08	A ²
Asp	102.06	A ²		Phe	163.90	A ²
Cys	96.69	A ²		Pro	119.65	A ²
Gln	140.58	A ²		Ser	78.16	A ²
Glu	134.61	A ²		Thr	101.67	A ²
Gly	32.28	A ²		Trp	210.89	A ²
His	147.00	A ²		Tyr	176.61	A ²
Ile	137.91	A ²		Val	114.14	A ²

10

Los residuos no detectados en la estructura se definen como que tienen 100% de exposición puesto que se piensa que residen en regiones flexibles. En el caso en donde se analiza un ensamble de estructuras de RMN, se utiliza el valor ASA promedio de ensamble.

15

Determinación de los residuos expuestos a la superficie cuando no está disponible una estructura tridimensional:

20

Cuando no está disponible una estructura tridimensional o si la estructura no se detalla lo suficientemente para determinar la accesibilidad a la superficie (por ejemplo si se conoce solamente la posición de los átomos del CA) la accesibilidad a la superficie se puede inferir a partir de un alineamiento de secuencia creado como sigue:

A: si se conoce la estructura pero no se detalla lo suficiente para determinar la accesibilidad a la superficie:

268

267

Se incluye la estructura con pocos detalles en un alineamiento de secuencia basado en estructura a las estructuras conocidas de la familia de secuencias utilizando el programa MODELER disponible a partir de Molecular Simulations, Inc.

5 B: si no se conoce la estructura:

La secuencia se alinea a un alineamiento de secuencia predefinido, incluyendo las secuencia de las estructuras conocidas de la familia de secuencias, que se puede preparar utilizando la opción de "perfil/alineamiento de estructura" del programa ClustalW (Thompson et al. (1994) Nucleic Acid Research 22: 4673-4680).

10 A partir del alineamiento de secuencia obtenido en A o B, los residuos en la secuencia a ser analizada en las posiciones equivalentes a los residuos expuestos en al menos una de las otras secuencias que tienen una estructura conocida se definen como elementos de están expuestos. El grado de exposición se toma para que sea considerado como el valor más grande para los residuos equivalentes en las otras secuencias. En los

15 casos en donde la secuencia a ser analizada se encuentra en una inserción (por ejemplo no existen residuos equivalentes en las otras secuencias) este residuo se define como un residuo completamente expuesto, puesto que más probablemente se localiza en una región de giro/asa. En los casos en donde existe una estructura con pocos detalles, aquellos residuos no observados en estructura se definen como elementos

20 completamente expuestos, puesto que se piensa que se encuentran en regiones flexibles.

289

268

Determinación de las distancias entre los átomos:

La distancia entre los átomos se determina fácilmente utilizando software para gráficas moleculares, por ejemplo InsightII® 98.0 a partir de Molecular Simulations, Inc.

5 **II. Expresión de proteína y purificación**

A. Expresión y purificación a partir de células CHO Cells

Algunos polipéptidos de la invención se produjeron en las células de ovario de hámster chino (CHO) K1 (ATCC: CCL-61) que se transfectaron de manera estable y se seleccionaron con G418 para establecer líneas celulares clonales.

0

1. Construcción de expresión en CHO:

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención se clonaron dentro de un vector de expresión de CHO, bajo el control del promotor SV40 y el marco con una secuencia que codifica una secuencia líder N-terminal, y, opcionalmente, una o dos secuencias marca C-terminales. La secuencia líder fue ya sea una secuencia líder genérica, una secuencia líder de IFN alfa 6 o una secuencia líder de IFN alfa 6 modificada, y las marcas C-terminales incluyeron una E-tag (Amersham Biosciences) y/o una His-tag. La producción de plásmidos se realizó en células XLI-Blue.

20 **2. Selección de subclonas estables que expresan polipéptidos IFN-alfa:**

Materiales:

Medio de cultivo: DMEM-F12 con G418, FBS y penicilina, estreptomicina y glutamina (PSG; Gibco/Invitrogen);

270

1xPBS (Gibco/Invitrogen);

Tripsina/EDTA

Anticuerpo Anti E-Tag conjugado con HRP (Amersham BioSciences)

Reactivos para detección de ECL Plus Western Blotting (Amersham

5 BioSciences)

Procedimiento: Los transfectantes estables se generaron bajo selección con G418 en medio DMEM/F-12 con FBS y penicilina. Las células se dividieron en botellas de T175 con 50 ml de medio de selección y se incubaron en una incubadora a 37°C con CO₂ por ~24 horas o hasta que las células alcanzarán 80% de confluencia. Las células se cosecharon mediante lavado con PBS seguido por la adición de 2.5 ml de tripsina/EDTA e incubación a 37°C por 3-5 minutos. Las células se colectaron y recuperaron mediante centrifugación a 1000 g por 30 minutos en una centrífuga de mesa modelo Beckman. Las células se lavaron una vez en PBS y se resuspendieron en 3 ml de PBS con 1% de FBS. La densidad celular se determinó y se ajustó a 1x10⁶ células/ml con PBS/FBS. Para cada polipéptido de IFN-alfa, las células se seleccionaron en un clasificador DakoCytomation MoFlo dentro de 2- 5 placas de 96 pozos que contienen 200 ml de medio de selección. Las placas se incubaron en una incubadora a 37°C por 10-14 días para permitir que las células clasificadas crezcan. Dos subclonas se seleccionaron para cada polipéptido de IFN-alfa para un alto nivel de expresión primero mediante análisis de dot blot y subsecuentemente se confirmó mediante análisis de Western blot utilizando un anticuerpo anti-E tag conjugado con-HRP y la detección quimioluminiscente.

270

3. Expresión de la proteína:**Materiales:****Medio DMEM-F12 (Gibco/Invitrogen)****Medio Ultra CHO (BioWhittaker)****5 Medio CHO III A (Gibco/Invitrogen)****Suplemento de medio para mejorar el crecimiento Ex-Cyte (Serologicals Proteins)****ITSA (Insulina, Transferrina, suplemento de selenio para cultivo adherente; Gibco/Invitrogen)****10 Penicilina/estreptomicina (P/S)****FBS, PBS, tripsina****Procedimiento:**

15 Día 1: las células a partir de una botella T-175 se transfirieron a una botella en movimiento (1700 cm²) en 300 ml de DMEM-F12 con 10% de FBS y 1xP/S y se crecieron en una incubadora a 37°C con CO₂.

● Día 3: El medio se cambió a 300 ml de DMEM-F12-FBS-P/S recientemente preparado.

Día 5: el medio se cambió a 300 ml de Ultra CHO con 1/1000 Ex-Cyte y P/S.

20 Día 7: el medio se reemplazó con 300 ml de medio para producción CHO III A + P/S.

Los sobrenadantes se cosecharon en los días 8, 9 y 10. Los sobrenadantes se centrifugaron a 2000 g por 20 minutos en una centrífuga de mesa Beckman Coulter

272

Allegra 6R y se filtró utilizando un filtro estéril en la parte superior de la botella 0.2 μ PES y se almacenó a 4°C para purificación.

4. Purificación de la proteína:

5 Algunos polipéptidos de la invención se expresaron como proteínas de fusión que contenían una secuencia E-tag de 13 aminoácidos en el extremo C terminal. Dichos polipéptidos se purificaron utilizando una columna de afinidad E-tag, como sigue.

Materiales: módulo para purificación de sistema de anticuerpo fago recombinante (Amersham BioSciences, Cat. No.17-1362-01). Equipo para purificación que contiene una columna de 16mm de diámetro x 25mm de altura (5 ml volumen del lecho) anti E-Tag y reguladores de pH asociados.

Procedimiento: Los sobrenadantes que se recolectaron a partir de células CHO-HK1 embotellas en movimiento se purificaron utilizando una combinación de centrifugación a 2800xg por 20 minutos y filtración utilizando un módulo del filtro en la parte superior de la botella 0.2 μ PES. Los sobrenadantes se cargaron sobre la columna E-tag equilibrada en reguladores de pH para unión RPAS a 150 cm/h (5 ml/min). La columna se lavó con 5 CV (volumen de columna) del regulador de pH para unión y la proteína se eluyó a 75 cm/h (2.5ml/min) con regulador de pH para elución RPAS. Las fracciones de la elución se neutralizaron con 0.05 volúmenes de Tris-Cl 1M pH 8.0, se dializaron en PBS, se concentraron a 0.1-1.5 mg/ml y se almacenaron congeladas en alícuotas a -80°C. Las muestras para los ensayos se formularon a 50 μ g/ml en PBS con 0.5% de BSA y se almacenaron congeladas en alícuotas a -80°C. Las muestras se

272

analizaron rutinariamente mediante SDS-PAGE seguido por tinción con Coomassie utilizando materiales, reactivos y protocolos obtenidos a partir de Invitrogen.

Las concentraciones de proteína se determinaron rutinariamente mediante el ensayo BCA utilizando un estándar de IFN- alfa, la concentración del cual había sido

5 verificada mediante análisis de aminoácidos.

B. Expresión y purificación a partir de E. coli

Algunos polipéptidos de la invención se produjeron en E. coli como cuerpos de inclusión, los cuales se purificaron y se replegaron como sigue.

0 1a. Construcción de expresión en E. coli

En algunos casos, los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención se modificaron para mejorar la expresión en E. coli. Dichas modificaciones comprenden el reemplazo de pares de codones raros de Arg-Arg AGG AGG en las posiciones de los nucleótidos 34-39 y AGGAGA en las posiciones de los nucleótidos 64-
15 69 (numeración de la posición en relación con SEQ ID NO: 59) cada uno con pares de codones Arg-Arg tal como CGTCGC los cuales se prefieren en E. coli, o reemplazando la mayoría o todos los codones raros de Arg AGA y AGG en la secuencia codificante con codones preferidos por E. coli Arg CGC o CGT. También se añadió un codón de metionina (ATG) al extremo 5' de la secuencia codificante. Las secuencias codificantes
20 ejemplares modificadas de tal manera incluyen SEQ ID NOs: 60-61, 63-64, 66-67, 69-70, 72-73, 75-76, 78-79, 81-82, 84-85, y 87-88. La secuencia codificante se colocó dentro del vector de expresión pET-42 (Novagen) bajo el control de un promotor T7 con marcador

274

273

de selección a canamicina, o dentro del vector de expresión pQE80-Kan (Qiagen) bajo el control de un promotor T5 con marcador de selección a canamicina.

1b. Expresión de proteína

5 Los vectores pET-42 que contienen secuencias codificantes de interferón se transformaron dentro de una cepa de E. coli tal como BL21 (DE3) utilizando métodos estándares, y se colocaron sobre placas de agar que contenían 50 µg/ml de canamicina y se incubaron a 37°C. Después de 18-24 horas, se seleccionaron tres colonias separadas y se transfirieron dentro de tubos que contenían 5 ml de 2xYT con 50 µg/ml de
0 canamicina y se incubaron durante toda la noche a 37°C. El cultivo durante toda la noche se utilizó para inocular 2 series de botellas que contenían 100 ml de 2xYT con 50 µg/ml de canamicina. El crecimiento del cultivo a 37°C se monitoreó a DO600. El cultivo se indujo a una DO600 de 0.5-0.8 con IPTG 1 mM por 3 horas a 37°C. Las células inducidas con IPTG se analizaron para expresión mediante SDS-PAGE de células concentradas
15 lisadas en regulador de pH para muestra SDS. Las series de cultivos no inducidos correspondientes se utilizaron para preparar soluciones de almacenamiento congeladas mediante la adición de 25% de glicerol y las células se congelaron en alícuotas de 1 ml a -80°C. Los vectores pQE80-Kan que contenían las secuencias codificantes de interferón se transformaron dentro de las cepas de E. coli W3110 o W3110-fhuA. La expresión se
20 verificó como se describió anteriormente.

La expresión de la botella en agitación a mayor escala se llevó a cabo mediante la inoculación de medio 4x1L 2xYT +canamicina con 25 ml de un cultivo realizado durante toda la noche. Los cultivos se monitorearon a DO600 y se indujeron con

275

IPTG 1 mM a 0.5-0.8 unidades de DO. Después de 3 horas de inducción las células se cosecharon mediante centrifugación a 5000 g y se almacenaron congeladas a -80°C. Las células se fragmentaron utilizando 2-3 pases a través de una prensa francesa o un homogenizador APV 1000 a 10,000 psi y procesaron como se describe bajo la sección de

5 "aislamiento de IB" y las secciones subsecuentes.

La fermentación en lote se llevó a cabo a una escala de 10L en un bioreactor B. Braun en medio Terrific Broth (TB) suplementado con una solución de elementos traza y 40 mg/L de canamicina. La fermentación se inició mediante la inoculación del bioreactor con 400 ml de un cultivo realizado durante toda la noche en medio TB. Durante la fase inicial de crecimiento el oxígeno disuelto (DO) se mantuvo a 50% mediante la variación de la velocidad de agitación. Cuando la DO600 del cultivo alcanzó 5.0, el ingreso de glicerol/aminoácidos se inició a 0.5 ml/min y la agitación se estableció a 1000 rpm. La velocidad de ingresos se ajustó para mantener la DO a 40% para el resto del procedimiento de fermentación. Cuando la DO600 alcanzó 25 el cultivo se indujo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. Tres horas después de la inducción las células se cosecharon mediante centrifugación a 10000xg en una centrifuga Beckman y la pasta celular se almacenó a -60°C. La DO600 durante la cosecha típicamente fue de alrededor de 35-40.

20 2a. Construcción de expresión en E. coli (para alto nivel de expresión)

El siguiente ejemplo muestra la expresión de dos polipéptidos ejemplares de la invención clonados dentro de un sistema de expresión de E. coli (como se describe en EP 0972838) permitiendo un alto nivel de expresión de los genes eucariontes en E. coli.

275

Las secuencias codificantes que corresponden a las secuencias de aminoácidos de 14epi 18 (SEQ ID NO: 13) y 25epi 19 (SEQ ID NO: 38), ambas conteniendo una Met adicional en el extremo N terminal, se optimizaron de conformidad con el uso de codón y la estructura secundaria del ARNm (Griswold et al., Protein Expr Purif. 2003 enero; 27 (1): 134-42) utilizando la función del programa de análisis de secuencia GCG (Genetic Computer Group, Inc., Wisconsin EUA, Versión 7.1, marzo 1992) "backtranslate"/"EcoHigh-database" para prevenir los codones raros, y la función MFold/Plotfold (-menu=f o -menu=g) para la predicción y prevención de las estructuras secundarias potenciales detrimentales a la expresión del gen. Las secuencias codificantes optimizadas de esta manera se proveen como SEQ ID: 89 y SEQ ID NO: 90, respectivamente.

Las secuencias optimizadas de ADN se clonaron dentro de OripBR-URA3 con un gen lacI adicional. Los vectores resultantes, designados OripBR-URA3-lacI~14epi18-mut2 (figura 6) y OripBR-URA3-lacI~25epi19-mut (figura 7), se transformaron dentro de células E. coli UT5600(ApyrF) competentes (como se describió en EP 0972838). Las células transformadas se seleccionaron sobre placas de agar con medio mínimo M9 sin la adición de uracilo.

Placas de agar M9:

20 Solución de almacenamiento de agar estéril (concentración final 15g/1) 430 ml

solución salina M9 50 ml

MgSO4 1M 0.5 ml

277

226

- CaCl₂ 1M 0.05 ml
- glucosa al 20% 5 ml
- Vitamina B 1 (c=1 mg/ml) 2.5 ml
- 10% de Casaminoácidos 25 ml
- 5 L-triptofano (c= 5mg/ml) 5 ml
- L-Leucina (c=5 mg/ml) 5 ml
- L-Prolina (c=5 mg/ml) 2.5 ml

2b. Expresión de proteína

10 Las células transformadas de conformidad con 2a anteriormente mencionadas se inocularon en botellas en agitación y se cultivaron a 37°C. La inducción se llevó a cabo a OD₅₇₈=1 mediante la adición de IPTG 1 mM. Las células se cosecharon después de 7 horas y los concentrados celulares se analizaron en un gel de SDS-PAGE. El medio utilizado es como sigue:

- 15 Casaminoácidos 120 g
- NH₄Cl 3.9 g
- triptofano 5.5 g
- Leucina 5.5 g
- Prolina 5.5 g
- glicerina 85 g disuelta en 4300 ml H₂O y
- 20 K₂HPO₄·3H₂O 91.5 g
- ácido cítrico 8.0 g disuelto en 600 ml H₂O y
- Tiamina (5 mg/ml) 17.5 ml de MgSO₄ ·7H₂O (1M) 17.5 ml pH = 7.0
- ajustado a 5000 ml con H₂O

277

3. Aislamiento, solubilización, sulfonación y replegamiento de los cuerpos de inclusión (IB)

Para el aislamiento de IB la pasta de células descongeladas se resuspendió en 1 x PBS a 10 ml por gramo de pasta de células y se mezcló hasta que se obtuvo una pasta aguada homogénea. Las células se fragmentaron mediante los pasos a través de un aparato de microfluidez a 17,000-19,000 psi. El lisado celular se ajustó a 1% Tritón-X100, se mezcló por 10 minutos y los IB se recuperaron mediante centrifugación a 10,000g por 60 minutos a 2-8°C. El concentrado de IB se lavó una vez al resuspender en PBS con 1% Tritón-X 100 y se recuperó mediante centrifugación como se mencionó anteriormente y se almacenó en congelamiento a - 80°C.

3a. Solubilización/replegamiento

Método 1:

Para la solubilización de los IB, el concentrado de IB se resuspendió en regulador de pH de Urea (50 mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, 8 M urea, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8.0) con 10 ml de regulador de pH por gramo de pasta celular. La suspensión se mezcló por 30 minutos y se centrifugó a 10,000g por 30 minutos a 2-8°C. El concentrado se lavó una vez al resuspender en el regulador de pH con Urea sin DTT, se centrifugó como se mencionó anteriormente y se lavó dos veces con agua. El concentrado lavado se solubilizó en regulador de pH con guanidina (50 mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, 8 M guanidina-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 10 ml de regulador de pH por gramo de concentrado, se mezcló por 30-60 minutos y se centrifugó a 10,000 g por 30

279

278

minutos a 2-8°C. El sobrenadante que contenía el IFN solubilizado se ajustó a 10 mg/ml de sulfito de sodio y 5 mg/ml tetratiónato de sodio para iniciar el proceso de sulfonación el cual se llevó a cabo a 2-8°C por 16 horas. Después de la sulfonación la solución con IFN se diluyó 2 veces con agua y el concentrado de IFN se recuperó mediante centrifugación a 10,000 g a 2-8°C. El concentrado se lavó dos veces con agua y se resuspendió en regulador de pH con guanidina como se mencionó anteriormente. La concentración de proteína del IFN sulfonado se determinó mediante la absorbancia a 280nm.

El procedimiento de replegamiento se inició mediante la dilución del IFN sulfonado en regulador de pH con guanidina a 2-8°C a una concentración final de 100 mg/ml en regulador de pH para replegamiento (50 mM Tris-Cl, 20 mM NaCl, 2 mM glutatona reducida, 1 mM glutatona oxidada). El replegamiento se llevó a cabo a 2-8°C con mezclado lento por 6-8 horas, seguido por la adición de CuSO₄ a una concentración final de 2 µM seguido por un período de replegamiento adicional de 16-20 horas. El progreso de la reacción de replegamiento se monitoreó mediante SDS-PAGE y CLAR en fase reversa.

3b. Solubilización/replegamiento

Método 2:

Para la solubilización de 14epil8, el concentrado de los IB se resuspendió en regulador de pH con guanidina (7 M Guanidina, 20 mM Na₂HPO₄, 10 mM DTE, pH 8.0) a 4 ml de regulador de pH por gramo de pasta IB. La suspensión se mezcló por 2 horas y, después de la solubilización, se diafiltró en al menos 8 volúmenes a temperatura

279

ambiente encontrar en regulador de pH que contenía 7 M de regulador de pH con guanidina y 20 mM de NaH_2PO_4 pH 5.0 utilizando membranas con límite de 10 kDa.

Para replegamiento, la proteína solubilizada se diluyó dentro de un regulador de pH para plegamiento que contenía 20 mM Na_2HPO_4 , 0.8 M arginina y 2 μM CuSO_4 , pH 7.5. El replegamiento se llevó a cabo a 2-8°C con mezclado lento por 72 horas a una concentración final de proteína de aproximadamente 0.5 mg/ml de proteína. El progreso de la reacción de replegamiento se monitoreó mediante CLAR en fase reversa.

3b. Solubilización/replegamiento

Método 3:

Para la solubilización de 25epil9, la pasta aguada IB se resuspendió en regulador de pH para solubilización (8 M de cloruro de guanidinio, 100 mM DTT, 50 mM Tris pH 8.3). La suspensión se mezcló por 30 minutos a temperatura ambiente. Subsecuentemente el pH se ajustó a 4.5 con HCl. El solubilizado se concentró adicionalmente utilizando una membrana 5 K y se diafiltró en contra de 10 veces el volumen 7.2 M El cloruro de guanidinio se ajustó a pH 4.5 con HCl.

Para replegamiento, la proteína solubilizado se diluyó dentro de un regulador de pH para plegamiento (0.8 M arginina, 50 mM fosfato de potasio, 2 mM GSH, 1 mM GSSG pH 7.8). El replegamiento se llevó a cabo a 2 - 8°C durante toda la noche una concentración final de aproximadamente 1 mg/ml de proteína.

280

4. Purificación

4a. Purificación

5

Método 1:

El IFN replegado se purificó utilizando tres pasos de cromatografía. La solución para replegamiento se ajustó a 80% de concentración saturante de sulfato de amonio (peso/volumen), se filtró a través de un filtro 0.2 μ M y se cargó a 200 cm/h sobre una columna cromatográfica de interacción hidrófoba de flujo rápido (HIC) de 20 ml de Butil Sepharose (Amersham Biosciences) se equilibró con un regulador de pH para equilibrio (50 mM Tris-Cl, 0.8 M sulfato de amonio, pH 8.0). La columna HIC se lavó con 8 volúmenes de columna (CV) de regulador de pH para equilibrio, seguido por 8 CV de regulador de pH para lavado (50 mM Tris-Cl, 0.5 M sulfato de amonio, pH 8.0). El IFN se eluyó con 50 mM Tris-Cl, pH 8.0 con o sin 15% de concentración saturante de sulfato de amonio.

10

15

El agrupamiento de HIC se ajustó con 50 mM de acetato de sodio utilizando 0.5 M acetato de sodio, pH 4.5 en almacenamiento y se diluyó dos veces. Este agrupamiento ajustado se cargó a 90 cm/h sobre una columna de flujo rápido de 5 ml HiTrap CM Sepharose (Amersham Biosciences), equilibrada en 50 mM acetato de sodio, 100 mM NaCl, pH 5.0. Después de la carga la columna se lavó con 5 CV bajo condiciones de regulador de pH para equilibrio y IFN se eluyó utilizando un gradiente 20 CV a partir de 100-650 mM NaCl. Las fracciones pico que contenían IFN se agruparon basándose en la absorbancia a 280 nm.

20

282

281

El agrupamiento de CM Sepharose se ajustó a 20 mM con 1,3 diaminopropana utilizando una solución de almacenamiento 2 M 1,3 diaminopropano para establecer el pH a 10. La muestra se cargó a 200 cm/h sobre una columna de flujo rápido de 5 ml HiTrap Q Sepharose (Amersham Biosciences), equilibrada en 50 mM de 1,3 diaminopropano, 100 mM NaCl, pH 10.0. Después de la carga la columna se lavó con 5 CV de regulador de pH bajo condiciones de equilibrio y IFN se eluyó utilizando un gradiente 20 CV a partir de 100-650 mM NaCl o a partir de 100-1000 mM NaCl. Las fracciones que contenían IFN se agruparon basándose en la absorbancia a 280 nm y se dializaron inmediatamente en contra de 250-500 volúmenes de 50 mM acetato de sodio, 150 mM NaCl, pH 5.0 o 50mM borato de sodio, pH 9.0. Después de la diálisis las muestras de IFN se esterilizaron mediante filtración utilizando un filtro 0.2 μ M en un gabinete de bioseguridad, la concentración se midió mediante la absorbancia a 280 nm y las muestras se almacenaron a 2-8°C por periodos de hasta una semana o en alícuotas a -80°C para un almacenamiento extendido. Para los ensayos de actividad la muestra generalmente se formuló en 0.5% BSA, PBS pH 7.4 a 5, 20 y 50 ug/ml, y se almacenaron congeladas en alícuotas a -80°C.

4b. Purificación

Método 2:

El 14epi 18 replegado se purificó utilizando dos pasos cromatográficos. La solución de replegamiento se ajustó a pH 8.0 y alrededor de 190 mS/cm con KCl, se filtró a través de un filtro 5 m y se cargó a 75 cm/h sobre una columna para cromatografía de interacción hidrófoba de flujo rápido de Butil-Sepharose (HIC) (General Electric

283

282

Healthcare) equilibrada en regulador de pH para equilibrio que consiste de 2.0 M KCl, 20 mM K₂HPO₄, 0.8 M arginina, pH 8.0. La columna HIC se lavó con 5 volúmenes de columna (CV) de 2.0 M KCl, 20 mM K₂HPO₄, 0.8 M arginina pH 8.0. 14epi18 se eluyó con 0.4 M KCl, 20 mM K₂HPO₄, pH 8.0. La elución se monitoreó mediante CLAR en fase reversa.

En eluido se diluyó con agua destilada hasta una conductividad de alrededor de 3 mS/cm. El pH se ajustó a 6.8. Este agrupamiento ajustado se cargó a 50 cm/h sobre una columna de flujo rápido de Q-Sepharose (GE Healthcare) equilibrada en 25 mM acetato de amonio pH 6.8. Después de la carga, la columna se lavó con regulador de pH para equilibrio. 14epi18 se eluyó con un gradiente lineal a pH 4.0. Las fracciones pico que contenían el 14epi 18 plegado se agruparon basándose en la CLAR analítica en fase reversa.

4c. Purificación

Método 3:

25epi19 replegado se purificó utilizando dos pasos cromatográficos. La solución para replegamiento se ajustó a 1.3 M NaCl y la solución se filtró sobre una combinación de dos filtros (0.8/0.3 µm seguido por 0.45/0.2 µm). La proteína se cargó sobre una columna de flujo rápido de Butil Sepharose (General Electric Healthcare) equilibrada con regulador de pH para equilibrio (0.8 M arginina, 1.3 M cloruro de sodio, 50 mM fosfato de potasio pH 8.0) a 50 - 150 cm/h. Después de la aplicación de la muestra, la columna se lavó con 3 CV de regulador de pH para equilibrio y 3 CV de regulador de pH para lavado (20 mM fosfato de potasio, 2 M cloruro de sodio pH 7.5). El paso de elución

284

283

se llevó a cabo mediante la aplicación de regulador de pH para elución (20 mM fosfato de potasio, pH 7.5) con un flujo de 50 - 100 cm/h. Los picos se agruparon conformidad con la medición de UV280.

Después de asegurar que la conductividad estaba por debajo de 10 mS/cm, el agrupamiento se cargó a 50 - 75 cm/h sobre una columna de flujo rápido de Q-Sepharose (GE Healthcare) equilibrada en 30 mM acetato de amonio, pH 5.9. Después de la carga, la columna se lavó con regulador de pH para equilibrio hasta que se alcanzó la línea basal (UV280). 25epi19 se eluyó con un gradiente lineal a pH 3.5. Las fracciones pico que contenían el plegado 25epi19 se agruparon de conformidad con CLAR analítica en fase reversa y SDS-PAGE.

III. Ensayos de actividad

A1. Ensayo Antiviral de HuH7-EMCV

A continuación se proveen un ensayo ejemplar para actividad antiviral de polipéptidos de interferón-alfa y conjugados de la invención. El ensayo es un ensayo de respuesta a la dosis basado en célula utilizando para evaluar la potencia anti-viral de un fármaco, y algunas veces se refiere como un ensayo de "protección a partir de un efecto citopático" (o PCPE), también denominado ensayo de inhibición de efecto citopático (CPE). Brevemente, las células incubaron con el fármaco y se expusieron al virus. En la ausencia del fármaco, las células que se expusieron al virus murieron. Con concentración en incremento del fármaco, sobrevive una proporción en incremento de células. El número de células que sobreviven se puede medir directamente (por ejemplo, mediante conteo visual) o indirectamente mediante la estimación de la velocidad metabólica. Por

285

ejemplo, los colorantes metabólicos tales como MTT o WST-1 se pueden utilizar como una medición indirecta de la supervivencia. Las células vivas metabolizan dichos colorantes para formar productos metabólicos los cuales se pueden cuantificar mediante espectrometría (densidad óptica).

5

Materiales y reactivos:

Células HuH7: línea celular de hepatoma de humano (obtenida a partir de Dr. Michael Lai, USC- Surgery Department, Los Angeles, CA). La línea celular también se puede obtener a partir del banco de células de la Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB)/ Health Science Research Resources Bank (HSRRB), Osaka, Japón. La línea celular HuH7 originalmente se estableció en el laboratorio del Dr. J. Sato (universidad de Okayama Escuela de medicina) a partir de un japonés de 57 años de edad con un carcinoma hepatocelular bien diferenciado (Nakabayashi, H., et al. (1982) Cancer Res. 42 (9): 3858-63). La línea celular negativa para el antígeno de superficie de la Hepatitis B.

10

15

Células VERO: línea celular del riñón de mono verde de África (ATCC # CCL-81). La línea celular se derivó en 1962 en Chiba University en Chiba, Japón a partir del riñón de un mono verde adulto africano normal. El pasaje # 93 de la línea celular VERO se transfirió al the National Institute de Health (NIH) en 1964.

20

Virus de la encefalomiocarditis (EMCV): cepa adaptada al cultivo de tejidos (ATCC # VR- 129B). Una cepa del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) adaptada al cultivo de tejidos se obtuvo a partir de la ATCC (# VR-129B). Para los ensayos antivirales a HuH7, se produjo una solución de almacenamiento con alta titulación viral en células

Vero de riñón de mono verde de África. El título viral de la solución de almacenamiento de EMCB producida en Vero se determinó mediante un ensayo en placa en las células L929 como de 1.1×10^6 PFU/ml.

5

DMEM completo:

Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco Cat. No. 11965-092)

10% suero de bovino fetal (FBS, Hyclone Cat. No. SH30071.03)

1 x penicilina-estreptomicina (PS, Gibco Cat. No. 15140-122)

DMEM reducido en suero:

10

Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco Cat. No. 11965-092)

2% suero de bovino fetal (FBS, Hyclone Cat. No. SH30071.03)

1 x penicilina-estreptomicina (PS, Gibco Cat. No. 15140-122)

Tripsina/EDTA (Gibco Cat. No. 25300-054)

WST-1 (Roche; Cat. No.1 644 807)

15

Las células HuH7 se mantuvieron en DMEM completo a 37°C en una incubadora humidificada al 5% de CO₂. Las células se cosecharon con tripsina y se dividieron dos veces semanalmente cuando la confluencia alcanzaba una densidad final de $1-2 \times 10^6$ células por 25 ml en una botella T175. Un día antes del ensayo, las células se tripsinizaron y se sembraron en botellas T175 nuevas a una densidad de 4.5×10^6 células por 25 ml para asegurar que las células se encontraban en fase log antes del ensayo.

20

Procedimiento de ensayo antiviral con HuH7-EMCV:

Una solución de almacenamiento con un alto título de virus EMCV se amplificó en células VERO. La concentración letal a la cual 95% de las células eran eliminadas (LC95) se determinó mediante una curva de eliminación viral EMCV en monocapas de células HuH7. Brevemente, las células HuH7 se sembraron en día uno en placas para microtitulación de 96 pozos a 6×10^4 células por pozo. El virus se eluyó de manera serial 1: 3 en DMEM+ 2% FBS con 10 puntos de dilución y se añadió a las células en el día dos. Veinticuatro horas después de la infección, la supervivencia de células se determinó mediante un ensayo de metabolismo con sal de tetrazolio, WST-1 (Roche). La LC95 determinada para el ensayo HuH7-EMCV corresponde a una MOI de 0.034 (PFU/célula). El título de la solución de almacenamiento de virus se determinó mediante un ensayo estándar en placa en células L929.

Al día uno del ensayo, las células HuH7 en fase log se cosecharon con tripsina, se resuspendieron en medio DMEM reducido en suero y se concentraron mediante centrifugación. Los concentrados celulares, que corresponden a 5 botellas T175 de células, se resuspendieron en 10 ml de medio DMEM reducido en suero, se filtraron a través de un colador celular de nylon de 40 micras y se contaron en un hemocitómetro. La viabilidad celular se determinó mediante exclusión de azul tripán. Las células se resuspendieron en medio DMEM reducido en suero hasta una densidad final de 6×10^5 células/ml. Un ciento de microlitros de las células diluidas se añadieron a cada pozo de una placa para el ensayo de 96 pozos (6×10^4 células/pozo) y las placas se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ por 4 horas.

Las potencias de "referencia" de los interferones alfa y polipéptidos de interferón-alfa de la invención (también denominadas "muestras prueba") se determinaron mediante análisis de dosis respuesta. Generalmente se presentó una muestra de prueba y un IFN-alfa de referencia por placa, cada una con tres replicados de las curvas de células probadas con EMCV tratadas con IFN-alfa y tres replicados de las curvas de tratamiento sólo con IFN-alfa. Este último se ensayó para controlar los efectos antiproliferativos potenciales del IFN-alfa sobre las células HuH7. Las curvas de dosis respuesta para los IFN-alfa de referencia generalmente consistieron de 8 diluciones de tres veces que tenían un intervalo de 100 ng/ml a 0.05 ng/ml. para las muestras prueba de IFN-alfa, las diluciones de tres-veces generalmente tuvieron un intervalo de 5 ng/ml a 0.002 ng/ml. Ocho pozos cada uno de células tratadas con el virus pero no con IFN-alfa y células solas también se llevaron a cabo como controles.

Las diluciones de IFN-alfa se prepararon utilizando medio DMEM reducido en suero. Un ciento de microlitros de la preparación diluida de IFN-alfa se transfirieron a las placas de ensayo. Las placas de ensayo se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ por 16 horas.

Al día dos, las células se probaron con el virus EMC. El medio se aspiró a partir de cada pozo de la placa de ensayo. La solución de almacenamiento de EMCV se diluyó 1: 5400 en DMEM + 2%FBS. Inicialmente se sembró un ciento de microlitros del virus diluido, que corresponde a 0.034 partículas virales por célula, se añadió a cada pozo. Las células se incubaron con el virus a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ por 24 horas.

Al día tres, se cuantificó el número de células viables en cada pozo mediante el ensayo WST-1. El medio se aspiró a partir de cada pozo de la placa de ensayo. El reactivo WST-1 se diluyó 1:20 en medio DMEM reducido en suero, 100 µl del reactivo WST-1 diluido se añadieron a cada pozo y las células se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ por 60 minutos. Se cuantificó el número de células viables en cada pozo mediante la medición de la DO a 450 nm en un lector de placas.

Análisis:

La potencia antiviral del IFN-alfa de referencia y las muestras prueba se calcularon con la ecuación:

$$\text{potencia antiviral} = \frac{(\text{células viables}_{C+I+V} - \text{células viables}_{C+V})}{(\text{células viables}_{C+I} - \text{células viables}_{C+V})} * 100\%$$

en donde C+V= células HuH7 +EMCV, C+I= células HuH7 +IFN-α, y

$$C+I+V = \text{células HuH7} + \text{IFN-}\alpha + \text{EMCV}$$

Las curvas dosis respuesta se analizaron mediante regresión no lineal utilizando GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc.) la siguiente ecuación se utilizó para ajustar la curva:

$$Y = \text{Parte inferior} + \frac{(\text{Parte superior} - \text{Parte inferior})}{1 + 10^{(\text{LogEC50} - X) \cdot \text{Hill pendiente}}}$$

Parte inferior es el valor Y en la meseta de la parte inferior; parte superior es el valor Y en la meseta de la parte superior, y LogEC50 es el valor X cuando la respuesta

es la mitad entre la parte inferior y la parte superior. El método de Levenberg-Marquardt se utilizó como un algoritmo de optimización.

A2. Ensayos antivirales en HeLa-EMCV y WISH-EMCV

5 La inhibición del efecto citopático de EMCV sobre las células HeLa (una línea celular derivada de carcinoma cervical de humano) y WISH (una línea celular derivada del tejido de amnios de humano) también proveen ensayos sustitutos útiles para evaluar las potencias antivirales de polipéptidos y conjugados del interferón alfa de la invención. Estos ensayos se llevaron a cabo de manera similar al ensayo de HuH7-EMCV
10 anteriormente descrito, con las siguientes modificaciones.

Materiales y reactivos:

 Células HeLa: línea celular de carcinoma cervical de humano (ATCC # CCL-2). La línea celular HeLa se derivó a partir de un adenocarcinoma cervical a partir de una
15 mujer de 35 años de edad. Se ha reportado que las células HeLa contienen secuencias del virus del papiloma de humano (HPV-18). La línea celular se recibió a partir de la ATCC en el pasaje número 107.

 Células WISH: línea celular epitelial de humano (ATCC # CCL-25). La línea celular WISH se estableció a partir de colonias alteradas que aparecieron en un
20 subcultivo de células primarias de amnios de humano después de 35 días en cultivo. La línea celular WISH contiene los cromosomas marcadores de HeLa. Las células se recibieron a partir de la ATCC en el pasaje # 170.

Células L-929: línea celular de fibroblasto de murino (ATCC # CCL-1). La línea celular L-929 es una clona de célula particular aislada a partir del 95º pasaje de la cepa parental, cepa L, en 1948. La cepa L se aisló a partir de los tejidos subcutáneos areolares y adiposos de un ratón C[3]H/An normal de 100 días de edad.

- 5
- EMCV: cepa adaptada a cultivo celular (ATCC # VR-129B). Una cepa adaptada a cultivo celular del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) se obtuvo partir de la ATCC (# VR-129B). Para los ensayos antivirales con HeLa y WISH, la solución de almacenamiento con alto título de EMCV se produjo en las células L929. El título viral de la solución de almacenamiento viral producida en L929 fue de 4.0×10^8 PFU/ml basándose en los resultados de un ensayo de placa en las células L929.
- 10

MEM completo:

Medio esencial mínimo (MEM, Gibco Cat. No.10370-021)

10% suero de bovino fetal (FBS, Hyclone Cat. No. SH30071.03) 1x

- 15
- penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG, Gibco Cat. No. 10378-016)

Piruvato de sodio 1mM (Gibco Cat. No. #11360-070)

MEM reducido en suero:

Medio esencial mínimo (MEM, Gibco Cat. No. 10370-021)

2% suero de bovino fetal (FBS, Hyclone Cat. No. SH30071.03)

- 20
- 1x penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG, Gibco Cat. No. 10378-016)

Piruvato de sodio 1mM (Gibco Cat. No. #11360-070)

Las células HeLa se mantuvieron en MEM completo a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO2. Las células se cosecharon con tripsina y se

291

dividieron dos veces semanalmente cuando la confluencia alcanzaba una densidad final de $2-4 \times 10^6$ células por 25 ml en una botella de T175. Un día antes del ensayo, las células se tripsinizaron y de sembraron en botellas nuevas T175 a una densidad de 6×10^6 células por 25 ml para asegurar que las células se encontraban en fase log antes del ensayo.

Las células WISH se mantuvieron en MEM completo a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO_2 . Las células se cosecharon con tripsina y se dividieron dos veces semanalmente cuando la confluencia alcanzaba una densidad final de $5-6 \times 10^6$ células por 25 ml en una botella de T175. Un día antes del ensayo, las células se tripsinizaron y de sembraron en botellas nuevas de T175 a una densidad de 10×10^6 células por 25 ml para asegurar que las células se encontraban en fase log antes del ensayo.

Procedimiento de ensayos antiviral en HeLa-EMCV:

En el día uno del ensayo, las células HeLa en fase log se cosecharon con tripsina, resuspendieron en MEM reducido en suero y se concentraron mediante centrifugación. Los concentrados celulares, que corresponden a 5 botellas T175 de células, se resuspendieron en 10 ml de MEM reducido en suero, se filtraron a través de un colador celular de nylon de 40 micras y se contaron en un contador Coulter. La viabilidad celular se determinó mediante exclusión de azul tripán con un hemocitómetro. Las células se resuspendieron en MEM reducido en suero hasta una densidad final de 1×10^5 células/ml. Un ciento de microlitros de las células diluidas se añadieron a cada

293

pozo de una placa para el ensayo de 96 pozos (1×10^4 células/pozo) y las placas se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO_2 por 24 horas.

Las potencias de los interferones alfa y polipéptidos de interferón-alfa de "referencia" de la invención (también denominados "compuestos prueba") se determinaron mediante análisis de dosis respuesta. Generalmente se presentó una muestra prueba y un IFN-alfa de referencia por placa, cada uno con tres replicados de curvas de células probadas con EMCV tratadas con IFN-alfa y dos replicados de curvas de tratamiento sólo con IFN-alfa. La última se ensayó para controlar los efectos antiproliferativos potenciales del IFN-alfa sobre las células HeLa. Las curvas de dosis respuesta para los IFN-alfa de referencia generalmente consistieron de 8 diluciones de cinco veces que tenían un intervalo de 60 ng/ml a 0.0008 ng/ml. para las muestras prueba de IFN-alfa, las diluciones de cinco veces generalmente tuvieron un intervalo de 5 ng/ml a 0.00006 ng/ml. También se procesaron como controles ocho pozos cada uno con células tratadas con el virus pero sin IFN-alfa y con células solas.

Las diluciones de IFN-alfa se prepararon utilizando MEM reducido en suero. Un ciento de microlitros de las preparaciones diluidas de IFN-alfa se transfirieron a las placas de ensayo. Las placas de ensayo se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO_2 por 16 horas.

Al día tres, las células se probaron con virus EMC. El medio se aspiró a partir de cada pozo de la placa de ensayo. La solución de almacenamiento de EMCV se diluyó 1: 133 en MEM + 2%FBS. Un ciento de microlitros del virus diluido, que corresponde a 3×10^5 partículas vitales se añadieron a cada pozo. Las células se

incubaron con el virus a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ por 24 horas.

Al día cuatro, se cuantificó el número de células viables en cada pozo mediante el ensayo WST-1. El medio se aspiró a partir de cada pozo de la placa de ensayo. El reactivo WST-1 se diluyó 1: 20 en MEM reducido en suero, 100 µl del reactivo WST-1 diluido se añadieron a cada pozo y las células se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ por 60 minutos. Se cuantificó el número de células viables en cada pozo mediante la medición de la DO a 450 nm en un lector de placas.

10

Procedimiento de ensayo antiviral con WISH-EMCV:

En el día uno del ensayo, las células WISH en fase log se cosecharon con tripsina, resuspendieron en MEM reducido en suero y se concentraron mediante centrifugación. Los concentrados celulares, que correspondían a cinco botellas de T175 de células, se resuspendieron en 10 ml de MEM reducido en suero, se filtraron a través de un colador delular de nylon de 40 micras y se contaron en un contador Coulter. La viabilidad celular se determinó mediante exclusión de azul tripán con un hemocitómetro. Las células se resuspendieron en MEM reducido en suero hasta una densidad final de 3×10^5 células/ml. Un ciento de microlitros de las células diluidas se añadieron a cada pozo de una placa para el ensayo de 96 pozos (3×10^4 células/pozo) y las placas se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ por 4 horas.

Las potencias de los interferones alfa y polipéptidos de interferón-alfa de "referencia" de la invención (también denominadas "muestras de prueba") se

determinaron mediante análisis de dosis respuesta. Generalmente se presentó una muestra prueba y un IFN-alfa de referencia por placa, cada uno con tres replicados de curvas de células probadas con EMCV tratadas con IFN-alfa y dos replicados de curvas de tratamiento sólo con IFN-alfa. Este último se ensayo para controlar los efectos antiproliferativos potenciales del IFN-alfa sobre las células HeLa. Las curvas dosis respuesta para los IFN-alfa de referencia generalmente consistieron de 8 diluciones de diez veces que tenían un intervalo de 100 ng/ml a 0.0001 ng/ml. Para las muestras prueba de IFN-alfa, las diluciones de cinco veces generalmente tuvieron un intervalo de 5 ng/ml a 0.00006 ng/ml. Y también se procesaron como controles ocho pozos cada uno de células tratadas con el virus pero sin IFN-alfa y células solas.

Las diluciones de IFN-alfa se prepararon utilizando MEM reducido en suero. Un ciento de microlitros de las preparaciones diluidas de IFN-alfa se transfirieron a las placas de ensayo. Las placas de ensayo se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ por 16 horas.

Al día dos, las células se probaron con el virus EMC. El medio se aspiró a partir de cada pozo de la placa de ensayo. La solución de almacenamiento de EMCV se diluyó 1: 267 en MEM + 2%FBS. Un ciento de microlitros del virus diluído, que corresponde a una MOI de aproximadamente 5 se añadió a cada pozo. Las células se incubaron con el virus a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ por 24 horas.

Al día tres, se cuantificó el número de células viables en cada pozo mediante el ensayo WST-1. El medio se aspiró a partir de cada pozo de la placa de ensayo. El reactivo WST-1 se diluyó 1: 20 en MEM reducido en suero, 100 ul del reactivo

295

WST-1 diluido se añadieron a cada pozo y las células se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ por 60 minutos. Se cuantificó el número de células viables en cada pozo mediante la medición de la DO a 450 nm en un lector de placas.

5

B. ensayo de diferenciación TH1

A continuación se provee un ensayo ejemplar para la actividad de diferenciación TH1 de polipéptidos y conjugados de interferón- alfa de la invención.

Procedimiento de ensayo:

10 Las cubiertas amarillas del humano (25-30 ml) que contenían leucocitos y eritrocitos preparados a partir de 500 ml de sangre se recolectaron a partir el Stanford Blood Bank el día de inicio del ensayo (un día antes del día de ensayo) y manteniendo una temperatura ambiente durante toda la noche. Cada cubierta amarilla se transfirió cuidadosamente a una botella de T75 y se diluyó a 100 ml con PBS. Para cada cubierta
15 amarilla, se pipetearon 13 ml de Histopaque/Ficoll (Sigma H8889) dentro de cuatro tubos para centrifuga de 50 ml, y 25 ml de la muestra de sangre diluida se colocó cuidadosamente en la parte superior del Histopaque/Ficoll sin alterar la interfaz. Luego los tubos se centrifugaron (20°C, 2500 rpm) por 20 minutos utilizando pipetas de plástico para transferencia de 3 ml, la capa de células mononucleares que contenía PBMCs se
20 transfirió a dos tubos únicos de 50 ml (células a partir de 2 tubos con Histopaque/Ficoll/cubierta amarilla hacia un tubo). Luego las PBMCs se diluyeron a 50 ml/tubo con PBS y se centrifugaron (20°C, 1000 rpm) por 10 minutos para remover las plaquetas. Después de la remoción del PBS, las PBMCs y las RBCs remanentes se

297

mezclaron para prevenir la agregación. Se añadieron diez mililitros de regulador de pH para lisis RBC (regulador de pH de cloruro de amonio) y dos tubos de células se combinaron en un tubo. Cada tubo, ahora contenían las PBMC totales y el aislado de RBC a partir de un donante, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Los coágulos potenciales de células sanguíneas se removieron mediante la filtración de las células con un colador celular (70 μ m, Falcon Cat. No. 2350). PBS se añadió a un volumen final de 50 ml seguido por centrifugación (20°C, 1000 rpm) por 10 minutos. El número celular finalmente se contó utilizando un hemocitómetro.

A continuación, una fracción de cada preparación de PBMC se preteñió y se analizó mediante FACS para seleccionar las preparaciones de PBMC con un porcentaje de células TH0 sin afección por arriba de 15%. Trescientos microlitros de PBMCs se tiñeron con 20 μ l de CD45RA anti-humano conjugado a FITC (Pharmigen, Cat. No. 555488), 20 μ l de CD4 anti-humano conjugado a Cy-chrome (Pharmigen, Cat. No. 555348), 5 μ l de CD8 anti-humano conjugado a PE (Pharmigen, Cat. No. 555367), 5 μ l de CD14 anti-humano conjugado a PE (Pharmigen, Cat. No. 555398), y 5 μ l de CD20 anti-humano conjugado a PE (Pharmigen, Cat. No. 555623), y se incubaron y hielo por 45 minutos. Las células se lavaron con PBS, se suspendieron en 1 ml de PBS, y se filtraron con un colador celular de 40 μ m (Falcon, Cat. No. 2340). El porcentaje de las células TH0 sin afección (positivas a CD4 y CD45RA y negativas a CD8, CD 14, CD20) se cuantificó mediante FACS, y las preparaciones de PBMC con más de 15% de células TH0 sin afección se seleccionaron a para el ensayo.

Las preparaciones seleccionadas de PBMC se tiñeron con 500 μ l de CD45RA anti-humano conjugado a FITC, 500 μ l de CD4 anti-humano conjugado a Cy-

297

chrome, 200 μ l de CD8 anti-humano conjugado a PE, 50 μ l de CD14 anti-humano conjugado a PE, y 50 μ l CD20 de anti-humano conjugado a PE, y se incubaron sobre hielo por 60 minutos. Las células se lavaron con PBS, PI se añadió, y las células se diluyeron con 10 ml de PBS seguido por filtración con un colador celular de 40 μ m. Las células se clasificaron mediante FACS, y 1×10^4 células TH0 sin afección (positivas a CD4 y CD45RA y negativas a CD8, CD14, CD20) se transfirieron mediante MOFLO dentro de cada pozo de la placa con 96 pozos de fondo redondo, que contenían 160 μ l de DMEM plus penicilina-estreptomicina más 2 mM glutamina y 10% suero de bovino fetal (Hyclone Cat. No. SH30071.03).

10

Para cada punto se añadieron siete microlitros de extensor de células T CD3/CD28 Dynabeads (Dyna, Cat. No. 111.32) a cada pozo. El efecto estimulante de los Dynabeads se calibró antes del experimento para evitar la variación de lote a lote. A continuación, se añadieron 20 μ l/pozo de muestras de proteínas a las placas de ensayo. Generalmente, la concentración tuvo un intervalo para los estándares de IL-4 y IL-12 (obtenidos a partir de R&D Systems) que fueron de 0.04 pg/ml a 10 ng/ml, y las concentraciones tuvieron un intervalo para las muestras prueba de IFN-alfa y la muestra de referencia de IFN-alfa fueron de 0.76 pg/ml a 200 ng/ml.

15

20

Las células se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ por 6 días. Los sobrenadantes a partir de cada pozo se cosecharon para determinar el grado de diferenciación por TH 1 a través de la cuantificación del contenido de IFN- γ , utilizando un ELISA estándar (R&D Systems, Cat. # DIF50).

Análisis:

299

Respuesta = concentraciones de IFN-γ en pg/ml.

La siguiente ecuación se utilizó para el ajuste de la curva:

5

$$Y = \text{Parte inferior} + \frac{(\text{Parte superior} - \text{Parte inferior})}{1 + 10^{(\text{LogEC50}-X) \cdot \text{Hill pendiente}}}$$

La variable parte inferior es el valor Y en la meseta de la parte inferior; parte superior es el valor Y en la meseta de la parte superior, y LogEC50 es el valor X cuando la respuesta es la mitad entre la parte inferior y la parte superior. El método de Levenberg-Marquardt se utilizó como un algoritmo de optimización.

C. ensayos de antiproliferación Daudi

A continuación se provee un ensayo ejemplar para la actividad antiproliferativa de los polipéptidos y conjugados del interferón-alfa de la invención.

Materiales:

Células Daudi: células de linfoma de Burkitt de humano (ATCC Number: # CCL-213). La línea Daudi se derivó a partir de un hombre de color de 16 años de edad con linfoma de Burkitten 1967.

La línea celular es positiva para el virus Epstein-Barr.

RPMI completo:

RPMI 1640 (RPMI, Gibco Cat. No. 11875-143)

299

10% suero de bovino fetal (FBS, Hyclone Cat. No. SH30071.03) 1x penicilina-estreptomicina-glutatimina (PSG, Gibco Cat. No. 10378-01

Las células Daudi de linfoma de Burkitt que crecieron en suspensión se mantuvieron en botellas para cultivo de tejidos de T175, que contenían 50 ml de RPMI 5 completo a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Las células se dividieron 1: 10 cuando estaban confluentes.

Procedimiento de ensayo:

10 Las células Daudi se centrifugaron y se lavaron con 1xPBS. El número celular se ajustó a 10⁵ células/ml. Se añadieron 80 ul de medio de cultivo a cada pozo en placas para ensayo de 96 pozos con fondo redondo seguido por la transferencia de 100 ul de células (10⁴ células/pozo) a cada pozo.

Se prepararon 11 diluciones del material de referencia de IFN-alfa y de las muestras prueba de IFN-alfa, con un intervalo de 200 ng/ml a 0.2 ug/ml (diluciones de 4- 15 veces), en placas para dilución utilizando medio de cultivo. Veinte ul de las preparaciones de IFN-alfa diluidas se transfirieron a las placas para ensayo.

Las células se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Después de 48 horas, se añadió 1 uCi de metil-3H timidina (Amersham Pharmacia, Cat. No. TRK758) a cada pozo seguido por la incubación por 24 horas a 37°C en una 20 incubadora humidificada con 5% de CO₂. Las células se cosecharon al siguiente día y se determinó la incorporación de timidina.

Alternativamente, el ensayo de antiproliferación Daudi se puede llevar a cabo mediante la medición del número de células Daudi viables, metabólicamente activas

301

basado en la cantidad de ATP presente en un cultivo después del tratamiento con interferón. En este procedimiento, las células 8000 se sembraron en un volumen de 50 ul en una placa para ensayo de 96 pozos con fondo redondo. Las células se dejaron incubar a 37°C por 2 horas en una incubadora con 5% de CO₂ antes de la adición de las diluciones del interferón. Los interferones se diluyeron 6-veces (9-puntos) generalmente iniciando a partir de 5-10 ng/ml. Después de la adición de los interferones, las células se incubaron por 72 horas a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Se determinó el número de células viables en cada pozo mediante la adición de 100 ul de CellTiter-Glo™ (Promega, Cat #G7572). Las células más el reactivo CellTiter-Glo™ se mezclaron por 2 minutos y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad por 30-60 minutos. Se determinó la cantidad de señal luminiscente para cada pozo utilizando un aparato Analyst HT.

Análisis:

La EC₅₀ del IFN-alfa de referencia y de las muestras se calculó utilizando la ecuación:

$$Y = \text{Parte inferior} + \frac{(\text{Parte superior} - \text{Parte inferior})}{1 + 10^{(\text{LogEC}_{50} - X) \cdot \text{Hill pendiente}}}$$

en donde la parte inferior es el valor Y en la parte inferior de la meseta; parte superior es el valor Y en la parte superior de la meseta, y LogEC₅₀ es el valor X en

donde la respuesta de la mitad entre la parte inferior y la parte superior. El método de Levenberg-Marquardt se utilizó como un algoritmo de optimización.

EJEMPLO 1

5 determinación de los residuos accesibles en la superficie de los interferones-alfa

Exposición en la superficie de los residuos de linterferón- α 2a de humano:

Basándose en las estructuras de 24 RMN del interferón-alfa 2a de humano reportadas por Klaus et al., J. Mol. Biol., 274: 661-675 (1997), se calculó la ASA fraccional de las cadenas laterales. La numeración de la secuencia utilizada continuación se basa en la secuencia madura de la proteína del interferón-alfa 2a de humano (identificada en la presente invención como SEQ ID NO: 47). Se debe mencionar que esta estructura contiene dos enlaces disulfuro de implican a Cys1-Cys98 y Cys29-Cys 138, respectivamente. Mediante el registro de la ASA y la ASA fraccional y tomando el promedio de las 24 estructuras, enfocándose en la ASA de las cadenas laterales, se determinó que los siguientes residuos tienen más de 25% de ASA fraccional: D2, L3, P4, Q5, T6, H7, S8, L9, G10, R12, R13, M16, A19, Q20, R22, K23, 124, S25, L26, F27, S28, L30, K31, R33, H34, D35, G37, Q40, E41, E42, G44, N45, Q46, Q48, K49, A50, E51, E58, Q61, Q62, N65, S68, T69, K70, D71, S73, A74, D77, E78, T79, L80, D82, K83, T86, Y89, Q90, N93, D94, E96, A97, V99, I100, Q101, G102, V103, G104, T106, E107, T108, P109, L110, M111, K112, E113, D114, L117, R120, K121, Q124, R125, T127, L128, K131, E132, K133, K134, Y135, S136, P137, C138, A145, M148, R149, S152, L153, N156, Q158, E159, S160, L161, R162, S163, K164 y E165, con numeración de la

392

posición en relación con aquella de la secuencia del interferón-alfa 2a identificada en la presente invención como SEQ ID NO: 47.

Se determinó que los siguientes residuos tienen en promedio más del 50% de ASA fraccional de sus cadenas laterales: D2, L3, P4, Q5, T6, H7, S8, L9, R12, R13, M16, A19, S25, F27, S28, K31, R33, H34, D35, G37, E41, G44, N45, Q46, Q48, K49, N65, K70, A74, D77, E78, T79, D82, K83, T86, Y89, Q90, N93, D94, I100, Q101, G102, G104, T106, E107, T108, P109, L110, E113, D114, L117, R120, K121, Q124, R125, L128, K131, E132, K134, P137, R149, E159, L161, R162, S163, K164 y E165, con numeración de la posición en relación con aquella secuencia del interferón-alfa 2a identificada en la presente invención como SEQ ID NO: 47.

Exposición a la superficie de los residuos que corresponden a SEQ ID NO:

1:

Con respecto a una inserción de un aminoácido después de la posición 44 de los subtipos del interferón alfa 2 de humano- tal como, por ejemplo, interferón-alfa 2b (SEQ ID NO: 46) e interferón-alfa 2a (SEQ ID NO: 47) – en muchas secuencias de interferón alfa, incluyendo todas las secuencias del interferón alfa conocido de humano (aparte de los subtipos IFN-alfa 2) y ciertos polipéptidos de la invención, la numeración de la posición de los residuos expuestos a la superficie se cambiará por un residuo después del número de la posición 44 en, por ejemplo, las secuencias mostradas en el alineamiento de la figura 2, en relación con el número de la secuencia denostada hIFNalfa 2b (SEQ ID NO: 46).

394

Basándose en el análisis anteriormente mencionado, se considera que las siguientes posiciones, numeradas en relación con SEQ ID NO: 1, contienen residuos de aminoácidos que tienen más de 25% de ASA fraccional: posiciones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 33, 34, 35, 37, 40, 41, 42, 44, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 59, 62, 63, 66, 69, 70, 71, 72, 74, 75, 78, 79, 80, 81, 83, 84, 87, 90, 91, 94, 95, 97, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 118, 121, 122, 125, 126, 128, 129, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 146, 149, 150, 153, 154, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, y 166.

De manera similar, se considera que las siguientes posiciones, de nuevo numeradas en relación con SEQ ID NO: 1, contienen residuos de aminoácidos que tienen en promedio más de 50% de ASA fraccional de su cadena lateral: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 16, 19, 25, 27, 28, 31, 33, 34, 35, 37, 41, 44, 46, 47, 49, 50, 66, 71, 75, 78, 79, 80, 83, 84, 87, 90, 91, 94, 95, 101, 102, 103, 105, 107, 108, 109, 110, 111, 114, 115, 118, 121, 122, 125, 126, 129, 132, 133, 135, 138, 150, 160, 162, 163, 164, 165, y 166.

EJEMPLO 2

Actividades antivirales de polipéptidos del Interferón-alfa

Los pacientes con infección crónica por HCV tienen cargas virales iniciales en el intervalo de 10^4 - 10^7 copias de ARN de HCV/ml. después del tratamiento con IFN-alfa, la carga viral característicamente produce dos fases log-lineal distintas de declinación reflejando dos mecanismos distintos (figura 1B). La caída inicial en la carga viral se presenta en aproximadamente los primeros dos días y se cree que se debe a la

reducción de la velocidad de la producción del virus por las células hepáticas infectadas en respuesta a la terapia con IFN-alfa.

La mayor carrera técnica con HCV es que el virus no puede crecer in vitro y solamente ha sido recientemente cultivado en modelos animales. Sin embargo, existen virus que se replican in vitro que se consideran sustitutos útiles para la replicación viral de HCV. Se cree que los ensayos in vitro sustitutos pronostican la actividad antiviral in vivo de HCV incluyendo los ensayos descritos en la sección de materiales y métodos anteriormente mencionada, la cual mide la capacidad de las moléculas prueba para proteger a la células a partir del efecto citopático (CPE) de la infección viral, utilizando virus de la encefalomiocarditis (EMCV) en las líneas celulares HuH7 de humano (derivadas de hepatoma), HeLa (derivadas de carcinoma cervical) y WISH (derivadas de tejido amniótico).

El cuadro 7 a continuación provee actividades antivirales relativas de diversos polipéptidos IFN-alfa en ensayos representativos de CPE que se llevaron a cabo como se describe en la sección de materiales y métodos anteriormente mencionada. Las diferencias significativas en la actividad se determinaron mediante ANOVA de dos vías (factores: muestra, experimento) ($\alpha = 0.05$) seguido por una prueba post-hoc de Bonferroni para las comparaciones medias ($\alpha = 0.05$) o una prueba post-hoc de Fisher. El símbolo (+/-) indica actividad antiviral la cual no se puede distinguir estadísticamente a partir del interferón de referencia; ND, no determinada.

305

CUADR 7

Nombre de la muestra	SEQ ID NO	HuH7/EMCV Actividad antiviral relativa a huIFN-alfa 2b	HeLa/ EMCV Actividad antiviral relativa a huIFN-alfa 2b
B9X14EC4	SEQ ID NO: 1	> 8x	> 8x
14EP115	SEQ ID NO: 10	> 8x	> 8x
14EP116	SEQ ID NO: 11	> 8x	> 8x
14EP117	SEQ ID NO: 12	> 8x	> 8x
14EP118	SEQ ID NO: 13	> 8x	> 8x
14EP119	SEQ ID NO: 14	> 8x	> 8x
14EP120	SEQ ID NO: 15	> 8x	> 8x
14EP121	SEQ ID NO: 16	> 8x	> 8x
14EP125	SEQ ID NO: 20	> 8x	> 8x
14EP132	SEQ ID NO: 27	> 8x	> 8x
14EP133	SEQ ID NO: 28	> 8x	> 8x
14EP134	SEQ ID NO: 29	> 8x	> 8x
25EP119	SEQ ID NO: 38	> 8x	> 8x
14EP122	SEQ ID NO: 17	4x a 8x	> 8x
14EP126	SEQ ID NO: 21	4x a 8x	> 8x
14EP129	SEQ ID NO: 24	4x a 8x	> 8x
14EP131	SEQ ID NO: 26	4x a 8x	> 8x
14EP123	SEQ ID NO: 18	4x a 8x	4x a 8x
14EP124	SEQ ID NO: 19	4x a 8x	4x a 8x
25EP108	SEQ ID NO: 36	4x a 8x	4x a 8x
25EP126	SEQ ID NO: 41	4x a 8x	4x a 8x
14EP142	SEQ ID NO: 35	4x a 8x	2x a 4x
25EP118	SEQ ID NO: 37	4x a 8x	2x a 4x
25EP125	SEQ ID NO: 40	4x a 8x	2x a 4x
14EP130	SEQ ID NO: 25	2x a 4x	2x a 4x
25EP128	SEQ ID NO: 43	2x a 4x	2x a 4x
14EP127	SEQ ID NO: 22	2x a 4x	2x a 4x
14EP135	SEQ ID NO: 30	2x a 4x	ND
14EP136	SEQ ID NO: 31	2x a 4x	ND
14EP137	SEQ ID NO: 32	2x a 4x	ND
14EP138	SEQ ID NO: 33	2x a 4x	ND
25EP120	SEQ ID NO: 39	2x a 4x	0.5x a 2x
14EP128	SEQ ID NO: 23	0.5x a 2x	0.5x a 2x
25EP127	SEQ ID NO: 42	0.1x a 0.5	0.1x a 0.5
IFN-alfa Con1	SEQ ID NO: 58	2x a 4x	4x a 8x
IFN-alfa 2a	SEQ ID NO: 47	0.5x a 2x	0.5x a 2x
IFN-alfa 2b	SEQ ID NO: 46	1 (ref)	1 (ref)

307

306

EJEMPLO 3

Actividades TH1 de polipéptidos de Interferón-alfa

El ensayo TH1 se diseñó para monitorear la mejoría de la diferenciación de la célula T sin afección dentro de las células TH por el IFN-alfa como se determina por la cantidad de IFN-gamma detectado en los sobrenadantes de cultivo. El cuadro 8 provee las actividades relativas TH1 de diversos polipéptidos de IFN-alfa ensayos como se describe en la sección de materiales y métodos anteriormente mencionada.

10

CUADRO 8

Muestra	SEQ ID NO	Número de veces sobre IFN-alfa 2a
14Epi18	SEQ ID NO: 13	>30x
25Epi19	SEQ ID NO: 38	>30x
IFN-alfa Con1	SEQ ID NO: 58	10x a 15 x
INF-alfa 2a	SEQ ID NO: 47	1 (ref)

15

EJEMPLO 4

Actividades antiproliferativas de los péptidos del interferón-alfa

IFN-alfa inhibe la proliferación de muchos tipos celulares, aunque los efectos antiproliferativos frecuentemente se presentan a dosis más elevadas de las que se requieren para la respuesta antiviral. Las células Daudi son una línea de célula B transformada por EVB derivadas de humano que es sensible al IFN-alfa. Esta línea celular que responde a IFN-alfa sirve como una sonda útil de los efectos antiproliferativos de los polipéptidos IFN-alfa polipéptidos de la invención. Además, la actividad

308

antiproliferativa de IFN-alfa sobre los megacariocitos y neutrófilos a una alta dosis se cree que contribuye a la trombocitopenia y neutropenia, respectivamente. El ensayo antiproliferativo en Daudi puede servir como un ensayo sustituto útil para los efectos antiproliferativos en estos u otros tipos celulares linfoides.

- 5 El cuadro 9 provee actividades antiproliferativas relativas de diversos polipéptidos de IFN-alfa ensayados como se describe en la sección de materiales y métodos anteriormente mencionada, expresadas como veces de actividad antiproliferativa en relación con huIFN-alfa 2a (muestra EC50huIFN-alfa 2a/ EC50). Bajo las condiciones de ensayo empleadas, se detectaron las actividades antiproliferativas de
- 10 al menos 0.01x del interferón de referencia.

307

309

308

CUADRO 9

Nombre de la muestra	SEQ ID NO:	Número de veces de actividad IFN- α 2a
B9X14EC4	SEQ ID NO: 1	0.8x a 0.5x
14Epi15	SEQ ID NO: 10	0.25x a 0.1x
14Epi17	SEQ ID NO: 12	0.25x a 0.1x
14Epi18	SEQ ID NO: 13	0.8x a 0.5x
14Epi19	SEQ ID NO: 14	0.5x a 0.25x
14Epi20	SEQ ID NO: 15	0.5x a 0.25x
14Epi21	SEQ ID NO: 16	0.25x a 0.1 x
14Epi22	SEQ ID NO: 17	0.25x a 0.1x
14Epi23	SEQ ID NO: 18	0.25x a 0.1 x
14Epi24	SEQ ID NO: 19	0.5x a 0.25x
14Epi25	SEQ ID NO: 20	0.5x a 0.25x
14Epi26	SEQ ID NO: 21	0.5x a 0.25x
14Epi27	SEQ ID NO: 22	0.5x a 0.25x
14Epi28	SEQ ID NO: 23	0.8x a 0.5x
14Epi29	SEQ ID NO: 24	0.25x a 0.1x
14Epi30	SEQ ID NO: 25	0.5x a 0.25x
14Epi31	SEQ ID NO: 26	0.5x a 0.25x
14Epi32	SEQ ID NO: 27	1.2x a 0.8x
14Epi33	SEQ ID NO: 28	0.8x a 0.5x
14Epi34	SEQ ID NO: 29	0.8x a 0.5x
14Epi35	SEQ ID NO: 30	0.8x a 0.5x
14Epi36	SEQ ID NO: 31	0.5x a 0.25x
14Epi37	SEQ ID NO: 32	0.8x a 0.5x
14Epi38	SEQ ID NO: 33	0.8x a 0.5x
14Epi42	SEQ ID NO: 35	0.5x a 0.25x
25Epi08	SEQ ID NO: 36	0.5x a 0.25x
25Epi18	SEQ ID NO: 37	0.25x a 0.1x
25Epi19	SEQ ID NO: 38	0.8x a 0.5x
25Epi20	SEQ ID NO: 39	0.25x a 0.1 x
25Epi25	SEQ ID NO: 40	0.25x a 0.1 x
25Epi26	SEQ ID NO: 41	0.25x a 0.1 x
25Epi27	SEQ ID NO: 42	0.5x a 0.25x
25Epi28	SEQ ID NO: 43	0.5x a 0.25x
25Epi29	SEQ ID NO: 44	0.8x a 0.5x
IFN-alfa Con1	SEQ ID NO: 58	1.2x a 0.8x
IFN-alfa 2a	SEQ ID NO: 47	1x (ref)

310

EJEMPLO 5**PEGilación de polipéptidos de Interferón-alfa**

5 Los siguientes procedimientos ejemplares se proveen para la preparación de conjugados de la invención.

Cys-PEGilación

10 Un polipéptido de la invención del cual contiene una cisteína libre puede ser un cisteína-PEGilada como sigue. El polipéptido primero se reduce parcialmente con una concentración equimolar de TCEP (Triscarboxietilfosfina) a 4°C por 30 min en 50 mM MES, 100 mM NaCl, pH 6.0. El polipéptido reducido se reacciona entonces con un exceso molar de 4 veces del reactivo mPEG-MAL (con una porción PEG tal como un mPEG lineal de 20 kDa o 30 kDa, o un mPEG2 ramificado de 40 kDa) fpor 1 hora a 4°C

15 bajo las mismas condiciones. La mezcla de reacción PEGilada se cargan sobre una columna de SP-Sepharose HP equilibrada con 50 mM MES, pH 6.0, 100 mM NaCl. Después de un paso de lavado con 10 CV (volumen de columna) se aplica un gradiente de 0-600 mM NaCl para fraccionar las fracciones PEGiladas y no PEGiladas. Las fracciones se recolectan y se analizan mediante SDS-PAGE. Las fracciones que

20 contienen especies monoPEGiladas se agrupan y se formulan para los ensayos de actividad de interferón- alfa como se describió anteriormente.

PEGilación N-terminal

La PEGilación N-terminal con mPEG-butiraldehído (que tiene una porción PEG tal como un mPEG lineal de 20 kDa o 30 kDa, o un mPEG2 ramificado de 40 kDa) se puede preformar a 4°C utilizando un exceso molar de 5 veces del reactivo PEG:polipéptido por 4-8 horas en 50 mM MES, pH 5.5, 100 mM NaCl, y 20 mM cianoborohidruro sódico, o en 50 mM acetato de sodio, pH 5.5, 100 mM NaCl y 20 mM cianoborohidruro sódico. Los conjugados se aislaron mediante cromatografía sobre una columna de SP-Sepharose HP equilibrada en 50 mM MES pH 5.5, 100 mM NaCl, utilizando un gradiente de 100-600 mM NaCl en 50 mM MES pH 5.5. Las fracciones que contenían las especies monoPEGiladas se agrupan y se formulan para ensayos para actividad en interferón-alfa como se describió anteriormente, y se pueden caracterizar adicionalmente mediante, por ejemplo, utilizando CLAR analítica, análisis de aminoácidos y/o espectrometría de masas MALDI-TOF.

Lisina PEGilación

En general, la lisina-PEGilación se llevó a cabo utilizando un procedimiento esencialmente como se describe por Foser et al. (2003) Protein Expression & Purification 30: 78-87. Brevemente, el polipéptido se hizo reaccionar con 40 kDa de mPEG2-NHS a aproximadamente una relación molar de 3: 1 a 5: 1 de mPEG2-NHS: polipéptido en 50 mM regulador de pH de borato, pH 9.0, a 4°C por aproximadamente 1 hora a durante toda la noche. Los conjugados se aislaron mediante cromatografía de intercambio catiónico. Las fracciones que contenían las especies monoPEGilada se agruparon y se formularon para ensayos de actividad de interferón-alfa como se describió anteriormente.

Los conjugados monoPEGilados de IFN-alfa prepared de conformidad con el procedimiento anteriormente mencionado exhibieron una actividad antiviral en el ensayo de HeLa-EMCV, aunque fue menor que en los péptidos parentales no PEGilados.

En algunos casos, el agrupamiento monoPEGilado obtained como se describió anteriormente se analizó adicionalmente mediante CLAR de intercambio catiónico utilizando una columna de Polisulfoetil A (2.1 mmID x 200 mmL, 5 m, 1000 A, a partir de PolyLC) para caracterizar el perfil de PEG-isomer. Las fases móviles fueron regulador de pH A: 5 mM KH₂PO₄, 40% 1-propanol, 1% dietilenglicol, pH 3.0 y regulador de pH B: el mismo que A con 200 mM NaCl. Los isómeros PEG posicionales se separaron utilizando un gradiente de 50%-75% fase móvil B durante 80 minutos a 0.1 ml/min, 20°C con detección a 214 nm.

La figura 8 muestra la separación mediante CLAR de intercambio catiónico del agrupamiento monoPEGilado obtenido partir de la reacción del polipéptido de interferón-alfa B9xl4EC4 con 40 kDa mPEG2-NHS de conformidad con el procedimiento anteriormente mencionado. Los picos se recolectaron y se analizaron en SDS-PAGE (figura 9). Las líneas 2 y 9 de la figura 9 muestran que la muestra antes de la aplicación sobre la columna CLAR contiene predominantemente proteína monoPEGilada. Los picos 1-4 (líneas 3-6 de la figura 9) corresponden a la porción pequeña de IFN diPEGilado en el agrupamiento monoPEGilada. El pico menor 5 (línea 7 de la figura 9) contiene porciones aproximadamente iguales de diPEGilada, monoPEGilada y una especie de peso molecular menor. Los picos 6-11 (líneas 10-15 de la figura 9) corresponden a los isómeros posicionales del polipéptido de IFN monoPEGilado.

312

El polipéptido 14epi18 (SEQ ID NO: 13) fue lisina-PEGilada como sigue. El eluido del paso de cromatografía en Q-Sepharose (obtenido de conformidad con la sección de materiales y métodos anteriormente mencionada) se concentró a $c < 2$ mg/ml. Para la PEGilación el regulador de pH se cambió a 50 mM borato de sodio, pH 9.0. El

5 polipéptido se hizo reaccionar con 40 kDa mPEG2-NHS esencialmente como se describe por Foser et al. (2003; Protein Expression & Purification 30: 78-87) a una relación molar de reactivo PEG sobre proteína de 4: 1 o 5: 1. La reacción de PEGilación se dejó proceder a 4°C por 1.5 horas. 14epi18 monoPEGilado se purificó a partir de la mezcla de reacción mediante cromatografía de intercambio catiónico. La elución se llevó a cabo en

10 tres pasos utilizando concentraciones en incremento de sal hasta 1 M NaCl para separar las especies de oligoPEGilada, monoPEGilada y no-PEGilada. El pico de 14epi18 monoPEGilado se formuló a una concentración de 0.33 mg/ml para análisis adicional. La composición de 14epi18 monoPEGilada así obtenida produjo una población de isómeros posicionales predominantemente monoPEGilada en Lys122 y Lys135.

15 El polipéptido 25epi19 (SEQ ID NO: 38) fue lisina-PEGilada como sigue. El eluido del paso de cromatografía en Q-Sepharose (obtenido de conformidad con la sección de materiales y métodos anteriormente mencionada) se concentró a $c < 2$ mg/ml. Para la PEGilación el regulador de pH se cambió a 50 mM borato de sodio, pH 9.0. El

20 polipéptido se hizo reaccionar con 40 kDa mPEG2-NHS esencialmente como se describe por Foser et al. (2003; Protein Expression & Purification 30: 78-87) a una relación molar de reactivo PEG sobre proteína de 4: 1. La reacción de PEGilación se dejó proceder a 4°C durante toda la noche. 25epi 19 monoPEGilado se purificó a partir de la mezcla de reacción mediante cromatografía de intercambio catiónico. La elución se llevó a cabo en

311

tres pasos utilizando concentraciones en incremento de sal hasta 750 mM NaCl para separar las especies oligoPEGilada, monoPEGilada y no-PEGilada. El pico de 25epi19 monoPEGilado se concentró en el regulador de pH para elución a < 2 mg/ml y se formuló para análisis adicional. La composición de 25epi19 monoPEGilado así obtenida produjo una población de isómeros posicionales predominantemente monoPEGilada en Lys31, Lys 122 y Lys 135.

14epi18 monoPEGilado y 25epi19 monoPEGilado se prepararon como se describió anteriormente y ambos exhibieron una actividad antiviral 10 veces mayor que la actividad antiviral de IFN- alfa 2a monoPEGilado en el ensayo antiviral HeLa-EMCV.

EJEMPLO 6

Calorimetría de registro diferencial

Los experimentos de calorimetría de registro diferencial (DSC) se llevaron a cabo para estimar la capacidad de algunos polipéptidos de la invención. Las muestras de proteína a concentraciones de 100 a 325 g/ml fueron sometidas a intercambio de regulador de pH dentro de solución salina con pH regulado con fosfato (PBS) y se sometieron a DSC utilizando un MicroCal VP-DSC (MicroCal, Northampton, MA). La temperatura de fusión (T_m) se estimó a partir de la gráfica de la capacidad calórica (C_p) contra la temperatura. Las T_m s estimadas son: B9X14EC4 (SEQ ID NO: 1) 58.4°C; 14epi6 (SEQ ID NO: 11) 64.2°C; y 14epi8 (SEQ ID NO: 13) 59.5°C. La sustitución de un residuo de fenilalanina en la posición 48 (en SEQ ID NO: 1) por un residuo de leucina (en

SEQ ID NO: 11) o un residuo de alanina (en SEQ ID NO: 13) parece no tener ningún efecto detrimental sobre la estabilidad del polipéptido.

EJEMPLO 7

5

Ensayos In vivo

Medición de los perfiles de farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD) de un polipéptido o conjugado de la invención

La medición de la vida media biológica o vida media en suero se puede llevar acabo de numerosas formas descritas en la literatura. Por ejemplo, la vida media biológica puede determinarse utilizando un método de ELISA para detectar los niveles en suero de interferón-alfa después de por ejemplo administración subcutánea o intramuscular. El uso de un método ELISA para determinar las farmacocinéticas del interferón-alfa administrado subcutáneamente se describe por ejemplo por Rostaing et al. (1998), J. Am. Soc. Nephrol.9(12): 2344-48. Merimsky et al.(1991), Cancer Chemother. Pharmacol. 27 (5); describe la determinación en suero del nivel de un interferón-alfa intramuscularmente administrado.

Por ejemplo, los perfiles farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) de un conjugado de la invención se pueden estudiar en monos cynomolgus (Macaca fascicularis) de conformidad con el siguiente procedimiento. Los animales hembra de tres o cuatro años de edad con un peso promedio de 5-6 kg se utilizan en el estudio. Los animales se aclimatan por un mínimo de 6 semanas entre la llegada y el inicio del tratamiento con un período mínimo de 3 semanas de aclimatan para las condiciones de

315

alojamiento del estudio. Estas se alojan particularmente en jaulas de malla de acero inoxidable (al menos 540 x 810 x 760 mm) y se mantienen con una dieta para primate completa comercialmente disponible (100 gramos/animal/día) analizada para la ausencia de contaminantes bacterianos y químic^os. Además, los animales recibieron diariamente fruta (manzana o banana). Los animales se sometieron a ayuno antes de todos los procedimientos que requerían anestesia.

10 Tres días antes del inicio del estudio y el día de inicio del estudio antes de la administración de los compuestos, se recolectaron muestras de sangre a partir de los animales. A lo largo de todo el estudio, las muestras de sangre (1 ml de sangre total) se retiraron a partir de un vaso femoral o cefálico/safenoso del animal manualmente detenido no anestesiado.

15 El régimen de alimentación normal se mantuvo durante la recolección. Las muestras se recolectaron en tubos sin anticoagulante, seguido por centrifugación a 3000 rpm (aproximadamente 1760 g) por 10 minutos a 4°C. Las muestras de suero se separan entonces en dos alícuotas (aproximadamente 200 µl cada una) y se almacenan a -20°C.

20 Antes del inicio del estudio, el conjugado de la invención se formuló en 20 mM acetato de sodio (pH 6.0) y 140 mM cloruro de sodio. En el inicio del estudio, el conjugado se administró una vez por animal ya sea como 30 mcg conjugado/kg peso del animal (cuatro animales), o 300 mcg/kg (cuatro animales), utilizando una jeringa estéril y una aguja introducida subcutáneamente después de la desinfección local con solución acuosa de etil alcohol. Las muestras de sangre se recolectaron en los siguientes puntos de tiempo después de la administración del conjugado: 4 horas, 8 horas, 12 horas, 24

317

horas, 48 horas, 72 horas, 144 horas, 240 horas, 336 horas, 456 horas, 552 horas, 600 horas, 624 horas, 648 horas, 672 horas, 696 horas, 720 horas y 744 horas.

Los animales se observaron diariamente para detectar cualquier signo clínico o reacción al tratamiento. Los sitios de inyecciones son evaluados visualmente diariamente con el objeto de evaluar la tolerancia local. Un examen clínico detallado se llevó a cabo antes del inicio del tratamiento y del término del estudio.

La concentración del conjugado en las muestras de suero aisladas se determinó después del término del estudio, utilizando un ensayo ELISA. La vida media in vivo del conjugado en monos cynomolgus se determina entonces basándose en la concentración en suero de los compuestos en los puntos de tiempo especificados.

La respuesta farmacodinámica en los monos cynomolgus al tratamiento con un conjugado de la invención se evalúa al medir los niveles de 2',5'-oligoadenilato sintetasa y neopterina en cada muestra de suero, utilizando un RIA comercialmente disponible (Eiken Chemical Co., Tokyo) y un ELISA comercialmente disponible (IBL Immuno Biological Laboratories, Hamburgo), respectivamente. Basándose en las concentraciones medidas de estos dos biomarcadores para la actividad del interferón en las muestras de suero, se determina el área bajo la curva (AUC) para cuantificar la actividad in vivo de cada compuesto a cada una de las dos dosis.

Determinación de la inmunogeneidad in vitro

La inmunogenicidad reducida de polipéptido o conjugado de la invención con relación a la molécula de referencia se puede determinar mediante el uso de un método ELISA midiendo la inmunorreactividad de la molécula en relación con una molécula de referencia o preparación, típicamente una proteína conocida de interferón-

alfa. El método de ELISA se basa en los anticuerpos a partir de pacientes tratados con la proteína de referencia. Se considera que la inmunogenicidad se reduce cuando el polipéptido o conjugado de la invención tiene una menor respuesta estadísticamente significativa en el ensayo en comparación con la molécula o preparación de referencia.

5 Aunque la invención precedente se ha descrito con cierto detalle para propósitos de claridad y entendimiento, será evidente para una persona experta en la técnica después de la lectura de esta descripción que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalle sin apartarse del verdadero alcance de la invención. Se entiende que los ejemplos y modalidades descritas en la presente invención son
10 solamente para propósitos ilustrativos y y que diversas modificaciones o cambios a la luz de las mismas serán sugeridos a las personas expertas en la técnica y deben incluirse dentro del espíritu y alcance de esta aplicación y el alcance de las reivindicaciones anexas. Por ejemplo, todas las técnicas e instrumentos anteriormente descritos se pueden utilizar en diversas combinaciones. Todas las aplicaciones, patentes, solicitudes
15 de patente, y/o otros documentos citados en esta solicitud se incorporan en la presente invención como referencias en su totalidad para todos los propósitos hasta el mismo grado como si cada publicación individual, patente, solicitud de patente, y/u otro documento se indicaran individualmente para ser incorporadas en la presente invención como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

N UVIDAD DE LA INVENCION**REIVINDICACIONES**

5 1.- Un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia la cual (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir del SEQ ID NO: 1 y (b) comprende una o más sustituciones en relación con SEQ ID NO: 1 seleccionada a partir del grupo que consiste de F48A/L; V51P; F55A; F65A; F68P; L111A; y V114P; dicho polipéptido exhibe actividad antiviral.

10 2.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: en 1 a 10 posiciones de aminoácidos.

15 3.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 1 en 1 a 8 posiciones de aminoácidos.

 4.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende adicionalmente una o más sustituciones seleccionadas a partir del grupo que consiste de H47Q; V51A; Q52P/E; A53T; F55S; L56V; F57L; Y58H; M61I; N113K; V114E; y E 160D.

20 5.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2-35.

6.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicha secuencia comprende la sustitución F48A/L en relación con SEQ ID NO: 1.

5 7.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además porque comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35.

0 8.- Un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia que (a) difiere en 0 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 13 y (b) comprende uno o más de: Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 111; y Pro en la posición 114; dicho polipéptido exhibe actividad antiviral.

15 9.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque dicha secuencia comprende Ala o Leu en la posición 48.

10.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 13 en 0 a 8 posiciones de aminoácidos.

20 11.- Un polipéptido aislado o recombinante que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13, opcionalmente comprendiendo de manera adicional una metionina en el extremo N terminal, dicho polipéptido exhibe actividad antiviral.

12.- Un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia que (a) difiere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 36 y (b) comprende una o más sustituciones en relación con SEQ ID NO: 36 seleccionadas a partir del grupo que consiste de M21A, I24P, F48A/L, T51P, S55A, F65A, F68P, F90A, M93P, L111A, V114P, F124A, I127P, y E160D; dicho polipéptido exhibe actividad antiviral.

13.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 36 en 1 a 10 posiciones de aminoácidos.

14.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 36 en 1 a 8 posiciones de aminoácidos.

15.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque comprende adicionalmente una o más sustituciones seleccionadas a partir del grupo que consiste de P26L, H47Q, T51V, S55P/F, V56L, H58Y, L60M, F90Y, M93L, N95D, N113K, V114E, R125Q, T132K, y L154F.

16.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO: 37-44.

17.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque dicha secuencia comprende la sustitución F48A/L en relación con SEQ ID NO: 36.

18.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado además porque comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste de SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, y SEQ ID NO: 43.

5 19.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque comprende la secuencia SEQ ID NO: 44.

20.- Un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia que (a) difiere en 0 a 16 posiciones de aminoácidos a partir de SEQ ID NO: 38 y (b) comprende uno o más de: Ala en la posición 21; Pro en la posición 24; Ala o Leu en la posición 48; Pro en la posición 51; Ala en la posición 55; Ala en la posición 65; Pro en la posición 68; Ala en la posición 90; Pro en la posición 93; Ala en la posición 111; Pro en la posición 114; Ala en la posición 124; Pro en la posición 127; y Glu en la posición 160; dicho polipéptido exhibe actividad antiviral.

15 21.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado además porque dicha secuencia comprende Ala o Leu en la posición 48.

22.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado además porque comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 38 en 0 a 8 posiciones de aminoácidos.

20 23.- Un polipéptido aislado o recombinante que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38, opcionalmente comprendiendo de manera adicional una metionina en el extremo N terminal, dicho polipéptido exhibe actividad antiviral.

24.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 23, caracterizado además porque la actividad antiviral del polipéptido es igual a o mayor que la actividad antiviral del hulFN-alfa 2b o del hulFN-alfa 2a.

5 25.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque la actividad antiviral del polipéptido es al menos dos veces mayor que la actividad antiviral del hulFN-alfa 2b o del hulFN-alfa 2a.

10 26.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 23, caracterizado además porque el polipéptido exhibe una relación de actividad antiviral/actividad antiproliferativa al menos dos veces mayor que la relación de actividad antiviral/actividad antiproliferativa exhibida por hulFN-alfa 2b o por hulFN-alfa 2a.

27.- Un conjugado que comprende (a) un polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, y (b) una porción no polipeptídica covalentemente unida al polipéptido.

15 28.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado además porque comprende al menos dos porciones no polipeptídicas.

29.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado además porque comprende una porción no polipeptídica covalentemente unida a un residuo de cisteína.

20 30.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado además porque comprende una porción no polipeptídica covalentemente unida a un residuo de lisina o al grupo amino N terminal.

31.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado además porque comprende una porción no polipeptídica covalentemente unida a un residuo de lisina.

5 32.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado además porque comprende una porción no polipeptídica unida al grupo amino N terminal.

33.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado además porque la porción no polipeptídica es un polímero.

34.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado además porque el polímero es un polietilenglicol.

0 35.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque el polietilenglicol es una porción mPEG2 de 40 kDa covalentemente unida a un residuo de lisina.

36.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado además porque la porción no polipeptídica es un azúcar.

15 37.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque el azúcar está unido a un sitio de N-glicosilación del polipéptido.

20 38.- Un conjugado que comprende (a) un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13, opcionalmente comprendiendo de manera adicional una metionina en el extremo N terminal; y (b) una porción PEG covalentemente unida a un residuo de lisina del polipéptido, dicho conjugado exhibe actividad antiviral.

39.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado además porque la porción PEG es una porción mPEG2 de 40 kDa.

40.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado además porque la porción mPEG2 de 40 kDa está covalentemente unida a un residuo de lisina seleccionado a partir de Lys 122 y Lys 135.

5 41.- Un conjugado que comprende (a) un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38, opcionalmente comprendiendo de manera adicional una metionina en el extremo N terminal; y (b) una porción PEG covalentemente unida a un residuo de lisina del polipéptido, dicho conjugado exhibe actividad antiviral.

42.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado además porque la porción PEG es una porción mPEG2 de 40 kDa.

10 43.- El conjugado de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado además porque la porción mPEG2 de 40 kDa está covalentemente unida a un residuo de lisina seleccionado a partir de Lys31, Lys122, y Lys135.

15 44.- Una composición que comprende (a) un conjugado que comprende un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13, opcionalmente comprendiendo de manera adicional una metionina en el extremo N terminal, y una porción mPEG2 de 40 kDa covalentemente unida a Lys 122; y (b) un conjugado que comprende un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13, opcionalmente comprendiendo de manera adicional una metionina en el extremo N terminal, y una porción mPEG2 de 40 kDa covalentemente unida a Lys 135; dicha composición exhibe actividad antiviral.

20 45.- Una composición que comprende (a) un conjugado que comprende un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38, opcionalmente comprendiendo de manera adicional una metionina en el extremo N terminal, y una porción mPEG2 de 40 kDa covalentemente unida a Lys31; (b) un conjugado que comprende un polipéptido que

comprende la secuencia SEQ ID NO: 38, opcionalmente comprendiendo de manera adicional una metionina en el extremo N terminal, y una porción mPEG2 de 40 kDa covalentemente unida a Lys122; y (c) un conjugado que comprende un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38, opcionalmente comprendiendo de manera adicional una metionina en el extremo N terminal, y una porción mPEG2 de 40 kDa covalentemente unida a Lys135; dicha composición exhibe actividad antiviral.

46.- Una composición que comprende el polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

47.- Una composición que comprende el conjugado de conformidad con la reivindicación 27 a 43 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

48.- La composición de conformidad con la reivindicación 44 a 45, caracterizada además porque comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

49.- Un polinucleótido aislado o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26.

50.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado además porque comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 13.

51.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado además porque comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada a partir de SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, y SEQ ID NO: 89.

52.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado además porque comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 38.

53.- El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 52, caracterizado además porque comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada a partir de SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, y SEQ ID NO: 90.

54.- Una célula hospedera que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 49.

55.- Un vector que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 49.

56.- El vector de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado además porque es un vector de expresión que comprende el polinucleótido operativamente asociado a un promotor.

57.- Una célula hospedera que comprende el vector de conformidad con la reivindicación 56.

58.- Una composición que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 49 y un excipiente.

59.- Un método para la preparación de un polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, el método comprendiendo: proveer un cultivo que comprende una célula hospedera, la célula hospedera que comprende un vector de expresión que comprende un promotor operativamente asociado a un polinucleótido, el polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido, cultivar el

cultivo bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido, y recuperar el polipéptido.

60.- El método de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado además porque la célula hospedera es una célula hospedera glicosilante.

5 61.- El método de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado además porque la célula hospedera es una célula hospedera bacteriana.

62.- El método de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado además porque la célula hospedera bacteriana es E. coli.

63.- El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado además porque el paso de recuperación del polipéptido comprende: (a) el aislamiento de
0 cuerpos de inclusión (IB) que comprenden el polipéptido; (b) solubilización de los IB, obteniendo así un polipéptido no plegado; (c) replegar el polipéptido no plegado, obteniendo así un polipéptido replegado; y (d) purificar el polipéptido replegado.

64.- Un método para la preparación de un conjugado, el método
15 comprendiendo (i) la provisión del polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, y (ii) unir al menos una porción no polipeptídica al polipéptido, en donde el conjugado resultante exhibe actividad antiviral.

65.- El método de conformidad con la reivindicación 64, caracterizado además porque el paso de provisión del polipéptido comprende: la provisión de un cultivo
20 que comprende una célula hospedera, la célula hospedera que comprende un vector de expresión que comprende un promotor operativamente asociado a un polinucleótido, el polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el

polipéptido, cultivar el cultivo bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido, y la recuperación del polipéptido.

5 66.- El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado además porque la célula hospedera es una célula hospedera glicosilante o una célula hospedera bacteriana.

67.- El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado además porque la célula hospedera bacteriana es E. coli.

0 68.- El método de conformidad con la reivindicación 67, caracterizado además porque el paso de recuperación del polipéptido comprende: (a) el aislamiento de los cuerpos de inclusión (IB) que comprende el polipéptido; (b) la solubilización de los IB, obteniendo así un polipéptido no plegado; (c) replegando el polipéptido no plegado, obteniendo así el polipéptido replegado; y (d) purificar el polipéptido replegado.

15 69.- El método de conformidad con la reivindicación 64, caracterizado además porque el paso de unión de al menos una porción no polipeptídica al polipéptido comprende: hacer reaccionar el polipéptido con mPEG2-NHS de 40 kDa a una relación molar de mPEG2NHS:polipéptido de aproximadamente 3:1 a 5:1 a pH 9 y 4°C de 1 hora a toda la noche.

20 70.- Un método para reducir el número de copias de un virus en células infectadas con el virus, el método comprendiendo: administrar el polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, el conjugado de conformidad con la reivindicación 27 a 43, o la composición de conformidad con la reivindicación 44 a 48 a las células en una cantidad efectiva para reducir el número de copias del virus en las células, reduciendo así el número de copias del virus en dichas células.

71.- Un método para reducir el nivel de ARN de HCV en el suero de un paciente infectado con HCV, que comprende administrar al paciente el polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, el conjugado de conformidad con la reivindicación 27 a 43, o la composición de conformidad con la reivindicación 44 a 48 en una cantidad efectiva para reducir el nivel de ARN de HCV en comparación con el nivel de ARN de HCV presente antes del inicio del tratamiento.

72.- Un método para reducir el nivel de ADN de HBV en suero de un paciente infectado con HBV, que comprende administrar al paciente el polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, el conjugado de conformidad con la reivindicación 27 a 43, o la composición de conformidad con la reivindicación 44 a 48 en una cantidad efectiva para reducir el nivel de ADN de HBV en comparación con el nivel de ADN de HBV presente antes del inicio del tratamiento.

73.- Un método para reducir el nivel de ARN de HIV en suero de un paciente infectado con HIV, que comprende administrar al paciente el polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, el conjugado de conformidad con la reivindicación 27 a 43, o la composición de conformidad con la reivindicación 44 a 48 en una cantidad efectiva para reducir el nivel de ARN de HIV en comparación con el nivel de ARN de HIV presente antes del inicio del tratamiento.

74.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, el conjugado de conformidad con la reivindicación 27 a 43, o la composición de conformidad con la reivindicación 44 a 48 para uso como un medicamento.

75.- El uso del polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, el conjugado de conformidad con la reivindicación 27 a 43, o la composición de conformidad

330

con la reivindicación 44 a 48 para la elaboración de un medicamento para uso en el tratamiento de la enfermedad.

5 76.- El uso del polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, el conjugado de conformidad con la reivindicación 27 a 43, o la composición de conformidad con la reivindicación 44 a 48 para la elaboración de un medicamento para uso en el tratamiento de una enfermedad viral.

10 77.- El uso del polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, el conjugado de conformidad con la reivindicación 27 a 43, o la composición de conformidad con la reivindicación 44 a 48 para la elaboración de un medicamento para reducir el número de copias de un virus en células infectadas con el virus.

78.- El uso del polipéptido de conformidad con la reivindicación 1 a 26, el conjugado de conformidad con la reivindicación 27 a 43, o la composición de conformidad con la reivindicación 44 a 48 para la elaboración de un medicamento para reducir el nivel de un virus en el suero de un paciente infectado con el virus.

15 79.- El uso como el que se reclama en cualesquiera de las reivindicaciones 61-63, en donde el virus es HCV, HBV, o HIV.

332

331

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Maxygen, Inc.

F. Hoffmann-LaRoche AG

5

<120> POLIPEPTIDOS DE INTERFERON-ALFA Y
CONJUGADOS

<130> 0280.310WO

10

<150> US 60/572,504

<151> 2004-05-19

<160> 90

15

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 166

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética B9x14EC4

25

<400> 1

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

1

5

10

15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

30

20

25

30

~~333~~

332

293

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

20

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

25

<220>
<223> Construcción sintética 14epi07

<400> 2

30

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

334

333

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

<210> 3
25 <211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Construcción sintética 14ep108

335

334

<400> 3

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

1 5 10 15

5 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

20 25 30

Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Phe

35 40 45

Gln Lys Ala Pro Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Met Gln Gln Thr

10 50 55 60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu

85 90 95

15 Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met

100 105 110

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

115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val

20 130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu

145 150 155 160

Ser Leu Arg Ser Lys Glu

165

25

<210> 4

<211> 166

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

336

335

<220>

<223> Construcción sintética 14epi09

5 <400> 4

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

20 25 30

10 Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Phe

35 40 45

Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Met Gln Gln Thr

50 55 60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

15 65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu

85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met

100 105 110

20 Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr

115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val

130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu

25 145 150 155 160

Ser Leu Arg Ser Lys Glu

165

30 <210> 5

337

<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética 14epi10

<400> 5

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

337

<210> 6

<211> 166

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi11

10

<400> 6

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp .

15

20 25 30

Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Phe

35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Ala Phe His Glu Met Met Gln Gln Thr

50 55 60

20

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu

85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met

25

100 105 110

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

115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val

130 135 140

30

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu

339

338

145 150 155 160
Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

5

<210> 7
<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Construcción sintética 14epi12d

<400> 7

15

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

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

20

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

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

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

25

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu
85 90 95

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

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

30

340

337

300

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Asp
145 150 155 160
5 Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

- <210> 8
- 10 <211> 166
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Construcción sintética 14epi13

<400> 8
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met
1 5 10 15
20 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Val Gln Ala Ile Phe Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr
25 50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu
85 90 95
30 Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met

341

340

301

100 105 110
Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
5 130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu
145 150 155 160
Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

10

<210> 9

<211> 166

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi14

20 <400> 9

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

1

5

10

15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

20

25

30

25 Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Phe

35

40

45

Gln Lys Val Gln Ala Ile Phe Leu Phe Tyr Glu Met Ile Gln Gln Thr

50

55

60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

30

65

70

75

80

342

341

302

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
5 Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu
10 145 150 155 160
Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

15 <210> 10
<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética 14ep115

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

343

342

303

[illegible]

<210> 11

<211> 166

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi16

25

<400> 11

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

30 20 25 30

~~344~~

343

304

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

20

<210> 12
<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Construcción sintética 14epi17

<400> 12

30

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

345

344

305

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

<210> 13
25 <211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Construcción sintética 14epi18

346

345

<400> 13

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

25

<210> 14

<211> 166

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

347

<220>

<223> Construcción sintética 14epi19

5 <400> 14

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

20 25 30

10 Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Ala

35 40 45

Gln Lys Val Gln Ala Ile Ala Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr

50 55 60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

15 65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu

85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met

100 105 110

20 Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr

115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val

130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu

25 145 150 155 160

Ser Leu Arg Ser Lys Glu

165

30 <210> 15

347

<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética 14epi20

<400> 15

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

349

348

<210> 16

<211> 166

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi21

10

<400> 16

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

15 20 25 30

Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Phe

35 40 45

Gln Lys Val Gln Ala Ile Ala Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr

50 55 60

20 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu

85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met

25 100 105 110

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

115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val

130 135 140

30 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu

380

349

310

145 150 155 160
Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

5

<210> 17
<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Construcción sintética 14ep122

<400> 17

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

301

350

311

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

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

5 Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 18

10 <211> 166

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética 14epi23

<400> 18

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

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

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

Gln Lys Val Gln Ala Ile Ser Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr
25 50 55 60

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

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu
85 90 95

30 Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Ala Met

352

351

312

	100		105		110
	Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr				
	115		120		125
	Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val				
5	130		135		140
	Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu				
	145		150		155
	Ser Leu Arg Ser Lys Glu				160
			165		

10

<210> 19
<211> 166
<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética 14epi24

20

<400> 19
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
25 Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Ala
35 40 45
Gln Lys Val Gln Ala Ile Ser Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
30 65 70 75 80

353

352

313

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
5 Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu
10 145 150 155 160
Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

15 <210> 20
<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética 14epi25

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

304

353

314

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

<210> 21
<211> 166
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética 14epi26

25
<400> 21
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
30 20 25 30

308

354

315

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

20

- <210> 22
- <211> 166
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

25

- <220>
- <223> Construcción sintética 14epi27

<400> 22

30

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

356

355.

316

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

- <210> 23
- 25 <211> 166
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Construcción sintética 14epi28

357

356

<400> 23

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

1 5 10 15

5 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

20 25 30

Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Ala

35 40 45

Gln Lys Val Gln Ala Ile Ser Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr

10 50 55 60

Ala Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu

85 90 95

15 Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu 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 Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val

20 130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu

145 150 155 160

Ser Leu Arg Ser Lys Glu

165

25

<210> 24

<211> 166

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

318

357

<220>

<223> Construcción sintética 14epi29

5 <400> 24
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Ala
35 40 45
Gln Lys Val Gln Ala Ile Ser Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr
50 55 60
Ala Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
15 65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
20 Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu
25 145 150 155 160
Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

30 <210> 25

359

<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética 14epi30

<400> 25

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

359

<210> 26

<211> 166

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi31

10

<400> 26

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

15 20 25 30

Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Ala

35 40 45

Gln Lys Val Gln Ala Ile Ala Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr

50 55 60

20 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu

85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met

25 100 105 110

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr

115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val

130 135 140

30 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu

36+

145 **150** **155** **160**

Ser Leu Arg Ser Lys Glu

165

5

```
<210> 27
<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

10

<223> Construcción sintética 14epi32

<400> 27

15

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

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

Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Leu

20

35	40	45
Gln Lys Val Pro Ala Ile Ser Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr		

50 55 60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

65 70 75 80

25

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu
85 90 95

Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met

100 105 110

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr

30

115 120 125

362

361

322

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

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

5 Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 28

10 <211> 166

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética 14epi33

<400> 28

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

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

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

25 Gln Lys Val Pro Ala Ile Ser Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr
50 55 60

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

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu
85 90 95

30 Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met

363

362

323

	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 Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val				
5	130		135		140
	Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu				
	145		150		155
	Ser Leu Arg Ser Lys Glu				160
		165			

10

<210> 29
<211> 166
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética 14epi34

20

<400> 29
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
25 Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Phe
35 40 45
Gln Lys Val Pro Ala Ile Ser Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
30 65 70 75 80

364

324

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
5 Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu
10 145 150 155 160
Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

15 <210> 30
<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética 14epi35

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

364

325

[illegible]

<210> 31

<211> 166

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi36

25

<400> 31

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

366

365

326

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

20

- <210> 32
- <211> 166
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

25

- <220>
- <223> Construcción sintética 14epi37

<400> 32

30

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

367

366

327

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

- <210> 33
- 25 <211> 166
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Construcción sintética 14epi38

208

36x

<400> 33

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

25

<210> 34

<211> 166

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

369

368

<220>

<223> Construcción sintética 14epi39

5 <400> 34

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

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

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

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

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

15 65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu

85 90 95
Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met

100 105 110

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

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

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu

25 145 150 155 160
Ser Leu Arg Ser Lys Glu

165

30 <210> 35

320

369

<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética 14epi42

<400> 35

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

371

370

<210> 36

<211> 166

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 25Epi08

10

<400> 36

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

1 5 10 15

Leu Met Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp

15 20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Glu Glu Glu Phe Asp Gly His Gln Phe

35 40 45

Gln Lys Thr Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Leu Ile Gln Gln Thr

50 55 60

20 Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asn Leu

85 90 95

Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Ile Ala Leu Met

25 100 105 110

Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr

115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val

130 135 140

30 Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu

372

371

332

145 150 155 160
Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

5

<210> 37
<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Construcción sintética 25Ep118

<400> 37

15

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

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

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

20

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

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

25

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asn Leu
85 90 95

Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Ile Ala Leu Met
100 105 110

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

30

373

372

333

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

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

5 Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 38

10 <211> 166

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética 25Epi19

<400> 38

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

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

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

25 Gln Lys Val Gln Ala Ile Phe Leu Leu Tyr Glu Leu Ile Gln Gln Thr
50 55 60

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

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asn Leu
85 90 95

30 Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Ile Ala Leu Met

374

373

334

	100		105		110
	Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr				
	115		120		125
	Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val				
5	130		135		140
	Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu				
	145		150		155
	Ser Leu Arg Ser Lys Glu				160
			165		

10

<210> 39
<211> 166
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética 25Epi20

20

<400> 39
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15
Leu Met Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
25 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Glu Glu Glu Phe Asp Gly His Gln Ala
35 40 45
Gln Lys Val Gln Ala Ile Ser Leu Leu Tyr Glu Leu Ile Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
30 65 70 75 80

375

374

335

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asn Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Ile Ala Leu Met
100 105 110
5 Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu
10 145 150 155 160
Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

15 <210> 40
<211> 166
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética 25Epi25

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

376

375

336

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

<210> 41
<211> 166
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética 25Epi26

25
<400> 41
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15
Leu Met Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
30 20 25 30

377

376

337

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

20

- <210> 42
- <211> 166
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

25

- <220>
- <223> Construcción sintética 25Epi27

<400> 42

30

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

378

377

338

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

- <210> 43
- 25 <211> 166
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Construcción sintética 25Epi28

379

378

<400> 43

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

1 5 10 15

5 Leu Met Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp

20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Glu Glu Glu Phe Asp Gly His Gln Ala

35 40 45

Gln Lys Val Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Leu Ile Gln Gln Thr

10 50 55 60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr

65 70 75 80

Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu

85 90 95

15 Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Ile Ala Leu Met

100 105 110

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

115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val

20 130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu

145 150 155 160

Ser Leu Arg Ser Lys Glu

165

25

<210> 44

<211> 166

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

380

379

<220>

<223> Construcción sintética 25Epi29

5 <400> 44
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15
Leu Met Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Glu Glu Glu Phe Asp Gly His Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Thr Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Leu Ile Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
15 65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asn Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Ile Ala Leu Met
100 105 110
20 Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Asp
25 145 150 155 160
Ser Leu Arg Ser Lys Glu
165

30 <210> 45

381

390

<211> 166
<212> PRT
<213> homo sapiens

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

30 <210> 46

382

381

<211> 165
<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <400> 46
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45
Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60
Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
15 65 70 75 80
Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95
Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110
20 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125
Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
25 145 150 155 160
Leu Arg Ser Lys Glu
165

30 <210> 47

383

382

<211> 165
<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <400> 47
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45
Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60
Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
15 65 70 75 80
Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95
Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110
20 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125
Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
25 145 150 155 160
Leu Arg Ser Lys Glu
165

30 <210> 48

384

393

<211> 166
<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <400> 48
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser His Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Glu Glu Glu Phe Asp Gly His Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Thr Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser
15 65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
20 Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys
25 145 150 155 160
Arg Leu Arg Arg Lys Asp
165

30 <210> 49

385

384

<211> 166
<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <400> 49
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15
Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Thr Trp Asp Glu Thr
15 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 Met Met Gln Glu Val Gly Val Glu Asp Thr Pro Leu Met
100 105 110
20 Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr 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 Ala Asn Leu Gln Glu
25 145 150 155 160
Arg Leu Arg Arg Lys Glu
165

30 <210> 50

386

385

<211> 166
<212> PRT
<213> homo sapiens

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

30 <210> 51

387

386

<211> 166
<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <400> 51
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Arg Asn Arg Arg Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Glu Phe Arg Phe Pro Glu Glu Glu Phe Asp Gly His Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Thr Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser
15 65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
20 Asn Glu Asp Phe Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Met Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Lys Lys
25 145 150 155 160
Gly Leu Arg Arg Lys Asp
165

30 <210> 52

388

387

<211> 166
<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <400> 52
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Asp Lys Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Leu Asp Glu Thr
15 65 70 75 80
Leu Leu Asp Glu Phe Tyr Ile Glu Leu Asp Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ser Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Ile Glu Ser Pro Leu Met
100 105 110
20 Tyr Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Ser Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ile Asn Leu Gln Lys
25 145 150 155 160
Arg Leu Lys Ser Lys Glu
165

30 <210> 53

389

388

<211> 166
<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <400> 53
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Leu Gly Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Asp Phe Arg Ile Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser
15 65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
20 Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Ile Glu Arg Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys
25 145 150 155 160
Arg Leu Arg Arg Lys Asp
165

30 <210> 54

390

38^a

<211> 166
<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <400> 54
Cys Asn Leu Ser Gln Thr His Ser Leu Asn Asn Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15
Leu Met Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Met Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asn Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
15 65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
20 Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Met Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys
25 145 150 155 160
Arg Leu Arg Arg Lys Asp
165

30 <210> 55

391

390

<211> 166
<212> PRT
<213> homo sapiens

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

30 <210> 56

392

391

<211> 166
<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <400> 56
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Asp Phe Gly Leu Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Thr Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser
15 65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asn Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Met Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
20 Asn Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130 135 140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Lys
25 145 150 155 160
Ile Leu Arg Arg Lys Asp
165

30 <210> 57

395

3a2

<211> 166
<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <400> 57
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
10 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe
35 40 45
Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr
50 55 60
Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Thr Trp Glu Gln Ser
15 65 70 75 80
Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu Asn Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95
Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met
100 105 110
20 Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
115 120 125
Leu Tyr Leu Thr 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 Lys Ile Phe Gln Glu
25 145 150 155 160
Arg Leu Arg Arg Lys Glu
165

30 <210> 58

394

<211> 167
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética IFN-alfa Con1

<400> 58

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

394

<210> 59

<211> 498

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi15c1

10

<400> 59

tgtgatctgc ctcagaccca cagcctgggt cacaggagga ccatgatgct cctggcacia 60

atgaggagaa tctctctttt ctctgtctg aaggacagac atgacttcag atttcccag 120

gaggagtttg atggcaacca cctccagaag gttcaagcta tcttcctttt ctatgagatg 180

15 atgcagcaga ccttcaacct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240

ctcctagaaa aattctacat tgaacttttc cagcaaatga atgacctgga agcctgcgtg 300

atgcaggagg ttggagtgga agagactccc ctgatgaatg tggactccat cctggctgtg 360

aggaaatact ttcaaagaat cactctttat ctgacagaga agaagtatag cccttggtgc 420

tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttctctt tttcaacaaa cttgcaagaa 480

20 agcttacgca gcaaggaa 498

<210> 60

<211> 501

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi15c2

30 <400> 60

396

395

358

atgtgtgatc tgcctcagac ccacagcctg ggtcacggtc gcacatgat gctcctggca 60
caaatgcgtc gcatctctct tttctcctgt ctgaaggacc gccatgactt ccgctttccc 120
caggaggagt ttgatggcaa ccacctccag aagggttcaag ctatcttcct tttctatgag 180
atgatgcagc agaccttcaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
5 accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaa tgaatgacct ggaagcctgc 300
gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact ccctgatga atgtggactc catcctggct 360
gtgcgtaaat actttcaaag catcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtccgcgc agaaatcatg cgtcttttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

10

<210> 61

<211> 501

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética 14epi15c3

<400> 61

20

atgtgtgatc tgcctcagac ccacagcctg ggtcacggtc gcacatgat gctcctggca 60
caaatgcgtc gcatctctct tttctcctgt ctgaaggaca gacatgactt cagatttccc 120
caggaggagt ttgatggcaa ccacctccag aagggttcaag ctatcttcct tttctatgag 180
atgatgcagc agaccttcaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaa tgaatgacct ggaagcctgc 300
25 gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact ccctgatga atgtggactc catcctggct 360
gtgaggaaat actttcaaag aatcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

30

<210> 62

397

<211> 498

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética 14epi18c1

<400> 62

tgtgatctgc ctcagaccca cagcctgggt cacaggagga ccatgatgct cctggcacia 60
 10 atgaggagaa tctctctttt ctctgtctg aaggacagac atgacttcag atttccccag 120
 gaggagtttg atggcaacca cgcccagaag gttcaagcta tcttcctttt ctatgagatg 180
 atgcagcaga ccttcaacct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
 ctctagaaa aattctacat tgaacttttc cagcaaatga atgacctgga agcctgcgtg 300
 atgcaggagg ttggagtggg agagactccc ctgatgaatg tggactccat cctggctgtg 360
 15 aggaaatact ttcaaagaat cactctttat ctgacagaga agaagtatag cccttgtgcc 420
 tgggagggttgc tcagagcaga aatcatgaga tctttctctt tttcaacaaa cttgcaagaa 480
 agcttacgca gcaaggaa 498

<210> 63

20 <211> 501

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción sintética 14epi18c2

<400> 63

agttgtgatc tgcctcagac ccacagcctg ggtcaccgtc gcaccatgat gctcctggca 60
 caaatgcgtc gcatctctct tttctctgt ctgaaggacc gccatgactt ccgctttccc 120
 30 caggaggagt ttgatggcaa ccacgcccag aaggttcaag ctatcttctt tttctatgag 180

398

atgatgcagc agaccttcaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaatgacct ggaagcctgc 300
gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact cccctgatga atgtggactc catcctggct 360
gtgcgtaaat actttcaacg catcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420
5 gcctgggagg ttgtccgcgc agaaatcatg cgctctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

- <210> 64
- <211> 501
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Construcción sintética 14epi18c3

15 <400> 64
agttgtgatc tgccctcagac ccacagcctg ggtcacccgc gcaccatgat gctcctggca 60
caaatgcgtc gcatctctct tttctcctgt ctgaaggaca gacatgactt cagatttccc 120
caggaggagt ttgatggcaa ccacgcccag aagggttcaag ctatcttcct tttctatgag 180
20 atgatgcagc agaccttcaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaatgacct ggaagcctgc 300
gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact cccctgatga atgtggactc catcctggct 360
gtgaggaaat actttcaaag aatcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
25 gaaagcttac gcagcaagga a 501

- <210> 65
- <211> 498
- <212> ADN
- 30 <213> Secuencia artificial

399

<220>

<223> Construcción sintética 14epi20c1

5 <400> 65

tgtgatctgc ctcagaccca cagcctgggt cacaggagga ccatgatget cctggcacia 60
 atgaggagaa tctctctttt ctctgtcttg aaggacagac atgacttcag atttccccag 120
 gaggagtttg atggcaacca cgcccagaag gttcaagcta tctctctttt ctatgagatg 180
 atgcagcaga ccttcaacct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
 10 ctctagaaa aattctacat tgaacttttc cagcaaatga atgacctgga agcctgcgtg 300
 atgcaggagg ttggagtgga agagactccc ctgatgaatg tggactccat cctggctgtg 360
 aggaaatact ttcaaagaat cactctttat ctgacagaga agaagtatag cccttggtgcc 420
 tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttctctt tttcaacaaa cttgcaagaa 480
 agcttacgca gcaaggaa 498

15

<210> 66

<211> 501

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética 14epi20c2

<400> 66

25 atgtgtgatc tgccctcagac ccacagcctg ggtcacogtc gcaccatgat gctcctggca 60
 caaatgcgtc gcatctctct tttctcctgt ctgaaggacc gccatgactt ccgctttccc 120
 caggaggagt ttgatggcaa ccacgcccag aaggttcaag ctatctctct tttctatgag 180
 atgatgcagc agaccttcaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
 accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaatgacct ggaagcctgc 300
 30 gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact cccctgatga atgtggactc catcctggct 360

399

360

gtgcgtaaact actttcaacg catcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtccgcgc agaaatcatg cgctctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

- 5 <210> 67
- <211> 501
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Construcción sintética 14epi20c3

<400> 67
atgtgtgatc tgcctcagac ccacagcctg ggtcacgctc gcacccatgat gctcctggca 60
15 caaatgcgtc gcatctctct tttctcctgt ctgaaggaca gacatgactt cagatttccc 120
caggaggagt ttgatggcaa ccacgcccag aagggttcaag ctatctctct tttctatgag 180
atgatgcagc agaccttcaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaatgacct ggaagcctgc 300
gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact cccctgatga atgtggactc catcctggct 360
20 gtgaggaaat actttcaaag aatcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

- 25 <210> 68
- <211> 498
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 30 <223> Construcción sintética 14epi28c1

401

400

<400> 68

tgtgatctgc ctcagaccca cagcctgggt cacaggagga ccatgatgct cctggcacia 60
 atgaggagaa tctctctttt ctctgtctg aaggacagac atgacttcag atttccccag 120
 5 gaggagtttg atggcaacca cgcccagaag gttcaagcta tctctctttt ctatgagatg 180
 atgcagcaga ccgctaacct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
 ctccatagaaa aattctacat tgaacttttc cagcaaatga atgacctgga agcctgcgtg 300
 atgcaggagg ttggagtggg agagactccc ctgatgaagg aggactccat cctggctgtg 360
 aggaaatact ttcaaagaat cactctttat ctgacagaga agaagtatag cccttgtgcc 420
 10 tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttctctt tttcaacaaa cttgcaagaa 480
 agcttacgca gcaaggaa 498

<210> 69

<211> 501

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi28c2

20

<400> 69

atgtgtgatc tgcctcagac ccacagcctg ggtcacccgc gcaccatgat gctcctggca 60
 caaatgcgtc gcatctctct tttctcctgt ctgaaggacc gccatgactt ccgctttccc 120
 caggaggagt ttgatggcaa ccacgcccag aaggttcaag ctatctctct tttctatgag 180
 25 atgatgcagc agaccgctaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
 accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaatgacct ggaagcctgc 300
 gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact cccctgatga aggaggactc catcctggct 360
 gtgcgtaaat actttcaacg catcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420
 gcctgggagg ttgtccgcgc agaaatcatg cgctctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
 30 gaaagcttac gcagcaagga a 501

402

491

<210> 70

<211> 501

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi28c3

10 <400> 70

atgtgtgatc tgcctcagac ccacagcctg ggtcaccgtc gcaccatgat gctcctggca 60

caaatgcgtc gcatctctct tttctcctgt ctgaaggaca gacatgactt cagatttccc 120

caggaggagt ttgatggcaa ccacgcccag aagggttcaag ctatctctct tttctatgag 180

atgatgcagc agaccgctaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240

15 accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaatgacct ggaagcctgc 300

gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact cccctgatga aggaggactc catcctggct 360

gtgaggaaat actttcaaag aatcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420

gcctgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480

gaaagcttac gcagcaagga a 501

20

<210> 71

<211> 498

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética 14epi32c1

<400> 71

30 tgtgatctgc ctcagaccca cagcctgggt cacaggagga ccatgatgct cctggcacia 60

463

402

atgaggagaa tctctctttt ctctgtctg aaggacagac atgacttcag atttccccag 120
gaggagtttg atggcaacca cctccagaag gtccagcta tctctctttt ctatgagatg 180
atgcagcaga ccttcaacct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
ctcctagaaa aattctacat tgaacttttc cagcaaatga atgacctgga agcctgcgtg 300
5 atgcaggagg ttggagtgga agagactccc ctgatgaagg aggactccat cctggctgtg 360
aggaaatact ttcaaagaat cactctttat ctgacagaga agaagtatag cccttgtgcc 420
tgggagggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttctctt tttcaacaaa cttgcaagaa 480
agcttacgca gcaaggaa 498

- 10 <210> 72
<211> 501
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

- 15 <220>
<223> Construcción sintética 14epi32c2

<400> 72
atgtgtgatc tgcctcagac ccacagcctg ggtcaccgtc gcaccatgat gctcctggca 60
20 caaatgcgtc gcatctctct tttctcctgt ctgaaggacc gccatgactt ccgctttccc 120
caggaggagt ttgatggcaa ccacctccag aaggttccag ctatctctct tttctatgag 180
atgatgcagc agaccttcaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaatgacct ggaagcctgc 300
gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact cccctgatga aggaggactc catcctggct 360
25 gtgcgtaaat actttcaacg catcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtccgcgc agaaatcatg cgctctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

- <210> 73
30 <211> 501

404

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética 14epi32c3

<400> 73

atgtgtgatc tgcctcagac ccacagcctg ggtcacgctc gcaccatgat gctcctggca 60
caaatgcgtc gcatctctct tttctcctgt ctgaaggaca gacatgactt cagatttccc 120
10 caggaggagt ttgatggcaa ccacctccag aagggtccag ctatctctct tttctatgag 180
atgatgcagc agaccttcaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaatgacct ggaagcctgc 300
gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact cccctgatga aggaggactc catcctggct 360
gtgaggaaat actttcaaag aatcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420
15 gcctgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

<210> 74

<211> 498

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción sintética 14epi35c1

<400> 74

tgtgatctgc ctcagaccca cagcctgggt cacaggagga ccatgatgct cctggcacia 60
atgaggagaa tctctctttt ctctgtctg aaggacagac atgacttcag atttccccag 120
gaggagtttg atggcaacca cctccagaag gctccagcca tctctgtcct ccatgagatg 180
30 atgcagcaga ccttcaacct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240

404

ctcctagaaa aattctacat tgaacttttc cagcaaatga atgacctgga agcctgcgtg 300
atgcaggagg ttggagtgga agagactccc ctgatgaagg aggactccat cctggctgtg 360
aggaaatact ttcaaagaat cactctttat ctgacagaga agaagtatag cccttgtgcc 420
tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttctctt tttcaacaaa cttgcaagaa 480
5 agcttacgca gcaaggaa 498

<210> 75

<211> 501

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi35c2

15 <400> 75

atgtgtgatc tgcctcagac ccacagcctg ggtcacccgtc gcaccatgat gctcctggca 60
caaatgcgtc gcatctctct tttctcctgt ctgaaggacc gccatgactt ccgctttccc 120
caggaggagt ttgatggcaa ccacctccag aaggctccag ccatctctgt cctccatgag 180
atgatgcagc agaccttcaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
20 accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaatgacct ggaagcctgc 300
gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact cccctgatga aggaggactc catcctggct 360
gtgcgtaaat actttcaacg catcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtccgcgc agaaatcatg cgctctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

25

<210> 76

<211> 501

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

406

405

<220>

<223> Construcción sintética 14epi35c3

<400> 76

5 atgtgtgata tgcctcagac ccacagcctg ggtcacgctc gcaccatgat gctcctggca 60
caaatgcgtc gcatctctct tttctcctgt ctgaaggaca gacatgactt cagatttccc 120
caggaggagt ttgatggcaa ccacctccag aaggctccag ccatctctgt cctccatgag 180
atgatgcagc agaccttcaa cctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaatgacct ggaagcctgc 300
10 gtgatgcagg aggttggagt ggaagagact cccctgatga aggaggactc catcctggct 360
gtgaggaaat actttcaaag aatcactctt tatctgacag agaagaagta tagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

15 <210> 77

<211> 498

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética 25epi18c1

<400> 77

tgtgatctgc ctcagacca cagcctgagt aacaggagga ctctgatgct catggcacia 60
25 atgaggagaa tctctccttt ctctgcctg aaggacagac atgatttcgg attccccgag 120
gaggagtttg atggccacca ggcccagaag actcaagcca tctccgttct ccatgagctg 180
atccagcaga ccttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
ctcctagaaa aattctacat tgaacttttc cagcaaatga ataacctgga agcatgtgtg 300
atacaggagg ttgggggtgga agagattgcc ctgatgaatg tggactccat cctggctgtg 360
30 aggaaatact tccgtcgcat cactctctat ctgacagaga agaaatacag cccttgtgcc 420

467

tgaggaggtg tcagagcaga aatcatgaga tctttctctt tttcaacaaa cttgcaagaa 480
agcttacgca gcaaggaa 498

<210> 78

5 <211> 501

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética 25epi18c2

<400> 78

atgtgtgatc tgcctcagac ccacagcctg agtaaccgtc gcactctgat gctcatggca 60
caaatgcgtc gcatctctcc tttctcctgc ctgaaggacc gccatgattt cggattcccc 120
15 gaggaggagt ttgatggcca ccaggcccag aagactcaag ccatctccgt tctccatgag 180
ctgatccagc agaccttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaataacct ggaagcatgt 300
gtgatacagg aggttggggt ggaagagatt gccctgatga atgtggactc catcctggct 360
gtgcgtaaat acttcgctcg catcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt 420
20 gcctgggagg ttgtccgcgc agaaatcatg cgctctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

<210> 79

<211> 501

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 25epi18c3

30

407

<400> 79

atgtgtgate tgcctcagac ccacagcctg agtaaccgtc gcactctgat gctcatggca 60
caaatgcgtc gcatctctcc tttctcctgc ctgaaggaca gacatgattt cggattcccc 120
gaggaggagt ttgatggcca ccaggcccag aagactcaag ccatctccgt tctccatgag 180
5 ctgatccagc agaccttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaa tgaataacct ggaagcatgt 300
gtgatacagg aggttggggg ggaagagatt gccctgatga atgtggactc catcctggct 360
gtgaggaaat acttccgtcg catcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
10 gaaagcttac gcagcaagga a 501

<210> 80

<211> 498

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 25epi19c1

20 <400> 80

tgtgatctgc ctcagacca cagcctgagt aacaggagga ctctgatgct catggcacia 60
atgaggagaa tctctccttt ctctgcctg aaggacagac atgatttcgg attccccgag 120
gaggagtttg atggccacca ggcccagaag gttcaagcca tcttccttct ctatgagctg 180
atccagcaga ccttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
25 ctctagaaa aattctacat tgaacttttc cagcaaatga ataacctgga agcatgtgtg 300
atacaggagg ttggggtgga agagattgcc ctgatgaatg tggactccat cctggctgtg 360
aggaaatact tccgtcgcat cactctctat ctgacagaga agaaatacag cccttgtgcc 420
tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttctctt tttcaacaaa cttgcaagaa 480
agcttacgca gcaaggaa 498

30

409

408

<210> 81
<211> 501
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Construcción sintética 25epi19c2

<400> 81

10 atgtgcgacc tgccgcagac ccactccctg tccaaccgtc gcaccctgat gctgatggct 60
cagatgcgtc gcatttcccc gttctcctgc cttaaggacc gtcacgactt cggtttcccc 120
gaagaggaat ttgacggtca ccaggctcag aaagttcagg ctatcttctt gctgtacgag 180
ctcatccagc aaaccttcaa cctgtttctcc accaaagact ctccgcggc ttgggacgaa 240
accctgctgg agaaatttta catcgaactg ttccagcaaa tgaacaatct agaagcatgt 300
15 gttatccagg aagttggtgt tgaagagatc gctctgatga acgttgactc catcctggct 360
gttcgtaaata acttccgctg catcaccctg tacctgaccg aaaaaaagta ctccccgtgc 420
gcttggaag ttgtacgtgc tgaaatcatg agatctttct ccttctccac caacctgcag 480
gaatccctgc gttccaaaga a 501

20 <210> 82
<211> 501
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Construcción sintética 25epi19c3

<400> 82

atgtgtgatc tgccgcagac ccacagcctg agtaaccgtc gcactctgat gctcatggca 60
30 caaatgcgtc gcatctctcc tttctcctgc ctgaaggaca gacatgattt cggattcccc 120

410

40d

370

gaggaggagt ttgatggcca ccaggcccag aagggttcaag ccatcttctt tctctatgag 180
ctgatccagc agaccttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaaa tgaataacct ggaagcatgt 300
gtgatacagg aggttggggg ggaagagatt gccctgatga atgtggactc catcctggct 360
5 gtgaggaaat acttccgtcg catcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

<210> 83

10 <211> 498

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética 25epi26c1

<400> 83

tgtgatctgc ctcagaccca cagcctgagt aacaggagga ctctgatgct catggcacia 60
atgaggagaa tctctccttt ctctgcctg aaggacagac atgatttcgg attccccgag 120
20 gaggagtttg atggccacca ggcccagaag gttcaagcca tctccgttct ccatgagctg 180
atccagcaga ccttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
ctcctagaaa aattctacat tgaactttac cagcaactga atgacctgga agcatgtgtg 300
atacaggagg ttggggtgga agagattgcc ctgatgaatg tggactccat cctggctgtg 360
aggaaatact tccgtcgcat cactctctat ctgacagaga agaaatacag cccttgtgcc 420
25 tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttctctt tttcaacaaa cttgcaagaa 480
agcttacgca gcaaggaa 498

<210> 84

<211> 501

30 <212> ADN

411

410

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 25epi26c2

5

<400> 84

atgtgtgatac tgcctcagac ccacagcctg agtaaccgtc gcactctgat gctcatggca 60
caaatgcgtc gcatctctcc tttctcctgc ctgaaggacc gccatgattt cggattcccc 120
gaggaggagt ttgatggcca ccaggcccag aagggttcaag ccatctccgt tctccatgag 180
10 ctgatccagc agaccttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt taccagcaac tgaatgacct ggaagcatgt 300
gtgatacagg aggttggggt ggaagagatt gccctgatga atgtggactc catcctggct 360
gtgcgtaaat acttccgctg catcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtccgctc agaaatcatg cgctctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
15 gaaagcttac gcagcaagga a 501

<210> 85

<211> 501

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 25epi26c3

25 <400> 85

atgtgtgatac tgcctcagac ccacagcctg agtaaccgtc gcactctgat gctcatggca 60
caaatgcgtc gcatctctcc tttctcctgc ctgaaggaca gacatgattt cggattcccc 120
gaggaggagt ttgatggcca ccaggcccag aagggttcaag ccatctccgt tctccatgag 180
ctgatccagc agaccttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
30 accctcctag aaaaattcta cattgaactt taccagcaac tgaatgacct ggaagcatgt 300

412

911

gtgatacagg aggttggggt ggaagagatt gccctgatga atgtggactc catcctggct 360
gtgaggaaat acttccgtcg catcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt 420
gcctgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480
gaaagcttac gcagcaagga a 501

5

- <210> 86
- <211> 498
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

10

- <220>
- <223> Construcción sintética 25epi29c1

<400> 86

15

tgtgatctgc ctcagaccca cagcctgagt aacaggagga ctctgatgct catggcacia 60
atgaggagaa tctctccttt ctctgcctg aaggacagac atgatttcgg attccccgag 120
gaggagtttg atggccacca gttccagaag actcaagcca tctccgttct ccatgagctg 180
atccagcaga ccttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
ctcctagaaa aattctacat tgaacttttc cagcaaatga ataacctgga agcatgtgtg 300
atacaggagg ttggggtgga agagattgcc ctgatgaatg tggactccat cctggctgtg 360
aggaataact tccgtcgcat cactctctat ctgacagaga agaatacag cccttgtgcc 420
tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttctctt tttcaacaaa cttgcaagat 480
agcttacgca gcaaggaa 498

20

25

- <210> 87
- <211> 501
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

30

<220>

413

412

<223> Construcción sintética 25epi29c2

<400> 87

atgtgcgacc tgcgcgagac ccaactccctg tccaaccgtc gtaccctgat gctgatggct 60
5 cagatgcgca gaatctcccc gttctcctgc cttaaggacc gtcacgactt cggtttccca 120
gaagaagaat ttgacggtca ccagttccag aaaaccagg ctatctccgt tcttcatgaa 180
ctgatccagc agaccttcaa cctgtttctcc accaaagact cctccgcggc ttgggacgaa 240
accctgctgg aaaaattcta catcgaactg tttcagcaga tgaacaacct agaggcatgt 300
gttatccagg aagtaggtgt tgaggaaatc gctctgatga acgttgactc catcctggct 360
10 gtccggaaat acttccgtcg catcacctcg tacctgaccg aaaaaaata ctccccgtgc 420
gcttgggaag ttgtgcgcgc tgaaatcatg cgttccttct ctttctccac caacctgcag 480
gactccctgc gttccaaaga a 501

<210> 88

15 <211> 501

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Construcción sintética 25epi29c3

<400> 88

atgtgtgatc tgcctcagac ccacagcctg agtaaccgtc gcactctgat gctcatggca 60
caaatgcgtc gcatctctcc tttctcctgc ctgaaggaca gacatgattt cggattcccc 120
25 gaggaggagt ttgatggcca ccagttccag aagactcaag ccatctccgt tctccatgag 180
ctgatccagc agaccttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag 240
accctcctag aaaaattcta cattgaactt ttccagcaa tgaataacct ggaagcatgt 300
gtgatacagg aggttggggg ggaagagatt gccctgatga atgtggactc catcctggct 360
gtgaggaaat acttccgtcg catcactctc tatctgacag agaagaaata cagcccttgt 420
30 gcctgggagg ttgtcagagc agaaatcatg agatctttct ctttttcaac aaacttgcaa 480

411

413

gatagcttac gcagcaagga a

501

<210> 89

<211> 579

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética 14epi18m2

10

<220>

<221> CDS

<222> (57) ... (560)

15 <400> 89

caattgtgag cggataacaa tttcacacag aattcattaa agaggagaaa ttaact atg 59

Met

1

20 tgc gac ctg ccg cag acc cac tcc ctt gga cac cgt cgg acc atg atg 107

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly His Arg Arg Thr Met Met

5

10

15

ctg cta gct cag atg cgt aga ata tcc ctg ttc tcc tgc ctt aag gac 155

25 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

20

25

30

cgt cac gac ttc cgt ttc ccc cag gaa gaa ttt gat ggt aac cac gct 203

Arg His Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn His Ala

30

35

40

45

415

444

	cag aaa gtt cag gct atc ttc ctg ttt tac gaa atg atg cag caa acc	251
	Gln Lys Val Gln Ala Ile Phe Leu Phe Tyr Glu Met Met Gln Gln Thr	
	50 55 60 65	
5		
	ttc aac ctg ttc tcc acc aaa gac tcc tcc gcg gct tgg gac gaa acc	299
	Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr	
	70 75 80	
10		
	ctg ctg gaa aaa ttc tac atc gaa ctg ttc cag cag atg aac gat cta	347
	Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Ile Glu Leu Phe Gln Gln Met Asn Asp Leu	
	85 90 95	
	gaa gca tgc gtt atg cag gaa gta ggt gtt gaa gag acc cca ctg atg	395
15	Glu Ala Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu Met	
	100 105 110	
	aac gtt gac tcc atc ctg gct gtc cgg aaa tac ttc cag cgt atc acc	443
	Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr	
20	115 120 125	
	ctg tac ctg act gaa aaa aaa tac tcc ccg tgc gct tgg gaa gtt gtg	491
	Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val	
	130 135 140 145	
25		
	cgc gct gaa atc atg cgt tcc ttc tcc ttc tcc acc aac ctg cag gaa	539
	Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Phe Ser Thr Asn Leu Gln Glu	
	150 155 160	
30	tcc ctg cgt tcc aaa gaa taa taagcttaat tagctgagc	579

416

415

Ser Leu Arg Ser Lys Glu *
165

- 5 <210> 90
- <211> 579
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Construcción sintética 25epi19m

- <220>
- <221> CDS
- 15 <222> (57) ... (560)

<400> 90
caattgtgag cggataacaa tttcacacag aattcattaa agaggagaaa ttaact atg 59
Met

20 1

tgc gac ctg ccg cag acc cac tcc ctt tct aac cgt aga acc ctg atg 107
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu Met
5 10 15

25
ctg atg gct cag atg cgt cgt att tct ccg ttc tct tgc ctt aag gat 155
Leu Met Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

30 cgt cac gac ttc ggt ttc cca gaa gag gaa ttt gac ggt cac cag gct 203

117

377

	Arg	His	Asp	Phe	Gly	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Phe	Asp	Gly	His	Gln	Ala		
	35					40					45							
	cag	aaa	gtt	cag	gct	atc	ttc	ctg	ctg	tac	gag	ctc	atc	cag	caa	acc	251	
5	Gln	Lys	Val	Gln	Ala	Ile	Phe	Leu	Leu	Tyr	Glu	Leu	Ile	Gln	Gln	Thr		
	50					55					60					65		
	ttc	aac	ctg	ttc	tct	acc	aaa	gac	tct	tcc	gcg	gct	tgg	gac	gaa	acc	299	
	Phe	Asn	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser	Ser	Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Thr		
10	70					75					80							
	ctg	ctg	gag	aaa	ttt	tac	atc	gaa	ctg	ttc	cag	caa	atg	aac	aat	cta	347	
	Leu	Leu	Glu	Lys	Phe	Tyr	Ile	Glu	Leu	Phe	Gln	Gln	Met	Asn	Asn	Leu		
	85					90					95							
15																		
	gaa	gca	tgt	gtt	atc	cag	gaa	gtt	ggt	gtt	gaa	gag	atc	gct	ctg	atg	395	
	Glu	Ala	Cys	Val	Ile	Gln	Glu	Val	Gly	Val	Glu	Glu	Ile	Ala	Leu	Met		
	100					105					110							
	aac	gtt	gac	tcc	atc	ctg	gct	gtt	cgt	aaa	tac	ttc	cgt	cgc	atc	acc	443	
20	Asn	Val	Asp	Ser	Ile	Leu	Ala	Val	Arg	Lys	Tyr	Phe	Arg	Arg	Ile	Thr		
	115					120					125							
	ctg	tac	ctg	acc	gaa	aaa	aag	tac	tcc	ccg	tgc	gct	tgg	gaa	gtt	gta	491	
25	Leu	Tyr	Leu	Thr	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser	Pro	Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val		
	130					135					140					145		
	cgt	gct	gaa	atc	atg	aga	tct	ttc	tcc	ttc	tcc	acc	aac	ctg	cag	gaa	539	
	Arg	Ala	Glu	Ile	Met	Arg	Ser	Phe	Ser	Phe	Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Glu		
30	150					155					160							

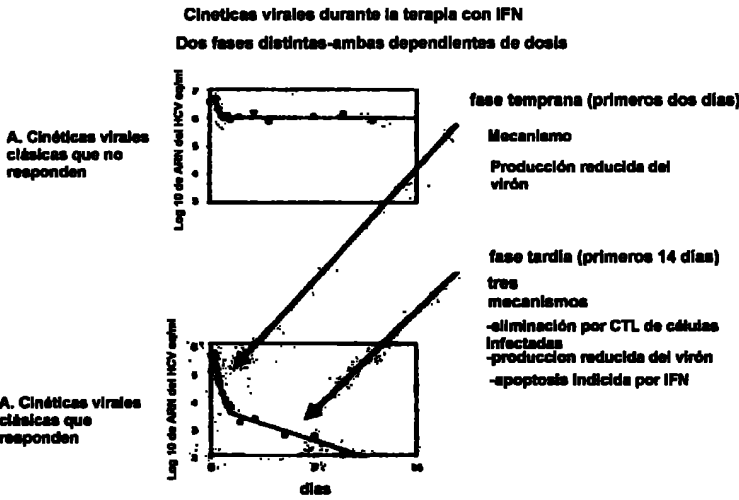


Fig 1

```

      *          20          *          40          *          60          *          80
14epi18 : CDLPQTHSLGHRPTMMLLAQMRRISLFSCIKDRHDFRFPQEEFDGNHAQKVQAIFLFYEMMQOTFNLFTSKDSSAAWDETLLLEKF : 85
hIFNa-1a : ...E...DN...L.....S...PS...M....G.....QF..AP..SVLH..LI..I...T.....D...D... : 85
hIFNa-2b : .....S...L.....G.....G.....QF..AET.PVLH..I..I.....D... : 84
hIFNa-4b : .....N..ALI...G...H.....G..E....HQF..T...SVLH..I.....E.....EQS..... : 85
hIFNa-5 : .....SN...L..IM...G...P.....G.....QF..A...SVLH..I.....T.....D... : 85
hIFNa-6 : .....QF..AE...SVLH..VI.....V....R..D..L : 85
hIFNa-7 : .....RN..ALI...G...P.....E....E....HQF..T...SVLH..I.....E.....EQS..... : 85
hIFNa-8b : .....N..ALI...P.....F.....DKQF..A...SVLH..I.....L.....DE : 85
hIFNa-10a : .....N..ALI..G..G...P.....I.....QF..A...SVLH..I.....E.....EQS..... : 85
hIFNa-14a : ..N.S....NN...L..M....P.....E....QF..A...SVLH..I.....N..... : 85
hIFNa-16 : .....N..ALI...G...H.....Y..G...V....QF..A...SA..H..I.....D... : 85
hIFNa-17b : .....N..ALI...G...P.....GL.....QF..T...SVLH..I.....E.....EQS..... : 85
hIFNa-21b : .....N..ALI...G...P.....G.....QF..A...SVLH..I.....T.EQS..... : 85

      *          100         *          120         *          140         *          160
14epi18 : YIELFQQMNDLEACVMQEVGVEETPLMNVDSILAVRKYFQRITLYLTEKKYSPCAWEVVRRAEIMRSFSFSTNLQESLRKE : 166
hIFNa-1a : CT..Y..L.....ER.G.....A.....K...R.....L:L.....R..R... : 166
hIFNa-2b : .T..Y..L.....I.G...T...KE.....L.....L..... : 165
hIFNa-4b : ST..Y..L.....I.....L.....KR..R..E : 166
hIFNa-5 : .T..Y..L.....M.....D.....T.....L.A....R..R... : 166
hIFNa-6 : .T..Y..L.....W.GG....E.....S.R....R..R... : 166
hIFNa-7 : ST..Y..L.....I.....E.F.....M.....KKG..R..D : 166
hIFNa-8b : ...D..L...S.....I.S...YE.....S.....L.I...KR.K... : 166
hIFNa-10a : ST..Y..L.....I.....E.....I.R.....L.....KR..R..E : 166
hIFNa-14a : .....I.....E.....M.....KR..R..D : 166
hIFNa-16 : .....L.....T.....IA...E.....MG.....KG..R..D : 166
hIFNa-17b : ST..Y..L..N....I...M.....E.....L.....KI..R..D : 166
hIFNa-21b : ST..N..L.....I.....K.....L.KIF..R..R... : 166

```

Fig. 2

Fig. 3

走

Matriz de sustitución BLOSUM62

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	B	Z	X	*
A	4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	0	-3	-2	0	-2	-1	0	-4
R	-1	5	0	-2	-3	1	0	-2	0	-3	-2	2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3	-1	0	-1	-4
N	-2	0	6	-1	-3	0	0	1	-3	-3	0	-2	-3	-2	1	0	-4	-2	-3	3	0	-3	-4	
D	-2	-3	1	6	-3	0	2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-4	-1	0	-1	-4	-3	-3	4	1	-1	-4
C	0	-3	-3	-3	0	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-3	-1	-3	-3	-2	-4
Q	-1	1	0	0	-3	6	2	-2	0	-3	-2	1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	2	0	3	-1	-4
E	-1	0	0	2	-4	2	5	-2	0	-3	-3	1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2	1	4	-1	-4
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-1	-4
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	6	-3	-3	1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	2	-3	0	0	-1	-4
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	2	-3	0	-1	-3	-2	-1	0	-1	0	-3	-3	-1	-4	
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4	2	2	0	-3	-2	-4	-2	-1	3	-4	-3	-1	-4
K	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4	2	2	0	-3	-2	-4	-2	-1	3	-4	-3	-1	-4
M	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	0	1	3	0	0	0	-2	-4	-2	-1	1	4	-3	-1	-4
F	-2	-3	-3	-3	-3	-3	-4	-3	-4	0	0	0	0	0	-4	-2	-1	3	1	-3	-4	-3	-4	
P	-1	-3	-3	-4	-4	-1	-4	-3	-3	-3	-2	-1	-2	-4	7	-1	-1	-4	-3	-3	-4	-3	-4	
S	-2	-3	3	0	-1	0	0	1	-3	-3	0	-1	-3	-2	-1	0	0	-3	-2	-3	0	-1	0	-4
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	0	-3	-2	0	-1	0	-4	
W	-3	-2	-3	-4	-4	-2	-3	-4	-3	-2	-3	-1	-3	-3	-2	-2	-1	0	0	-3	-3	-1	-4	

Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	-1	-3	-2	-1	-4
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4	-3	-2	-1	-4
B	-2	-1	3	4	-3	0	1	-1	0	-3	-4	0	-3	-3	-2	0	-1	-4	-3	-3	4	1	-1	-4
Z	-1	0	0	1	-3	3	4	-2	0	-3	-3	1	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2	1	4	-1	-4
X	0	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-2	0	0	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-4
'	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-1	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	1

Fig. 4

A.

C	L	K	D	R	H	D	F	R	F	P	Q	E	E	F	D	G	N	H	F	Q	K	V	Q
	L	K	D	R	H	D	F	R	F	P	Q	E	E	F	D	G	N	Q	F	Q	K		
	4	5	6	5	8	6	6	5	6	7	5	5	5	6	6	6	6	0	6	5	5		

B.

C	L	K	D	R	H	D	F	R	F	P	Q	E	E	F	D	G	N	H	F	Q	K
	L	K	D	R	H	D	F	G	F	P	Q	E	E	F	G	N	Q	F	Q	K	A
	4	5	6	5	8	6	6	-2	6	7	5	5	5	6	-1	0	0	-1	-3	1	-1

= 67

C.

C	L	K	D	R	H	D	F	R	F	P	Q	E	E	F	D	G	N	H	F	Q	K	
	L	K	D	R	H	D	F	G	F	P	Q	E	E	F	-	G	N	Q	F	Q	K	A
	4	5	6	5	8	6	6	-2	6	7	5	5	5	6	-12	6	6	0	6	5	5	= 88

Fig. 5

424

8/9

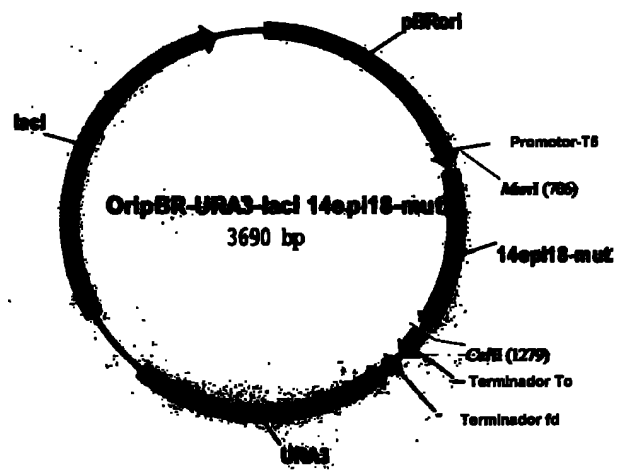


FIG.6

425

7/9

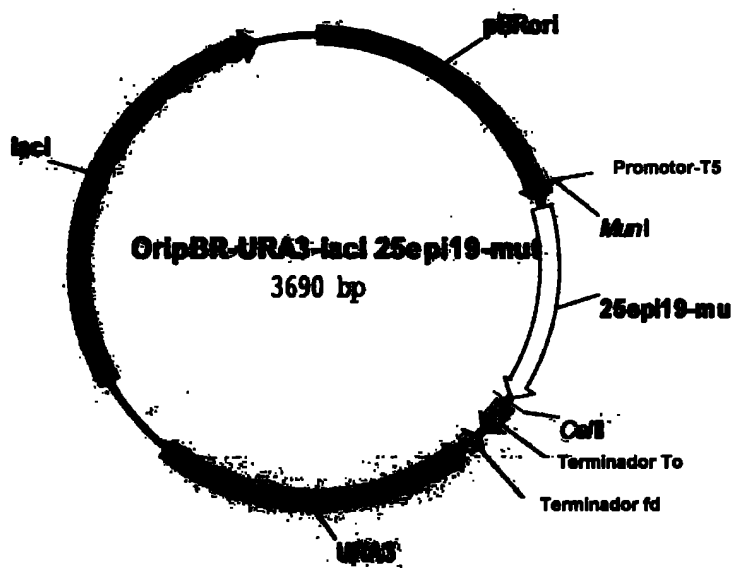


Fig.7

288

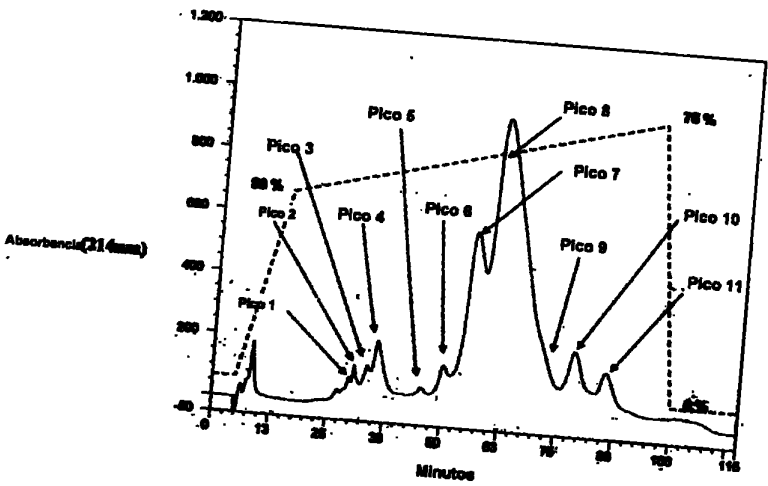


Fig.8

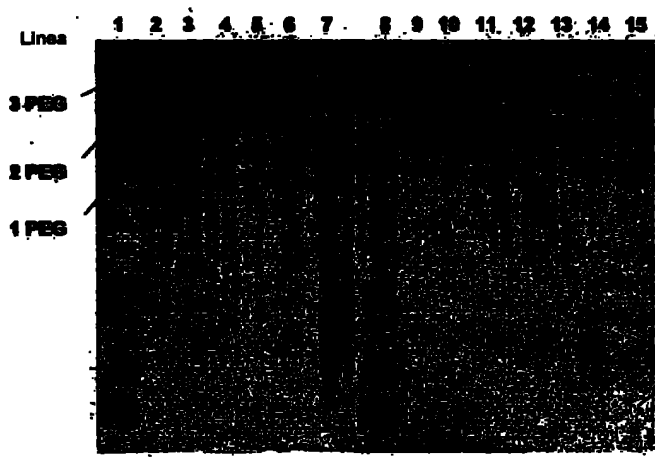


Fig 9

7/8

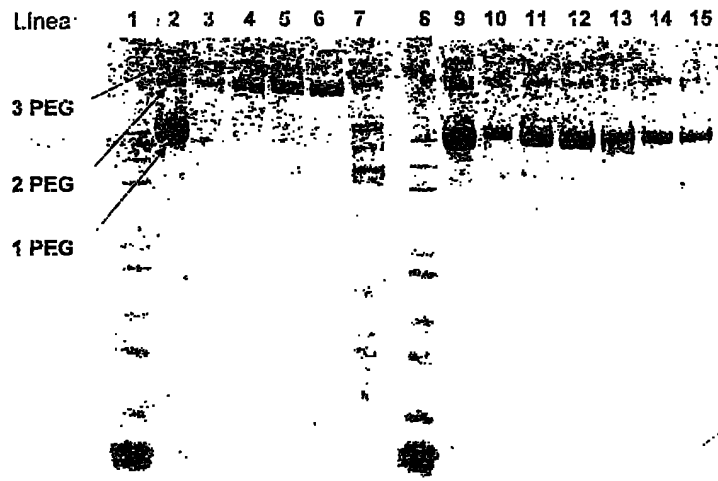


Fig. 9

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X] 1
- ◆ Descripción de la invención [X]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X] 2

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Fernando B
Firma Responsable

Fecha 30-nov-6

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

NOVEDAD DE LA INVENCION**REIVINDICACIONES**431
429

- 1.- Un polipéptido aislado o recombinante que comprende una secuencia la
diere en 1 a 16 posiciones de aminoácidos a partir del SEQ ID NO: 1 y (b)
e una o más sustituciones en relación con SEQ ID NO: 1 seleccionada a partir
que consiste de F48A/L; V51P; F55A; F65A; F68P; L111A; y V114P; dicho
p exhibe actividad antiviral.
- 2.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado
porque comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: en 1 a 10
de aminoácidos.
- 3.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado
porque comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 1 en 1 a 8
s de aminoácidos.
- 4.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado
porque comprende adicionalmente una o más sustituciones seleccionadas a
grupo que consiste de H47Q; V51A; Q52P/E; A53T; F55S; L56V; F57L; Y58H;
I3K; V114E; y E 160D.
- 5.- El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado
porque comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste
D NO: 2-35.

279

432
430

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
MAXYGEN, INC.
F HOFFMANN LA ROCHE AG

REFERENCIA	Radicación No.	06 121175
	Solicitud internacional	PCT/US2005/017471
	Fecha inicio fase nacional	19/12/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	

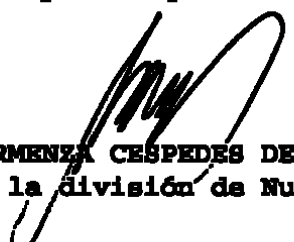
- - - 14708

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 22 Dic 2006 salvado