

Marcas – Patentes
Modelos – Diseños
Nombres Comerciales – Enseñas
Propiedad Intelectual
Registros en el Exterior
Registros Sanitarios INVIMA – ICA
Acciones Judiciales – Administrativas
Derecho Comercial – Industrial
Asesoría – Contratos – Otros
Corresponsalia a Nivel Mundial

MDE



Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

Abogados Consultores – Marcas y Patentes

Bogotá D.C. - Colombia
Avda. Kra. 24 Park Way No. 37 – 31 Of.
202
Tels. (571) 2444096 – 3690624
Fax (571) 2442496 A.A. No. 6207
E-mail: mde@mdelaw.com
mdelawof@cablenet.co
mdeabogados@cablenet.co

Miembros ACP – ASIPI – AIPPI

Bogotá D.C., 22 de agosto de 2012

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-062159- -00006-0000

Fecha: 2012-08-22 15:29:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 523 RESPUESTA Folios: 115

Act. 523 RESPUESTA

Folios 114

Señores

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Ciudad

REFERENCIA: Expediente No. 07 – 062.159

TÍTULO: “UNA MUTEINA RECOMBINANTE DEL INTERFERON ALFA HUMANO GLICOSILADO, UN GEN QUE CODIFICA PARA DICHA MUTEINA, UN METODO DE PRODUCCION DE DICHO GEN, UN METODO PARA OBTENER UNA CELULA EUCARIOTA PRODUCTORA DE DICHA MUTEINA UN METODO PARA PRODUCIR DICHA MUTEINA, UN PROCEDIMIENTO PARA PURIFICAR DICHA MUTEINA, UNA COMPOSICION FARMACEUTICA DE DICHA MUTEINA, EL USO DE DICHA MUTEINA PARA ELABORAR UN MEDICAMENTO”

SOLICITANTE: PROTECH PHARMA S.A

TRÁMITE: Respuesta a Concepto Técnico notificado mediante Oficio No. 8705 del 30 de mayo de 2012.

JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS, en mi condición de apoderado de la sociedad **PROTECH PHARMA S.A.**, dentro del término legal, presento respuesta a Concepto Técnico notificado mediante Oficio No. 8705 del 30 de mayo de 2012.

1. EXCEPCION A LA PATENTABILIDAD (Art. 20 literal d) D486)

El Examinador Técnico manifiesta:

Marcas – Patentes
Modelos – Diseños
Nombres Comerciales – Enseñas
Propiedad Intelectual
Registros en el Exterior
Registros Sanitarios INVIMA – ICA
Acciones Judiciales – Administrativas
Derecho Comercial – Industrial
Asesoría – Contratos – Otros
Corresponsalia a Nivel Mundial



Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

Abogados Consultores – Marcas y Patentes

Bogotá D.C. - Colombia
Avda. Kra. 24 Park Way No. 37 – 31 Of.
202
Tels. (571) 2444096 – 3690624
Fax (571) 2442496 A.A. No. 6207
E-mail: mde@mdelaw.com
mdelawof@cablenet.co
mdeabogados@cablenet.co

Miembros ACPI – ASIPI - AIPPI

“El objeto de las reivindicaciones 58 – 60 no es patentable de acuerdo con el artículo mencionado”.

R/: Nuestro poderdante **DESISTE** de las **Reivindicaciones 58 a 60** de acuerdo a lo expresado por el Examinador Técnico de Patentes y a las exigencias del Art. 20 literal d) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

2. REIVINDICACIONES RELATIVAS A UN USO O A UN SEGUNDO USO (Art. 14 y 21 D486)

El Examinador Técnico manifiesta:

“El uso de las reivindicaciones 61 - 64 no es patentable, de acuerdo con el Art- 14.”

R/: Nuestro poderdante **DESISTE** de las **Reivindicaciones 61 - 64** de acuerdo a lo expresado por el Examinador Técnico de Patentes y a las exigencias de los Art- 14 y 21 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

3. DE LA SOLICITUD DE PATENTE.

Título

El Examinador Técnico de Patentes objeto el Título porque:

“El título no corresponde con el objeto de la solicitud porque hace referencia a materia no patentable, por lo cual se sugiere al solicitante hacer la corrección necesaria”.

R/: Nuestro poderdante se permite modificar el título de la invención, el cual pone a consideración del Despacho como sigue:

“MUTEÍNAS RECOMBINANTES DEL INTERFERÓN ALFA HUMANO GLICOSILADAS Y METODO DE OBTENCIÓN”

7

Marcas – Patentes
Modelos – Diseños
Nombres Comerciales – Enseñas
Propiedad Intelectual
Registros en el Exterior
Registros Sanitarios INVIMA – ICA
Acciones Judiciales – Administrativas
Derecho Comercial – Industrial
Asesoría – Contratos – Otros
Corresponsalia a Nivel Mundial



Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

Abogados Consultores – Marcas y Patentes

Bogotá D.C. - Colombia
Avda. Kra. 24 Park Way No. 37 – 31 Of.
202
Tels. (571) 2444096 – 3690624
Fax (571) 2442496 A.A. No. 6207
E-mail: mde@mdelaw.com
mdelawof@cablenet.co
mdeabogados@cablenet.co

Miembros ACPI – ASIPI - AIPPI

Reivindicaciones

El Examinador Técnico de Patentes objeto el Capítulo Reivindicatorio porque:

"El capítulo reivindicatorio carece de concisión porque utiliza las expresiones "interferón alfa humano", "con al menos un sitio de glicosilación en una posición de su secuencia aminoacídica", "una estructura secundaria tipo alfa hélice", "un sitio de N-glicosilación", "una secuencia consenso de glicosilación", ..., lo cual dificulta determinar la extensión del objeto que se busca proteger".

"Para las expresiones "interferón alfa humano", "una estructura secundaria tipo alfa hélice", "una secuencia consenso de glicosilación", "una mutéina recombinante del interferon alfa humano", "gen que codifica para el interferon alfa humano 2b", ..., no se define la secuencia de aminoácidos o nucleótidos. Se recuerda al solicitante que un péptido y un ácido nucleico se definen por sus secuencias de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente".

"Para las expresiones "con al menos un sitio de glicosilación en una posición de su secuencia aminoacídica", ..., no define la posición en la secuencia de aminoácidos, ni el tipo de sustitución".

"La reivindicación 1 no es clara porque caracteriza la mutéina recombinante por su estructura secundaria. Se recuerda al solicitante que una proteína se caracteriza por su secuencia de aminoácidos".

"Las reivindicaciones 25 – 45 utilizan en el preámbulo el término "gen", el cual es impreciso. Para dar mayor claridad al capítulo reivindicatorio, se sugiere reemplazar este término por "un ácido nucleico" o "una secuencia de nucleótidos", caracterizado por la respectiva secuencia de nucleótidos".

"Las reivindicaciones 46 – 48 y las reivindicaciones 49 y 50 hacen referencia a un método y a un procedimiento, respectivamente. Se sugiere utilizar el término "método" para las reivindicaciones de procedimiento, para dar más claridad al capítulo reivindicatorio. Se recuerda al solicitante que un método se caracteriza por una serie de etapas definidas y las condiciones en las cuales se lleva a cabo. Por ejemplo, en la reivindicación 49, no se define la célula eucariota y la secuencia del vector con el cual se transforma".

"La reivindicación 50 no es clara porque hace referencia a la etapa de purificación de la reivindicación 49, pero la reivindicación 40 en la etapa b), hace referencia a "aislar" la mutéina recombinante. Se sugiere hacer la aclaración necesaria".

"Las reivindicaciones 55 y 56 hacen referencia a un método de tratamiento, por lo cual se requiere eliminarlas del pliego reivindicatorio".



“La reivindicación 57 hace referencia a la combinación de la mutelna con ribavirina. Sin embargo, no se encuentra soporte en la descripción de un efecto sinérgico de esta asociación, por lo que se requiere eliminar esta reivindicación del pliego reivindicatorio”.

“Dado que esta solicitud se refiere a secuencias de nucleótidos o aminoácidos, deben presentarse las listas en forma separada de la descripción, bajo el título: “Listado de secuencias” y anexarlas en formato digital”.

R/: Nuestro poderdante se permite manifestar que de acuerdo a las sugerencias del Examinador Técnico de Patentes procedió a modificar el capítulo reivindicatorio.

La **nueva Reivindicación 3**, que se refiere a la estabilidad frente a Nglicanasas de al menos 70% respecto de la concentración inicial luego de 300 minutos de reacción, se sustenta en el párrafo 3 de la página 35 de la solicitud original, en todo el ejemplo 7 y en la Figura 5. En particular el método en detalle está descrito en el ejemplo 7.

La **nueva Reivindicación 11** se sustenta en la tabla V del ejemplo 13 en la página 44 de la solicitud original, mientras que el método de determinación del clearance plasmático está descrito en el ejemplo 13.

DESISTE de las **Reivindicaciones 58 a 60 y 61 a 64** de acuerdo a lo expresado anteriormente.

Por lo tanto el solicitante pone a consideración del Despacho un **NUEVO CAPÍTULO REIVINDICATORIO** de la invención que comprende **treinta y cinco (35) Nuevas Reivindicaciones** en ocho folios, que cumplen con los requisitos de claridad exigidos por el art. 30 de la Decisión 486.

Descripción



Nuestro poderdante se permite manifestar que modificó la descripción de la invención (**VER ANEXO 1**) para darle mayor claridad y precisión, para lo cual:

Se agregaron dos párrafos entre los párrafos 2 y 3 de la página 2 de la solicitud original que explicitan parte del estado de la técnica que es de dominio público y disponible para cualquier técnico en la materia a la fecha de la solicitud. En estos párrafos agregados se detallan dos trabajos científicos: "Radhakrishnan et al. 1996. Zinc-mediated dimer of human interferon- α 2b revealed by X-ray crystallography. Structure 4 (12): 1453-1463" **ANEXO 2** y "Klaus et al. 1997. The three-dimensional high resolution structure of human interferon- α 2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. J. Mol. Biol. 274: 661-675", **ANEXO 3**, a partir de los cuales, en los años 1996 y 1997, queda establecida la estructura secundaria de los interferones alfa 2.

A partir de estos trabajos quedan totalmente definidas para cualquier técnico en la materia las posiciones aminoácidas involucradas en estructuras involucradas en estructuras secundarias tipo alfa hélice. Estos trabajos divulgan las posiciones consideradas en la presente invención. No debe entenderse por este agregado del estado de la técnica la incorporación de materia nueva a la presente solicitud.

En el mismo sentido, se ha corregido la **Figura 1** y para mayor claridad se dividió en la **Figura 1a y Figura 1b**, modificándose la breve descripción correspondiente a dichas figuras para lograr la claridad necesaria.

Para explicitar el estado del arte, además se agregó la cita de la solicitud WO2006020580 (**D2**) a continuación del párrafo 1 de la página 6 de la descripción de la solicitud original de la presente invención.



Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

Bogotá D.C. - Colombia
Avda. Kra. 24 Park Way No. 37 – 31 Of.
202
Tels. (571) 2444096 – 3690624
Fax (571) 2442496 A.A. No. 6207
E-mail: mde@mdelaw.com
mdelawof@cable.net.co
mdeabogados@cable.net.co

Miembros ACPI – ASIPI - AIPPI

Abogados Consultores – Marcas y Patentes

Se ha agregado al **ejemplo 7** una breve explicación aclaratoria para darle más claridad y se han corregido algunos errores. Estas modificaciones realizadas en el ejemplo 7 no agregan nueva información, sino que están sustentadas en las explicaciones dadas en el párrafo 4 de la página 12 de la solicitud original.

Con el objeto de mejorar la claridad de la descripción y para facilitar la comprensión de la **descripción modificada (ANEXO 1)**, **se agrega**, luego de los objetos de la invención, que culminan al final de la página 9 de la solicitud original, **una breve descripción de la invención**, que no aporta nuevo material a la solicitud original, sino que sólo reitera lo expresado en el nuevo pliego reivindicatorio que restringe el espectro reivindicado con respecto al pliego original.

2. DEL ANÁLISIS DE PATENTABILIDAD.

Novedad.

El Examinador objeta la novedad de la invención para las reivindicaciones 1 a 54 con los documentos **D1 (WO2004019856)** y **D2 (WO2006020580)** porque:

“D1 enseña una isoforma del interferón alfa modificado en su secuencia de aminoácidos que tiene al menos una secuencia consenso de glicosilación Asn-X-Ser/Thr (Pág. 6, líneas 2-5). D1 también enseña un gen que codifica el interferón alfa, un vector de expresión que comprende el gen, una célula hospedera transformada o transfectada con el vector de expresión (Pág. 4, líneas 14-169, un método para producir el interferón que comprende cultivar la célula hospedera que comprende el vector de expresión recombinante (Pág. 5, líneas 3-8) y una composición farmacéutica que comprende el interferón alfa (Pág. 5, líneas 13-17)”.

“D2 divulga una variante hiperglicosilada de interferón alfa 2a o interferón 2b que comprende uno o más sustituciones simples de aminoácidos (Pág. 66, párrafo 256). D2 enseña que el interferón alfa comprende uno o más sitios de glicosilación, que incluye la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde el residuo de Asn provee un sitio para N-glicosilación (Pág. 22, párrafos 107 y 108), que puede estar en la posición Lys70 (párrafo 253). D2 igualmente divulga un polinucleótido que codifica el interferón alfa (reivindicaciones 53-55) y donde la

mutación es generada utilizando la técnica de mutagénesis sitio dirigida (párrafo 1051); un método para producir el interferón que comprende cultivar una célula hospedera eucariota o procariota, la cual comprende un vector de expresión recombinante y aislar y purificar el interferón del medio de cultivo utilizando cromatografía de afinidad (párrafos 547-550) y una composición farmacéutica que comprende el interferón alfa (reivindicación 1)".

"En consecuencia, la reivindicación 1 carece de novedad según lo divulgado en los documentos D1 o D2".

"Las reivindicaciones dependientes 2-24 no mencionan alguna característica que haga nueva a la muteína recombinante de la reivindicación 1, por lo cual se considera que no son nuevas. El objeto de las reivindicaciones 25 a 54 también es anticipado por los documentos D1 o D2 por lo que carecen de novedad".

R/: Con relación a las objeciones del Examinador de Patentes con respecto a la **novedad** de la invención, el solicitante desea resaltar lo siguiente:

El documento **D1** propone **generar nuevos sitios de N-glicosilación, mediante la sustitución de al menos un aminoácido por otro tal que se forme la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr** en regiones fuera de alfa hélice en la secuencia de aminoácidos del interferón alfa humano para incrementar su estabilidad *in vivo*. En particular, en la página 9 párrafo 3 se señala que los inventores del documento **D1** han descubierto que la **glicosilación por modificaciones en aminoácidos puede ser inducida** en cualquier región excepto en regiones helicoidales en la secuencia de aminoácidos del interferón alfa humano. En el documento **D1**, la página 27 líneas 8 a 10, ejemplo 2, se describe la selección de los sitios de N-glicosilación en el interferón alfa humano; para dicha selección se excluyen las regiones helicoidales en la secuencia de aminoácidos de la proteína del interferón alfa humano. Por lo tanto, la alternativa de realizar una sustitución de un aminoácido en una región alfa hélice para generar una muteína recombinante del interferón alfa 2b humano con al menos un sitio de N-glicosilación de secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr donde dicho sitio es generado por la sustitución de un aminoácido que se encuentra comprendido en una estructura tipo alfa hélice, y siendo dicho sitio seleccionado



Abogados Consultores – Marcas y Patentes

del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156. Más aún en el documento **D1** se deduce que una sustitución de un aminoácido perteneciente a una estructura tipo alfa-hélice para generar una secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr que permita obtener un sitio de N-glicosilación no tendría éxito.

Mientras que en los ejemplos 7, 12 y 13, de la presente solicitud de nuestro poderdante, **se comparan variantes con sitios de glicosilación fuera de alfa hélice**, variantes con al menos un sitios de glicosilación en una región comprendida en una alfa hélice y variantes pegiladas, demostrando que la nueva muteína recombinante del interferon alfa 2b humano con al menos un sitio de N-glicosilación de secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr donde dicho sitio es generado por la sustitución de un aminoácido que se encuentra comprendido en una estructura tipo alfa hélice, presenta estabilidad sorprendentemente superior frente a PNGasa F (como se observa en el ejemplo 7), mayor actividad biológica en el tiempo (ejemplo 12 y 13), y un clearance plasmático sorprendentemente menor comparando con las diversas variantes ensayadas.

Con respecto al documento **D2**, a pesar de que se proponen modificaciones puntuales de aminoácidos, **ninguna de estas modificaciones de un solo aminoácido sugieren la obtención de una secuencia consenso tipo Asn-Xaa-Ser/Thr** donde dicho sitio es generado por la sustitución de un aminoácido que se encuentra comprendido en una estructura tipo alfa hélice, y siendo dicho sitio seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156, por lo que no puede ser considerada como una sugerencia del arte previo para llegar a la invención de la presente solicitud a partir de la anterioridad más relevante.

2

Marcas – Patentes
Modelos – Diseños
Nombres Comerciales – Enseñas
Propiedad Intelectual
Registros en el Exterior
Registros Sanitarios INVIMA – ICA
Acciones Judiciales – Administrativas
Derecho Comercial – Industrial
Asesoría – Contratos – Otros
Corresponsalia a Nivel Mundial

MDE



Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

Bogotá D.C. - Colombia
Avda. Kra. 24 Park Way No. 37 – 31 Of.
202
Tels. (571) 2444096 – 3690624
Fax (571) 2442496 A.A. No. 6207
E-mail: mde@mdelaw.com
mdelawof@cablenet.co
mdeabogados@cablenet.co

Miembros ACPI – ASIPI - AIPPI

Abogados Consultores – Marcas y Patentes

Además, es evidente que el listado de modificaciones descrito en el documento **D2** responde a un análisis teórico que lleva a infinitas alternativas, sin la menor sugerencia acerca de cuál de tales infinitas alternativas pueden lograr el éxito para solucionar el problema de obtener un interferón con mayor estabilidad química y física, un perfil de liberación en el tiempo mejorado, un proceso de obtención y purificación simples respecto a los disponibles comercialmente en la actualidad (tales como el IFN-pegilado con PEG 12000).

El documento **D2 (WO206020580)** divulga **formulaciones orales de variantes de polipéptidos resistentes a proteasas y variantes de polipéptidos hiperglicosilados resistentes a proteasas**, cuyas variantes de polipéptidos comprenden al menos un sitio de clivaje de proteasa mutado en un sitio de clivaje nativo presente en el polipéptido parental, y de esta manera exhibe resistencia a proteasa incrementada comparado con el polipéptido parental. Dicho polipéptido además incluye una porción de carbohidrato unido a al menos un sitio no-nativo de glicosilación en la proteína terapéutica parental ó una porción de carbohidrato unido a al menos un sitio nativo de glicosidación pero que no se encontraba glicosilado en la proteína terapéutica parental.

El documento **D2** divulga una serie de polipéptidos agonistas del receptor del interferón tipo I, sintéticos, que incluyen a diversas variantes que involucran polipéptidos con secuencias aminoacídicas modificadas para inhibir la acción de proteasas y a su vez para generar sitios de glicosilación. El documento **D2 no describe ni anticipa una muteína recombinante del interferón alfa 2b humano** con sólo un sitio de N-glicosilación de secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr generado por la sustitución de un aminoácido que se encuentra comprendido en una estructura tipo alfa hélice, donde dicho sitio es seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156. Ni aún analizando en detalle las modificaciones aminoacídicas

Abogados Consultores – Marcas y Patentes

puntuales teóricas que propone el documento **D2** en su larga enumeración de sustituciones puntuales para en el interferón tipo alfa 2b, a partir de la página 66 de dicho documento, se puede inferir, ni están sugeridas aquellas que lleven a obtener una muteína como la definida en la presente invención en el párrafo anterior.

Por otra parte, el documento **D2** presenta una serie infinita de alternativas para lograr polipéptidos agonista del receptor del interferón tipo I, **sintéticos**, sin insinuar o sugerir aquellos que realmente conduzcan al éxito para resolver el problema técnico planteado por la presente patente de invención de nuestro poderdante. Además, la presente invención logra una muteína de **extraordinaria estabilidad sin la necesidad de realizar sustituciones tendientes a modificar sitios de clivaje de proteasas**, tal como lo describe el documento **D2**.

Tampoco se desprende de manera obvia, para un experto en la materia, a partir de los documentos **D1** y **D2**, que una muteína recombinante del interferón alfa 2b humano con un sitio de N-glicosilación de secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr generado por la sustitución de un aminoácido que se encuentra comprendido en una estructura tipo alfa hélice, donde dicho sitio es seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156, presente una estabilidad frente a Nglicanasas de al menos 70% respecto de la concentración inicial luego de 300 minutos de reacción, según el método definido en el ejemplo 7. Siendo tales valores extraordinariamente superiores a los obtenidos mediante la sustitución de otro aminoácido que genere una secuencia consenso fuera de alfa-hélice, tal como puede comprobarse en la figura 5 correspondiente al ejemplo 7.

Menos evidente aún, a partir de los documentos **D1** y **D2**, es la obtención de una muteína recombinante del interferón alfa 2b humano que presente un clearance

Abogados Consultores – Marcas y Patentes

plasmático extraordinario e inesperado, con respecto a isoformas conocidas del interferón alfa 2b humano tales como la forma natural o muteínas con sitios de glicosilación fuera de estructuras secundarias tipo alfa hélice, es particularmente sorprendente que dicha muteína demuestre, tal como se evidencia en la descripción, variables farmacocinéticas comparables con la variante del interferón pegilado con Polientilenglicol 12000 Da. Se **obtienen a partir de la presente invención muteínas del interferón alfa 2b con un clearance plasmático igual o menor a 0,36 ml/min**, en particular la muteína que comprende los sitios de glicosilación Pro4, Arg23, Lys70 y Asp77, tal como lo evidencia la tabla V del ejemplo 13.

Por otra parte en ninguno de los documentos **D1** y **D2** citados se sugiere que la presencia de al menos un sitio de N-glicosilación obtenido a partir de una modificación de un aminoácido presente en estructura alfa-hélice otorgue a la muteína del interferon alfa 2b características superlativas de estabilidad y clearance plasmático, tal como se puede observar en los ejemplos de la presente invención. Más aún es **imposible deducir de manera obvia** de los documentos **D1** y **D2** por el Examinador la obtención de una muteína del interferon alfa 2b mutada en los sitios 4/23/70/77N que logre un clearance plasmático igual o menor a 0,36 ml/min, medido según técnica descrita en el ejemplo 13. a.

Por lo tanto, queda claramente demostrado que **existen diferencias sustanciales** entre los documentos **D1** y **D2** con la **muteína recombinante del interferón alfa 2b humano** que se desea proteger en la presente solicitud de patente de invención de nuestro poderdante; para lo cual pone a consideración del Examinador Técnico de Patentes:



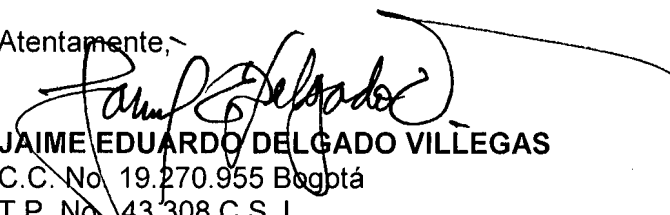
Abogados Consultores – Marcas y Patentes

- Un **NUEVO TITULO DE LA INVENCION**: “**MUTEÍNAS RECOMBINANTES DEL INTERFERÓN ALFA HUMANO GLICOSILADAS Y METODO DE OBTENCIÓN**”;
- Una **NUEVA DESCRIPCION DE LA INVENCION** en 58 folios;
- Un **NUEVO CAPÍTULO REIVINDICATORIO** el cual incluye **treinta y cinco Reivindicaciones (35)** en 8 folios;
- **Nuevas Figuras** en 10 folios;
- **Listado de secuencias** en medio digital

los cuales cumplen con los requisitos de **NOVEDAD, NIVEL INVENTIVO Y APLICACIÓN INDUSTRIAL** exigidos por la Decisión 486 del Acuerdo de la Comisión de la Comunidad Andina; además, estamos dando respuesta al Concepto Técnico notificado mediante Oficio No. 8705 del 30 de mayo de 2012.

Por lo anteriormente mencionado, solicito respetuosamente se proceda a **CONCEDER** la Patente de Invención titulada: “**MUTEÍNAS RECOMBINANTES DEL INTERFERÓN ALFA HUMANO GLICOSILADAS Y METODO DE OBTENCIÓN**” a nombre de la sociedad **PROTECH PHARMA S.A.**

Atentamente,


JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS
C.C. No. 19.270.955 Bogotá
T.P. No. 43.308 C.S.J.

Anexos:

Anexo 1. Nueva Descripción, Nuevas Reivindicaciones y Figuras (76 folios).

Anexo 2. Radhakrishnan et al. 1996. Zinc-mediated dimer of human interferon- α 2b revealed by X-ray crystallography (11 folios)

Anexo 3. Klaus et al. 1997. The three-dimensional high resolution structure of human interferon- α 2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. (15 folios)

Dependencia:	Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicator:		Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	07-62159-	6	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

<i>Item</i>	<i>Unidad de Conservación</i>
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
<i>Item</i>	<i>Soporte Documental</i>
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

Folio 13 Sobre blanco con CD

MUTEÍNAS RECOMBINANTES DEL INTERFERÓN ALFA HUMANO GLICOSILADAS Y SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo de la biología molecular relacionada con el desarrollo de proteínas recombinantes. En particular está relacionada con muteínas recombinantes del interferón alfa humano con propiedades farmacológicas, químicas y físicas mejoradas; procedimientos para obtener dichas isoformas y formulaciones farmacéuticas para su uso en mamíferos, en especial para humanos que requieran de tratamiento terapéutico con interferón. Más particularmente esta invención está relacionada con muteínas del interferón alfa humano, que contienen al menos un aminoácido modificado en una posición que pertenece a una estructura secundaria tipo alfa hélice. Dicha modificación genera al menos una secuencia del tipo Asn-Xaa-Ser/Thr, introduciendo un sitio susceptible de N-glicosilación por glicosilación del residuo de asparagina en dicha secuencia.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El grupo de citoquinas conocidas como interferones fue caracterizado por primera vez en 1957, se los llamó interferones (IFNs) por su habilidad de interferir en la replicación viral, confiriendo una resistencia a la infección desde las células infectadas a células no infectadas. Los primeros en demostrar esta característica de dichas citoquinas fueron Isaacs y Lindermann en 1957 (Proc R Soc Lond Biol Sci, Sep 1957; 147(927): 258-67).

Los IFNs se dividen en dos grupos de acuerdo a sus propiedades estructurales y funcionales: los interferones del tipo I (IFN-alfa, IFN-beta,

IFN-omega) y los interferones tipo II (IFN-gamma). Cada uno de estos se expresa en una gran variedad de tipos celulares en baja concentración. El IFN-alfa se expresa principalmente en linfocitos B y macrófagos; el IFN-beta en fibroblastos y el IFN-gamma en linfocitos T.

Recientemente se ha propuesto incluir un nuevo miembro a la familia de interferones, este nuevo miembro se lo denomina interferón tipo III, está comprendido por los interferones lambda 1, 2 y 3 (que corresponden a las Interleuquina-29 (IL-29), IL-28a y IL-28b, respectivamente) (Kotenko, S. V. 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4:69–77; Sheppard, P. 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4:63–68). Estos INFs tipo III muestran una baja homología de secuencia con la familia de IFNs α/β pero son activados por los mismos factores que inducen la expresión de los IFNs α/β e inhiben la replicación de diversos virus incluyendo virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus de la encefalomiocarditis (EMVC); aparentemente también inhibirían la replicación del virus de la hepatitis tipo B y C.

El interferón tipo I alfa pertenece a una familia multigénica compuesta de genes y pseudogenes, se han identificado más de 20 variantes. Los primeros modelos tridimensionales de los IFNs de tipo I humanos fueron predichos en 1982 teniendo en cuenta sus secuencias aminoacídicas. Más recientemente, la estructura terciaria del IFN- α 2b fue revelada mediante cristalografía de rayos X (Radhakrishnan et al. 1996. Zinc-mediated dimer of human interferon- α 2b revealed by X-ray crystallography. *Structure* 4 (12): 1453-1463) que se incorpora como parte de la presente descripción, mientras que la correspondiente a IFN- α 2a en solución fue analizada mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (Klaus et al. 1997. The three-dimensional high resolution structure of human interferon- α 2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J. Mol.*

Biol. 274: 661-675), que se incorpora como parte de la presente descripción.

Estos estudios demostraron que el IFN- α 2 posee una estructura globular consistente en 5 hélices α designadas con las letras A (Ser11-Met21), B y B' (Thr52-Ser68 y Lys70-Ala75), C (Glu78-Ile100), D (Leu110-Glu132) y E (Pro137-Leu157), lo que permita clasificar a esta proteína dentro del grupo de las citoquinas α -helicoidales. Las hélices se encuentran conectadas por un segmento sobresaliente de gran longitud (lazo AB) y 3 segmentos cortos (lazos BC, CD y DE). Cada hélice es aproximadamente recta, con excepción de la hélice B que contiene una curvatura pronunciada de 70° cuyo centro es la Thr69, permitiendo dividir la mencionada hélice en la región B y B' (Figura 1).

EL interferón alfa 2b contiene 2 enlaces disulfuro en su estructura y una cadena glicosídica unida por enlace tipo-O, en la posición Thr 106. Las modificaciones post-traduccionales necesarias para transferir un glicano a la proteína ocurren en el retículo endoplasmático de la célula inmediatamente luego de ser traslocado el polipéptido recién sintetizado desde el citoplasma celular, para que ocurra una glicosilación del tipo N es necesaria la presencia de secuencias del tipo Asn-Xaa-Ser/Thr en la cadena aminoacídica, donde se forma una unión N-glicosídica entre el grupo amino del residuo de asparagina y un grupo OH del azúcar.

La expresión de interferón tipo I en organismos vivos, en altos niveles, es inducida por la presencia de una infección viral, también puede ser inducida por una gran variedad de otros agentes no-virales, tales como bacterias, micoplasmas y diversos polímeros como ser lipopolisacáridos de la membrana de bacterias gram-negativas y la presencia de polímeros sintéticos (Merigan T: Induction of circulating interferón by synthetic anionic polymers of known composition. Nature 1967, 214: 416-417).

El interferón tipo I posee, además, actividad anti-proliferativa e inmunomoduladora.

La vía de señalización de los IFNs tipo I se inicia por la unión de dicha molécula al receptor en la superficie celular diana y media la activación de genes blanco en el núcleo a través de la vía de señalización Jak/STAT, existen otras vía de activación de genes dependientes de la unión IFN-receptor que no dependen de la vía de transducción de señales antes mencionada (A Larner: Interferón signal transduction. Biotherapy, January 1, 1996; 8 (3-4): 175-81).

El interferón tipo-I alfa es clínicamente utilizado en el tratamiento de la hepatitis B y C crónica, encefalitis viral aguda, cánceres tales como carcinoma nasofaríngeo, linfoma, leucemia y melanomas, entre otros.

Una de las principales desventajas que posee el uso del interferón en el tratamiento de enfermedades es su baja estabilidad cuando se suministra a un organismo vivo, por lo que es necesario suministrar cantidades excesivas de interferón para alcanzar niveles terapéuticos adecuados. Por un lado esto determina que las terapias en las que se utiliza interferón; particularmente el Interferón alfa, tengan costos elevados y por otro lado que provoquen en ciertos pacientes la aparición de efectos secundarios tales como estados similares a la gripe, con fiebre, fatiga, irritabilidad, escalofríos, cefaleas y dolores musculares; malestar estomacal, pérdida del apetito, diarrea, mareos, etc. (Richard Grieve: Cost-effectiveness of interferon or peginterferon with ribavirin for histologically mild chronic hepatitis C. Gut, Jun 2005; 10.1136/gut.2005.064774; Gary L. Davis: Interferon alfa-2b alone or with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. 1998. Volume 339 Number 21-1493).

En la actualidad se están desarrollado nuevas estrategias para aumentar la estabilidad *in vivo* de estas proteínas bioactivas mediante reacciones

enzimáticas (WO 98/13381, US 6,620,916, US 5,643,564, US 4,184,917), reacciones químicas (WO 96/21468, US 2004/0180054, US 6,524,570, US 4,179,337, US 5,981,709, US 20060029573, US 5,738,846), encapsulación de la proteína (WO2005074892), mutagénesis dirigida (US2004/0002474, WO92/01055, US 2005/0019871), etc., con el objeto de lograr dosis terapéuticas efectivas evitando la administración de cantidades excesivas de la proteína. Ejemplos de estas nuevas estrategias se detallan en documentos tales como la patente WO98/13381 (Ajinomoto Kk (Jp); Takahara Y., et al.), en la que se divulga un método de modificar proteínas biológicamente activas, mejorando su actividad *in vivo*, mediante la adición de ligandos ramificados a residuos de glutamina presentes en la secuencia primaria de la proteína. Los documentos de patente US 6,620,916 (Ajinomoto Co. Inc.; Takahara, et al.); US 5,643,564 (Takeda Chemical Industries, Ltd; Hamaguchi , et al.) y US 4,184,917 (Sandoz Ltd.; Dorner, et al.) describen la obtención de homólogos de interferón con estabilidad mejorada, mediante modificaciones enzimáticas para alterar el perfil de glicosilación, estos nuevos homólogos actúan esencialmente a nivel del hígado y podrían mejorar la acción en ese órgano, pero desmejorar la acción de interferón sobre otras localizaciones. En el documento de patente WO 96/21468 (Amgen Inc; Collins David, et al.) se divulga la obtención de análogos del inteferón alfa recombinante mediante la adición de ligandos glicosídicos con múltiples lactosas conjugados a residuos de Arginina o al residuo amino terminal de la secuencia primaria del interferón alfa natural, el producto reivindicado en este documento es dirigido al hígado con lo cual estaría actuando a nivel hepático y podría presentar deficiencias a nivel de otros órganos como por ejemplo en tumores de riñón. En la solicitud de patente US 2004/0180054 (Kim, Young-Min, et al.) se divulga la obtención de un conjugado formado por una proteína (IFN-alfa), un polímero no peptídico y una inmunoglobulina, de esta manera se aumenta la estabilidad *in vivo* de la proteína. En los documentos de patente US 4,179,337, US 5,981,709, US 20060029573, US 5,738,846, US

6,524,570; los inventores divulgan procesos, composiciones y usos de interferón alfa conjugado con polietilenglicol para aumentar la estabilidad del mismo. Estos métodos implican pasos de purificación necesarios para eliminar los productos de reacción antes de realizar los pasos de purificación, mínimos, necesarios para obtener un producto de alta pureza. Además estos procedimientos propuestos presentan la dificultad de dirigir una reacción química a un sitio específico de la proteína lo que lleva a obtener productos heterogéneos, con la posibilidad de obtener productos inactivos. La solicitud WO2006020580 (Intermune Inc.; Hong, Jin et al.), los inventores divulgan composiciones farmacéuticas orales que comprenden variantes resistentes a proteasas hiperglicosiladas o resistentes a proteasas, por otro lado presenta un listado de modificaciones posibles en el interferon alfa 2b, el cual responde a un análisis teórico que lleva a infinitas alternativas, sin la menor sugerencia acerca de cuál de tales infinitas alternativas pueden lograr el éxito para solucionar el problema de obtener un interferon con mayor estabilidad química y física, un perfil de liberación en el tiempo mejorada, un proceso de obtención y purificación simples respecto a los disponibles comercialmente en la actualidad.

En la solicitud de patente WO 2005074892 (Shenzhen Neptunus Interlong BI; Wang et al.) los inventores describen una crema conteniendo liposomas de interferón utilizada para el tratamiento de enfermedades dérmicas causadas por infecciones virales (por ejemplo herpes zoster), verrugas, úlceras genitales, etc. Este modo de preparación presenta la desventaja de tener una aplicación limitada al tratamiento tópico de enfermedades.

La solicitud de patente US 2004/0002474 (Maxygen, Inc.; Heinrichs, Volker, et al.) donde se reivindica la obtención de homólogos de interferón alfa, mediante modificaciones en la secuencia génica o aminoacídica. En el documento de patente WO 92/01055 (Boehringer Ingelheim Int; Adolf Guenther, et al.) los inventores divulgan la obtención de homólogos de

interferón alfa los cuales presentan nuevos sitios de O-glicosilación. El producto obtenido mediante estas estrategias no muestra mejoras en las propiedades farmacocinéticas respecto al interferón-pegilado.

En la solicitud de patente US 2005/0019871 (Lee, Eun Jung, et al.) se divulga la obtención de isoformas del interferón alfa, en las cuales se ha modificado la secuencia de nucleótidos con el fin de introducir motivos Asn-Xaa-Ser/Thr en sitios que no están involucrados en la formación de estructuras secundarias, se proponen exclusivamente sitios fuera de las estructuras alfa-hélices. A pesar de obtener isoformas del interferón recombinante humano tipo I $\alpha 2b$ con nuevos sitios de N-glicosilación, no demuestran una mejora en la estabilidad y/o perfil de liberación en el tiempo, comparable con las isoformas disponibles comercialmente en la actualidad tales como el interferón-pegilado con un Polietilenglicol de 12000 Dalton (PEG 12000). En esta solicitud se presentan isoformas con sólo dos nuevos sitios de N-glicosilación en regiones moleculares carentes de estructuras alfa hélice las cuales constituirían áreas de mayor susceptibilidad a la acción de N-glicanasas.

En la solicitud de patente WO2006020580 (Intermune Inc.; Hong, Jin et al.), los inventores divulgan composiciones farmacéuticas orales que comprenden variantes resistentes a proteasas hiperglicosiladas o resistentes a proteasas, por otro lado presenta un listado de modificaciones posibles en citoquinas, el cual responde a un análisis teórico que lleva a infinitas alternativas todas diferentes a las seleccionadas por la presente invención, sin la menor sugerencia acerca de cuál de tales infinitas alternativas pueden lograr el éxito para solucionar el problema de obtener un interferon con mayor estabilidad química y física, un perfil de liberación en el tiempo mejorada, un proceso de obtención y purificación simples respecto a los disponibles comercialmente en la actualidad.

La presente invención resuelve los problemas descritos en el arte previo y provee una preparación de una muteína recombinante de interferón alfa humano, que presenta un perfil de N-glicosilación diferente a los conocidos en el estado del arte, dicha muteína presenta un perfil de liberación en el tiempo y una estabilidad mejoradas, una actividad biológica comparable con la que presenta el interferón-pegilado con un Polietilenglicol de 12000 Dalton (PEG 12000), además la obtención de dicha muteína implica pocos pasos en su proceso de obtención y su purificación es simple, con la cualidad de obtener un producto final de alta pureza.

OBJETOS DE LA INVENCION

Es un objeto principal de la presente invención proveer una muteína recombinante del interferón alfa humano, preferentemente del tipo 2b, que presenta al menos un sitio de glicosilación, preferentemente N-glicosilación, en una posición de su secuencia aminoacídica que forma parte de una estructura secundaria tipo alfa hélice, el cual se pueda obtener por mutación de un único residuo de la cadena polipeptídica. En una de las realizaciones preferidas de la presente invención dicha muteína recombinante del interferón alfa humano 2b presenta además al menos un sitio de N-glicosilación en una posición fuera de una estructura alfa hélice. Donde dichos sitios de N-glicosilación, preferentemente conformados por una secuencia consenso del tipo Asn-Xaa-Ser/Thr, en una posición de su secuencia aminoacídica que forma parte de una estructura secundaria tipo alfa hélice, ocupan posiciones seleccionadas del conjunto comprendido por: Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156. Mientras que dichos sitios de N-glicosilación fuera de estructuras secundarias tipo alfa hélice ocupan las posiciones seleccionadas del conjunto comprendido por las posiciones del interferón alfa humano 2b natural Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Asn45, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.

Es otro objeto de la presente invención proveer un gen que codifica para una muteína recombinante del interferón alfa humano, preferentemente tipo 2b, que comprende al menos una mutación sitio-dirigida que genera un sitio de N-glicosilación, preferentemente una secuencia consenso tipo Asn-Xaa-Ser/Thr, involucrado en una estructura alfa hélice. Donde dicha mutación sitio-dirigida se realiza en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos Leu9, Arg12, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Leu95, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156. Donde en una realización preferida dicho gen presenta además al menos una mutación sitio-dirigida que genera una secuencia consenso tipo Asn-Xaa-Ser/Thr, donde la Asn es susceptible de sufrir una unión N-glicosídica con un oligosacárido y está fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice. Donde dicho sitio de N-glicosilación fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice, se realiza en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Phe47, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.

Es otro objeto de la presente invención proveer un método para generar nuevos sitios susceptibles de N-glicosilación mediante la técnica de mutagénesis sitio-dirigida en el gen que codifica para dicha muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención.

Es otro objeto de la presente invención proveer un método para obtener una línea celular eucariota derivada, productora de dicha muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, mediante transformación ó transfección de una línea celular con dicho gen que codifica para dicha muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, inserto en un vector de expresión adecuando, donde, preferentemente la línea celular eucariota es la línea celular CHO.K1.

Es otro objeto de la presente invención proveer un método para producir la muteína recombinante del interferón humano de la invención mediante los pasos de: a)- cultivar dicha línea celular eucariota transformada ó transfectada con el vector de expresión que contiene el gen que codifica para la muteína del interferón humano de la invención y b)- aislar la muteína recombinante del interferón alfa humano, expresada y excretada, del medio de cultivo.

Es otro objeto de la presente invención proveer un procedimiento para purificar dicha muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención mediante cromatografía de inmunoadfinidad.

Es otro objeto de la presente invención proveer un método para producir la muteína del interferón humano de la invención a partir de células procariotas mediante los pasos de: a)- transformar ó transfectar una célula procariota con un vector de expresión adecuado que contiene el gen que codifica para la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención; b)-seleccionar aquel clon que exprese el polipéptido de la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención; c)- cultivar dicho clon, d)-purificar, e)- glicosilar "*in vitro*" el polipéptido de la muteína del interferón alfa humano expresado por el clon del paso c); y f)- purificar la muteína del interferón alfa humano de la invención.

Es otro objeto de la presente invención proveer una composición farmacéutica que comprende al menos la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención para el tratamiento de enfermedades tales como melanomas, hepatitis C crónica, hepatitis B aguda y crónica, hepatitis no-A no-B aguda y crónica, Sarcoma de Kaposi, esclerosis múltiple, verrugas genitales, leucemia, infecciones virales, entre otras.

Es otro objeto de la presente invención proveer un método para el tratamiento de melanomas, hepatitis C crónica, hepatitis B aguda y crónica, hepatitis no-A no-B aguda y crónica, Sarcoma de Kaposi, esclerosis múltiple, verrugas genitales, leucemia, infecciones virales, el cual implica la administración a un mamífero, preferentemente humano, que lo necesite, una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención y en donde dicha composición comprende además excipientes farmacológicamente aceptables.

Es otro objeto de la presente invención proveer un uso de la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención para elaborar un medicamento para el tratamiento de la hepatitis C crónica, mediante un protocolo terapéutico en el cual se reducen las dosis terapéuticas habituales en la terapia con interferón.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención provee una muteína recombinante del interferon alfa 2b humano con al menos un sitio de N-glicosilación de secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr donde dicho sitio es generado por la sustitución de un aminoácido que se encuentra comprendido en una estructura tipo alfa hélice, y dicho sitio es seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156. Preferentemente dichos sitios son seleccionados del conjunto comprendido por Lys70, Asn93, Glu113.

En una realización preferida dicha muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de la presente invención tienen un sitio de N-glicosilación y una

estabilidad frente a Nglicanasas de al menos 70% respecto de la concentración inicial luego de 300 minutos de reacción.

En otra realización preferida de la presente invención dicha muteína recombinante del interferón alfa 2b humano posee además al menos un sitio de glicosilación en una posición fuera de una estructura tipo alfa hélice y dichos sitios son seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Asn45, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.

En otra realización preferida, dicha muteína recombinante del interferón alfa 2b humano comprende dos sitios de N-glicosilación; preferentemente, posee un sitio de N-glicosilación en la posición Lys70 y un sitio de N-glicosilación en una posición fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Arg23 y Asp77.

En otra realización dicha muteína recombinante del interferón alfa 2b humano comprende tres sitios de N-glicosilación. Preferentemente, posee un sitio de N-glicosilación en la posición Lys70 y dos sitios de glicosilación seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Arg23 y Asp77.

En otra realización preferida dicha muteína recombinante del interferón alfa 2b humano comprende cuatro sitios de N-glicosilación, y un clearance plasmático menor o igual a 0,36 ml/min. Preferentemente, dicha muteína comprende los sitios de glicosilación Pro4, Arg23, Lys70 y Asp77.

En otra realización preferida, dicha muteína recombinante del interferón alfa 2b humano comprende cinco sitios de N-glicosilación.

Preferentemente, dichos sitios son seleccionados del conjunto comprendido por Lys70, Pro4, Arg23, Asp77, Asn93 y Glu113.

En otra realización preferida, la presente invención provee un gen que codifica para una muteína recombinante del interferon alfa 2b humano con al menos un sitio de N-glicosilación de secuencia consenso Asn-Xaa-ser/Thr donde dicho sitio es generado por una mutación sitio-dirigida que genera dicho sitio de N-glicosilación en una estructura tipo alfa hélice, y dicho sitio es seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156.

En otra realización preferida, dicho gen presenta mutaciones sitio-dirigidas de manera de generar la sustitución de un aminoácido y dicho gen codifica para dicha muteína recombinante del interferón alfa 2b humano con un sitio de N-glicosilación, y dicha muteína presenta una estabilidad frente a Nglicanasas de al menos 70% respecto de la concentración inicial luego de 300 minutos de reacción. Preferentemente, el gen de acuerdo con la presente invención presenta mutaciones sitio-dirigidas de manera de generar la sustitución del aminoácido de la posición Lys70.

En otra realización preferida, el gen de la de la presente invención presenta además al menos una mutación sitio-dirigida que genera una secuencia consenso tipo Asn-Xaa-Ser/Thr, donde la Asn es susceptible de sufrir una unión N-glicosídica con un oligosacárido y está fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice. Preferentemente, dicha mutación sitio-dirigida, que genera un sitio de N-glicosilación fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice, se realiza en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Phe47, Ala50, Leu66, Phe67, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.

En otra realización preferida, el gen de la presente invención comprende mutaciones sitio-dirigidas que modifican dos posiciones aminoacídicas. Preferentemente, dichas mutaciones se realizan en el aminoácido correspondiente a la posición Lys70 y en un aminoácido seleccionado del conjunto comprendido por los aminoácidos Pro4, Arg23 y Asp77.

En otra realización preferida, el gen de la presente invención comprende mutaciones sitio-dirigidas que modifican tres posiciones aminoacídicas. Preferentemente, dichas mutaciones sitio-dirigidas se realizan en el aminoácido correspondiente a la posición Lys70 y a dos de los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos Pro4, Arg23 y Asp77.

En otra realización preferida, el gen de la presente invención comprende mutaciones sitio-dirigidas que modifican cuatro posiciones aminoacídicas. Más preferentemente, dichas mutaciones sitio-dirigidas se realizan en los aminoácidos correspondientes a las posiciones Lys70, Pro4, Arg23 y Asp77.

En otra realización más preferida, el gen de la presente invención comprende mutaciones sitio-dirigidas que modifican cinco posiciones aminoacídicas. Dichas mutaciones se realizan en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos Lys70, Pro4, Arg23, Asp77, Leu95 y Glu113.

En otra realización preferida de la presente invención se provee de un método para producir el gen que codifica a la muteína del interferón humano de la invención, donde dicho método comprende los pasos de: a)- clonar el gen que codifica para el interferón alfa 2b humano en un vector adecuado para su amplificación, b)- producir el gen que codifica la muteína del interferón alfa 2b humano de la presente invención mediante la técnica

de mutagénesis sitio-dirigida , c)- clonar el gen modificado genéticamente obtenido en el paso b, en un vector de expresión eucariota adecuado.

En otra realización preferida de la presente invención se provee de un método para producir una línea celular eucariota productora de la muteína recombinante de interferón alfa 2b humano de la presente invención, donde dicho método comprende los pasos de: a)- transformar o transfectar dicha célula eucariota con dicho vector de expresión eucariota, b)- seleccionar aquel clon que exprese la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de la presente invención. Preferentemente, la línea celular eucariota comprende a una línea celular derivada de la línea CHO.K1.

En otra realización preferida de la presente invención se provee de un procedimiento para producir la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de la presente invención que comprende los pasos de: a)- cultivar dicha célula eucariota transformada o transfectada con un vector de expresión que contiene el gen que codifica para la muteína del interferón alfa humano de la presente invención, b)- aislar la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano excretada al medio de cultivo.

En otra realización preferida de la presente invención se provee de un procedimiento para purificar la muteína del interferón humano de de la presente invención a partir del medio de cultivo antes mencionado, donde dicho procedimiento de purificación de dicha muteína se realiza mediante cromatografía de inmunoafinidad.

En otra realización preferida de la presente invención se provee de un método para producir el gen de acuerdo con la presente invención, que codifica a la muteína del interferón humano de la invención, donde dicho método comprende los pasos de: a)- clonar el gen que codifica para el interferón alfa 2b humano en un vector adecuado para su amplificación, b)-

producir el gen que codifica la muteína del interferón alfa 2b humano de la presente invención mediante la técnica de mutagénesis sitio-dirigida, c)- clonar el gen modificado genéticamente obtenido en el paso b, en un vector de expresión procariota adecuado.

En otra realización preferida de la presente invención se provee de un procedimiento para producir la muteína recombinante del interferón humano de la presente invención, donde dicho procedimiento comprende los pasos de: a)- transformar o transfectar una célula procariota con vector de expresión procariota adecuando, b)-seleccionar aquel clon que exprese el polipéptido de la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de la presente invención, c)-cultivar dicho clon, transformado o transfectado, con dicho vector de expresión procariota adecuado que contiene el gen que codifica para la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de la presente invención, d)-purificar el polipéptido de la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de la presente invención, e)-glicosilar "in vitro" el polipéptido de la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de la presente invención, f)-purificar la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de la presente invención.

En otra realización preferida de la presente invención se provee de una composición farmacéutica que comprende al menos una muteína recombinante del interferon alfa 2b humano de la presente invención. En otra realización preferida, dicha composición comprende además excipientes farmacológicamente aceptables. Dicha composición farmacéutica es administrada para el tratamiento de melanomas, hepatitis C crónica, hepatitis B aguda y crónica, hepatitis no-A no-B aguda y crónica, Sarcoma de Kaposi, esclerosis múltiple, verrugas genitales, leucemia, infecciones virales. Preferentemente, dicha composición es administrada a un mamífero, preferentemente humano, en una dosis de entre 0,1 y 2,0

$\mu\text{g/Kg}$ semanal. Preferentemente, la composición es administrada en combinación con ribavirina.

En otra realización preferida de la presente invención se provee de un método para el tratamiento de melanomas, hepatitis C crónica, hepatitis B aguda y crónica, hepatitis no-A no-B aguda y crónica, Sarcoma de Kaposi, esclerosis múltiple, verrugas genitales, leucemia, infecciones virales, dicho método comprende administrar a un mamífero, preferentemente humano, que lo necesite una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende al menos una muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de la presente invención, y en donde dicha composición comprende además excipientes farmacológicamente aceptables. Preferentemente, dicho método de tratamiento comprende administrar la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano la presente invención por una vía seleccionada del grupo comprendido por subcutánea, parenteral, oral, sublingual, intranasal, tópica. Más preferentemente, el método de tratamiento comprende administrar la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de la presente invención en una dosis de entre 0,1 y 2,0 $\mu\text{g/Kg}$ semanal.

En otra realización preferida de la presente invención se provee del uso de la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de la presente invención para elaborar un medicamento para el tratamiento de melanomas, hepatitis C crónica, hepatitis B aguda y crónica, hepatitis no-A no-B aguda y crónica, Sarcoma de Kaposi, esclerosis múltiple, verrugas genitales, leucemia, infecciones virales. Dicho medicamento es administrado en una dosis de entre 0,1 y 2,0 $\mu\text{g/Kg}$ semanal. Más preferentemente en una dosis de entre 0,5 y 1,0 $\mu\text{g/Kg}$ semanal en combinación con ribavirina. Y es administrado por una vía seleccionada del grupo comprendido por las vías subcutánea, parenteral, oral, sublingual e intranasal, tópica.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1a: muestra una alineación de las secuencias aminoacídicas de los interferones tipo I: interferón alfa 2b humano, interferón alfa 1 humano, interferón beta humano e interferón beta murino. Se muestra además la secuencia consenso de los aminoácidos más frecuentemente observados para todos los interferones alfa humanos. Los aminoácidos resaltados en la secuencia consenso corresponden a las secuencias conservadas en los interferones alfa humanos, mientras que los residuos resaltados en el resto de las secuencias se hallan conservados en todos los interferones de tipo I. Las estructuras secundarias tipo alfa hélice correspondientes a las moléculas de interferón alfa 2b humano e interferón beta murino se indican como segmentos en la parte superior e inferior de las secuencias respectivas (adaptado de Radhakrishnan et al. 1996. Zinc-mediated dimer of human interferon- α 2b revealed by X-ray crystallography. Structure 4 (12): 1453-1463).

Figura 1b: secuencia nucleotídica del interferón tipo I alfa 2b natural. Las líneas delgadas indican los codones correspondientes al primer aminoácido de la secuencia de la proteína (Cys), al último aminoácido de dicha secuencia (Glu) y al codón STOP, señal de finalización de la síntesis proteica.

Figura 2: Mutagénesis sitio-dirigida mediante técnica de PCR en su variante extensión por solapamiento.

Figura 3: Ensayo de *Western blot*. Calles: 1- Marcador de masa molecular; 2- rhIFN- α 2bM4; 3- rhIFN- α 2bM77; 4- rhIFN- α 2bM23; 5-rhIFN- α 2bM70; 6- rhIFN- α 2b O-glicosilado; 7- rhIFN- α 2b no glicosilado; 8- rhIFN- α 2bM4/23/70/77

Figura 4: N-desglicosilación enzimática de las variantes mutadas de hIFN- α 2b con sitios de N-glicosilación presentes en estructuras tipo alfa hélices (hIFN- α 2bM70, hIFN- α 2bM95) y fuera de alfa hélices (hIFN- α 2bM23, hIFN- α 2bM47).

Figura 5: variación porcentual de la N-glicosilación en función del tiempo expresada como porcentaje de la misma con respecto a la cantidad presente al inicio del procedimiento de desglicosilación enzimática de las variantes mencionadas en la figura 4.

Figura 6 (A y B): SDS-PAGE en condiciones reductoras con tinción argéntica (A) y *Western blot* (B) correspondientes a la purificación del rhIFN- α 2bM77 y rhIFN- α 2bM4/23/70/77 por cromatografía de inmunoafinidad. Calles: 1- Muestra cruda de un sobrenadante de cultivo conteniendo rhIFN- α 2bM77 antes de la purificación; 2- Muestra purificada de rhIFN- α 2bM77; 3 Muestra cruda de un sobrenadante de cultivo conteniendo rhIFN- α 2bM4/23/70/77 antes de la purificación; 4 Muestra purificada de rhIFN- α 2bM4/23/70/77.

Figura 7: Perfil temporal de la variación de la actividad biológica de IFN presente en cada muestra luego de la inoculación subcutánea de las variantes rhIFN α 2b *wild type*, rhIFN α 2bM23 y rhIFN α 2bM70.

Figura 8: Perfil temporal de la variación porcentual de la actividad biológica remanente en cada muestra con respecto a las unidades de actividad biológica de IFN suministrada a cada rata por vía endovenosa para las variantes rhIFN- α 2b no glicosilado, rhIFN- α 2bM77, rhIFN- α 2b-PEG (12kDa) y rhIFN- α 2bM4/23/70/77.

Figura 9: Perfil temporal de la variación de la actividad biológica de IFN presente en cada muestra luego de la inoculación subcutánea de las

variantes rhIFN- α 2b no glicosilado, rhIFN- α 2b-PEG (12kDa) y rhIFN- α 2bM4/23/70/77.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se definen a continuación algunos términos utilizados en esta descripción con el objeto de facilitar la cabal comprensión de la invención:

“Interferón alfa humano 2b natural” (hIFN- α 2b), se refiere a la citoquina presente en la naturaleza, sin haber sido sometida a ningún tipo de modificación artificial.

“Sustitución de un aminoácido”, se refiere al cambio de un aminoácido presente en la secuencia primaria del hIFN- α 2b por otro aminoácido.

“Muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención”, se refiere a aquellas moléculas recombinantes del interferón alfa humano, preferentemente alfa 2b, con al menos un sitio de glicosilación, preferentemente N-glicosilación, en una posición de su secuencia aminoacídica que forma parte de una estructura secundaria tipo alfa hélice. “Interferón alfa humano” incluye aquellos análogos, mutantes, isoformas y fragmentos del interferón alfa natural.

“Sitio de N-glicosilación”, hace referencia al tripéptido Asn-Xaa-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier residuo excepto un residuo de Prolina. La “posición” del “sitio de N-glicosilación” esta indicada por la posición que ocupa el residuo de aminoácido en la secuencia aminoacídica del interferón alfa humano 2b natural que va a ser reemplazado por una Asn o bien es la asparagina de dicha secuencia consenso. Dicho residuo de Asn, en dicha secuencia consenso, es susceptible de sufrir glicosilación enzimática del tipo-N.

La glicosilación de ciertas proteínas eucariotas tiene lugar en determinadas posiciones del esqueleto polipeptídico, comúnmente existen dos tipos de glicosilación. La glicosilación tipo-O que involucra la unión de un oligosacárido a un grupo -OH de un residuo de Serina o Treonina, y la glicosilación del tipo-N, que involucra la unión de un oligosacárido a un grupo -NH de un residuo de Asparagina. Particularmente, la glicosilación tipo-N tiene lugar en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto una Prolina. Todos los oligosacáridos unidos a la proteína mediante unión del tipo-N tienen en común un núcleo pentasacárido constituido por tres residuos de manosa y dos residuos de N-acetilglucosamina. Los azúcares unidos a este núcleo pentasacárido pueden adquirir una gran variedad de patrones de oligosacáridos. La presencia o ausencia de dichos oligosacáridos afecta las propiedades físicas de las proteínas y puede ser crítico en la función, estabilidad, secreción y localización de las mismas en la célula.

La presente invención está relacionada con la producción de una muteína del interferón alfa humano que presenta al menos una sustitución de un aminoácido en la secuencia del interferón alfa humano natural en una posición que forma parte una estructura secundaria alfa hélice, de manera de obtener la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr, donde el residuo de Asn es susceptible de sufrir N-glicosilación. Por ejemplo, la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención con al menos un sitio de N-glicosilación en una posición que forma parte de una estructura secundaria alfa hélice es aquella obtenida de la sustitución de un aminoácido en la posición Lys70 por un residuo de Asn (Lys70Asn), de esta manera se genera la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr, donde el residuo de asparagina está formando parte de una estructura secundaria alfa hélice y es susceptible de sufrir N-glicosilación. Otro ejemplo sería la sustitución del residuo de aminoácido Leu95 por un residuo de Serina o Treonina, de esta manera se genera una secuencia consenso Asn-Xaa-

Ser/Thr, donde el residuo de asparagina en la posición Asn93 es susceptible de sufrir N-glicosilación. Se ha demostrado que la presencia de al menos un sitio de N-glicosilación en estructuras tipo alfa hélice confieren al interferón una mayor estabilidad y por lo tanto una mayor vida media en sangre.

Dichos sitios de N-glicosilación, generados mediante sustitución de un aminoácido que forma parte de una estructura secundaria tipo alfa hélice son seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156.

Una de las realizaciones preferidas de la presente invención es una muteína recombinante del interferón alfa humano que presenta al menos una sustitución de un aminoácido en una posición que forma parte de una estructura secundaria alfa hélice y además al menos una sustitución en un aminoácido en una posición fuera de una estructura alfa hélice de manera de obtener secuencias consenso Asn-Xaa-Ser/Thr, donde el residuo de Asn es susceptible de sufrir N-glicosilación. Dichos sitios de N-glicosilación en posiciones fuera de estructuras alfa hélice son seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Asn45, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.

En una realización preferida, la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención presenta en su secuencia aminoacídica un sitio de N-glicosilación en una posición que forma parte de estructuras alfa hélice, donde la posición del sitio de glicosilación es seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156. Más preferentemente aún en la posición seleccionada del conjunto

comprendido por las posiciones Lys70, Asn93, Glu113. Más preferentemente aún en la posición Lys70.

En otra realización preferida de la presente invención la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención tiene dos sitios de N-glicosilación, donde dichos sitios son seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156, Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Asn45, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161. Más preferentemente aún, dicha muteína presenta un sitio de glicosilación en la posición Lys70 y además un sitio de N-glicosilación en una posición seleccionada del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Arg23 y Asp77.

Preferentemente, la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención tiene tres sitios de N-glicosilación seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156, Pro4, Thr6, Arg23, Asn45, Leu26, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161. Preferentemente, la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención con tres sitios de N-glicosilación presenta un sitio de N-glicosilación en la posición Lys70 y dos sitios de N-glicosilación seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Arg23 y Asp77.

Más preferentemente, la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención es una muteína con cuatro sitios de N-glicosilación seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156, Pro4, Thr6, Arg23, Leu26,

Asn45, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161. Más preferentemente aún dichos sitios son Pro4, Arg23, Lys70 y Asp77.

En otra realización preferida, la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención presenta 5 sitios de N-glicosilación seleccionados del conjunto de posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156, Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Asn45, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161. Más preferentemente aún dichos sitios son seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Arg23, Lys70, Asp77, Asn93, Glu113.

Para obtener la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención con sitios susceptibles de N-glicosilación, se llevaron a cabo dos estrategias posibles:

- 1)- localizar todas las serinas y/o treoninas en la secuencia aminoacídica del hIFN- α 2b y cambiar el aminoácido que ocupa la primera posición de la secuencia consenso por una asparagina,
- 2)- otra estrategia es la de ubicar todas las asparaginas presentes en la secuencia del hIFN- α 2b y sustituir el aminoácido en la tercera posición por una serina o treonina.

Las modificaciones realizadas en la secuencia aminoacídica del interferón alfa humano natural para obtener la muteína recombinante de la invención son el resultado de la modificación genética del gen que codifica para el interferón alfa humano 2b natural. Donde dichas modificaciones genéticas son introducidas de manera tal que genera la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr en la secuencia aminoacídica del interferón alfa humano, donde el residuo de Asn es susceptible de sufrir N-glicosilación.

El gen que codifica para la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, objeto de esta solicitud de patente, comprende al menos una modificación genética en un codón del gen que codifica para el interferón alfa humano natural, de manera tal que dicha modificación genera la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr en una posición que forma parte de una estructura secundaria alfa hélice, generándose así un sitio de N-glicosilación en una posición que forma parte de una estructura secundaria tipo alfa hélice. Preferentemente, dicha modificación en la secuencia nucleotídica se realiza en al menos una posición seleccionada del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Leu95, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Gln158.

En una de las realizaciones preferidas de la presente invención dicho gen que codifica para la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, además presenta al menos una modificación genética en un codón del gen que codifica para el interferón alfa humano natural, de manera tal que dicha modificación genera la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr en una posición fuera de una estructura secundaria alfa hélice, generándose así un sitio de N-glicosilación en una posición fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice. Dichas modificaciones en posiciones fuera de estructuras secundarias tipo alfa hélice se efectúan en posiciones que se seleccionan del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Phe47, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.

En una realización preferida de la presente invención, dicho gen tiene una única modificación en su secuencia nucleotídica y se realiza en el codón que codifica para los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Leu9, Arg12, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Leu95, Glu113,

Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Gln158. Más preferentemente en el codón que codifica para el aminoácido de la posición Lys70.

En otra realización preferida, el gen que codifica para la muteína recombinante del interferón alfa humano de la presente invención presenta dos modificaciones en su secuencia nucleotídica de manera tal que se generan dos sitios de N-glicosilación, dichas modificaciones involucran los codones que codifican para los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Leu9, Arg12, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Leu95, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Gln158, Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Phe47, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Leu161. Más preferentemente las modificaciones en su secuencia nucleotídica se presentan en el codón que codifica para Lys70 y en el codón que codifica para uno de los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Pro4, Arg23 y Asp77.

En otra realización preferida de esta invención, el gen que codifica a la muteína recombinante de la presente invención presenta tres modificaciones en su secuencia nucleotídica de manera tal que se generan tres sitios de N-glicosilación, dichas modificaciones involucran los codones que codifican para los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Leu9, Arg12, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Leu95, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Gln158, Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Phe47, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Leu161. Más preferentemente las modificaciones en su secuencia nucleotídica se presentan en el codón que codifica para Lys70 y en dos codones que codifican para los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Pro4, Arg23 y Asp77.

En otra realización más preferida de esta invención, el gen que codifica a la muteína recombinante de la presente invención presenta cuatro

modificaciones en su secuencia nucleotídica de manera tal que generan cuatro sitios de N-glicosilación, dichas modificaciones involucran los codones que codifican para los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Leu9, Arg12, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Leu95, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Gln158, Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Phe47, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Leu161. Más preferentemente las modificaciones en su secuencia nucleotídica involucran a los codones que codifican para Pro4, Arg23, Lys70 y Asp77.

En otra realización preferida, el gen que codifica la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención presenta cinco modificaciones en su secuencia nucleotídica en los codones que codifican para los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Leu9, Arg12, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Leu95, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Gln158, Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Phe47, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Leu161. Mas preferentemente aún, en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Pro4, Arg23, Lys70, Asp77, Leu95 y Glu113.

Además, la presente invención provee un método para generar dichos sitios susceptibles de N-glicosilación. Dicho método implica la generación de mutaciones puntuales en la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el interferón alfa humano natural, mediante la técnica de mutagénesis sitio-dirigida en dicho gen. Dicho método implica los siguientes pasos:

- a)- Clonar el gen que codifica para el interferón alfa humano 2b natural en un plásmido adecuado.
- b)- Generar las mutaciones necesarias para producir la muteína del interferón alfa humano de la invención mediante la técnica de mutagénesis sitio-dirigida y

c)- Clonar el gen, modificado genéticamente del paso b, en un vector de expresión adecuado.

El vector de expresión es aquel seleccionado del conjunto de vectores que permiten la inserción del gen de la invención y que además presentan los elementos necesarios para la expresión del gen de interés en células eucariotas. Dicho vector puede ser el vector de expresión pCI-neo.

La técnica de mutagénesis sitio-dirigida de la invención implica la utilización de oligonucleótidos diseñados específicamente para tal fin. Dicha técnica, se lleva a cabo en dos etapas. En la primera etapa se realizan dos reacciones de PCR por separado utilizando oligonucleótidos que hibridan en los extremos del fragmento clonado en el vector pCI-neo (oligonucleótidos denominados IFNalfaF e IFNalfaR, Tabla I) y oligonucleótidos portando la mutación puntual Tabla II (*mut a* y *mut b*) los cuales hibridan en la región interna del gen donde se quiere introducir la mutación. En el tubo a se realiza una mezcla de reacción utilizando el oligonucleótido externo en sentido reverso (IFNalfaR) y el oligonucleótido *mut a* en sentido directo. En el tubo b se realiza otra mezcla de reacción con el oligonucleótido externo en sentido directo y el oligonucleótido *mut b* en sentido reverso. Los productos de PCR obtenidos en ambas reacciones se purifican a partir de una electroforesis en gel de agarosa y se emplean como molde para la segunda etapa. En esta segunda etapa se realiza una segunda reacción de PCR empleando los oligonucleótidos externos en sentido directo y reverso. Los tres primeros ciclos se realizan sin agregado de cebadores para permitir la hibridización y elongación del producto completo (*fill in*) y finalmente estos últimos son agregados para lograr su amplificación.

Para la obtención de una muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención con más de un sitio de N-glicosilación se procede de

manera secuencial a construir dichas muteínas, de la siguiente manera: primero se genera una muteína con un sitio de N-glicosilación, mediante la técnica de mutagénesis sitio-dirigida, y luego dicha muteína como molde de partida para generar un nuevo sitio de N-glicosilación.

El método para la obtención de una línea celular eucariota derivada productora de la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, más particularmente una línea celular CHO.K1, transfectada ó transformada con un plásmido de expresión, pCI-neo, el cual presenta dicho gen que codifica para la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, implica los siguientes pasos:

- Transformar ó transfectar una célula eucariota con el vector de expresión con el inserto de dicho gen que codifica para la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención y
- seleccionar aquel clon que exprese la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención.

Un procedimiento, también objeto de la presente invención, para producir la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención a partir de dicha línea celular CHO.K1 productora, comprende los pasos de:

- a)- cultivar la célula eucariota productora de la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención y
- b)- aislar la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención expresada y excretada al medio de cultivo.

Un método, también objeto de la presente invención, de purificación de la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, implica la obtención de anticuerpos monoclonales específicos para dicha muteína, adsorber dichos anticuerpos monoclonales en una columna cromatográfica

adecuada y purificar la muteína de la invención por cromatografía de inmunoadfinidad.

El interferón alfa puede ser expresado en bacterias, levaduras ó células de insectos de acuerdo a procedimientos bien conocidos en el arte. En todos estos casos el interferón recombinante no estará glicosilado o poseerá un grado de glicosilación menor y distinto al interferon glicosilado producido en células animales. En estos casos se puede glicosilar ó remodelar las cadenas de azúcares "*in vitro*". Para ello existen numerosos protocolos descritos con gran detalle en las siguientes patentes o solicitudes de patentes: WO03031464, WO9425615, WO9216640, US20030040037, US20030003529, US20020137134, US20020019342, US20030124645, US20020160460, US20020142370, US20020119516.

En una de las realizaciones preferidas de la presente invención se provee un método para producir la muteína del interferón humano de la invención mediante los pasos de: a)- transformar ó transfectar una célula procariota con un vector de expresión procariota adecuado que contiene el gen que codifica para la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención; b)-seleccionar aquel clon que exprese el polipéptido de la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención; c)-cultivar dicho clon en un medio de cultivo adecuado, d)-purificar, e)-glicosilar "*in vitro*" el polipéptido de la muteína del interferón alfa humano expresado por el clon del paso c); y f)-purificar la muteína del interferón alfa humano de la invención.

Se analizaron perfiles de glicosilación de diversas muteínas recombinantes del hIFN- α 2b: muteínas con un sitio de glicosilación fuera de estructura secundaria alfa hélice; la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención; el hIFN- α 2b natural; y una isoforma no glicosilada; tal como se observa en la Figura 3. Todas las mutantes con un único sitio

susceptible de N-glicosilación exhibieron una mezcla de isoformas de IFN- α de diferente masa molecular correspondientes a las siguientes fracciones: no-glicosiladas; O-glicosiladas; y N-,O-glicosiladas; siendo la proporción de cada una de ellas variable de acuerdo con la mutante analizada. En el caso particular de la muteína cuyo gen presenta una mutación puntual en el codón que codifica para el aminoácido de la posición Lys70 de manera de generar un sitio de N-glicosilación en estructura alfa hélice, rhIFN- α 2bM70, se observó una mayor masa molecular con respecto a las muteínas en las que se incorporó un único sitio susceptible de N-glicosilación fuera de estructuras tipo alfa hélice. Dicha muteína, rhIFN- α 2bM70, corresponde a una molécula que exhibe un mayor contenido de estructuras glicosídicas. La glicosilación en la estructura alfa hélice confiere al oligosacárido ligado a la Asn70 mayor resistencia y como consecuencia superior estabilidad frente a la acción de N-glicanasas. Estos mismos resultados son obtenidos cuando se evalúa la estabilidad de una muteína con un sitio de glicosilación en la posición Asn93, también perteneciente a una estructura secundaria tipo alfa hélice (ver ejemplo 7).

La muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención en la forma de realización preferida correspondiente a cuatro sitios de N-glicosilación en posiciones Pro4, Arg23, Lys70 y Asp77, rhIFN- α 2bM4/M23/M70/M77, presenta un perfil de glicosilación homogéneo con un alto grado de glicosilación, tal como se observa en la figura 3. Además se observa en la misma figura que esta muteína rhIFN- α 2bM4/M23/M70/M77 presenta un bajo contenido de la isoforma O-glicosilada y de aquellas correspondientes a un bajo grado de glicosilación. Es decir que se observa una mayor concentración de muteínas con elevado grado de ocupación en un rango de masas moleculares comprendido entre 21 y 45 kDa, más particularmente entre 30 y 45 kDa.

A partir de la creación de estos nuevos sitios de N-glicosilación se ha logrado mejorar la estabilidad de la citoquina *in vivo* comparada con cualquiera de las isoformas del rhIFN- α 2b conocidas en el estado del arte. La creación de la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, en una forma preferida, con cuatro sitios de N-glicosilación (rhIFN- α 2bM4/M23/M70/M77) presenta un perfil de liberación en el tiempo equivalente a la molécula de interferón-PEG 12000 disponible comercialmente, resultando ser un producto con alto grado de N-glicosilación y con un elevado grado de homogeneidad en cuanto al perfil de glicosilación. Por otro lado es de destacar la relevancia de que el producto obtenido no involucra reacciones químicas o la adición de polímeros sintéticos.

Los resultados obtenidos de la medición de la actividad biológica en función del tiempo muestran que la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, en particular la correspondiente a la muteína con un nuevo sitio de N-glicosilación en la posición Lys70, presenta un incremento de 1,63 respecto de una muteína con un nuevo sitio de N-glicosilación en un sitio carente de estructura alfa hélice (rhIFN- α 2bM23). Esto indica la importancia de seleccionar sitios de N-glicosilación en estructuras tipo alfa hélice.

La muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención presenta propiedades farmacocinéticas, físicas y químicas mejoradas respecto a las isoformas conocidas en el estado del arte obtenidas mediante cultivos celulares.

Una formulación farmacéutica de la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, otro objeto de la presente invención, para la administración y tratamiento de enfermedades tales como melanomas, hepatitis C crónica, hepatitis B aguda y crónica, hepatitis no-A no-B aguda

y crónica, Sarcoma de Kaposi, esclerosis múltiple, verrugas genitales, leucemia, infecciones virales, entre otras, consiste en la preparación de un polvo, gel, crema, liofilizado, tabletas o una solución para ser administrada por una vía seleccionada del grupo comprendido por subcutánea, parenteral, oral, sublingual, intranasal o aplicación tópica. Dicha formulación, en una preparación preferida de solución, presenta concentraciones de 0,02mg/ml a 3mg/ml de masa de proteína en solución. Dichas formulaciones en solución que comprenden el interferón de la presente invención, además comprenden un *buffer*, un estabilizador, un crioprotector y un solvente. Como *buffers*, son útiles aquellos que mantengan el pH entre 4,5 y 7,5, preferentemente entre 6,5 y 7,0, más preferentemente 6,8. Entre los *buffers* utilizados se mencionan citrato/ácido cítrico, acetato/ácido acético; fosfato dibásico/monobásico, preferentemente fosfato dibásico/monobásico en concentración molar entre 0,005 a 0,1 molar. Como estabilizadores preferidos son útiles los derivados del poli(oxi-1,2- etanedil), entre éstos, más preferentemente el mono-9-octadecenoato poli (oxi-1,2-etanedil), Polysorbato 80, que puede utilizarse en un rango de concentraciones de 0,01 a 1 mg/ml. Como crioprotectores son útiles carbohidratos tales como sacarosa o manitol, agentes tensoactivos tales como glicerol, dimetilsulfoxido ó Tween. Preferentemente el crioprotector es un carbohidrato, más preferentemente la sacarosa en un rango de concentraciones que va desde 20 a 100 mg/ml.

La presente invención tiene como otro objeto el uso de la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención para la elaboración de un medicamento para ser usado en un protocolo terapéutico que permite reducir las dosis terapéuticas del IFN alfa 2b. Puede ser administrado como monoterapia o en forma de terapia combinada con ribavirina; como monoterapia por vía subcutánea en dosis de 0,1 microgramos/kg a 2,0 microgramos/kg del paciente por semana. Más preferentemente en dosis 0,5 microgramos/kg a 1,0 microgramos/kg del

paciente por semana. En el caso de terapia combinada se administra una dosis de 0,5 a 3,0 microgramos/kg por semana de la muteína de la invención en combinación con ribavirina en cápsulas. Más preferentemente en dosis de 1,0 a 2,0 microgramos/kg por semana de la muteína de la invención en combinación con ribavirina en cápsulas.

Para una mejor comprensión de la presente invención se describen los siguientes ejemplos, los cuales no deben ser interpretados como una limitación impuesta al alcance de la misma. Por el contrario, debe entenderse claramente que puede recurrirse a otras realizaciones, modificaciones y equivalentes de la misma que luego de leerse la presente descripción, puede sugerir a aquellos entendidos en el tema sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o alcance de las reivindicaciones anexas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Aislamiento del gen del IFN-α2b humano a partir de ADN genómico de leucocitos

El gen del hIFN-α2b se obtuvo mediante una reacción de amplificación por PCR, utilizando como molde ADN genómico obtenido a partir de leucocitos de sangre periférica humana (Sambrook y col., 1989). Para la reacción de PCR se emplearon oligonucleótidos específicos que hibridan en ambos extremos de la secuencia codificante del hIFN-α2b, denominados IFNalfaF e IFNalfaR, los cuales se indican en la Tabla I.

TABLA I: Oligonucleótidos empleados para la construcción de plásmidos conteniendo el rhIFN-α2b *wild type*

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica
IFNalfaF	5' TAACGAATTCACATCTACAATGGCCTTGAC 3' EcoRI
IFNalfaR	5' ATAGTCTAGAGTCTTTGAAATGGCAGATCA 3' XbaI

El fragmento de 673 pb obtenido fue clonado en el plásmido comercial pGEM® T Easy Vector (Promega) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La secuenciación de esta construcción, denominada pGEM-rhIFN- α 2bwt, confirmó la identidad del fragmento clonado, observándose un 100% de homología con la secuencia publicada en el Banco de Genes (Gen Bank) para el hIFN- α 2b. En la Fig. 1 se observa la secuencia nucleotídica correspondiente al ADNc del hIFN- α 2b y la secuencia aminoacídica correspondiente a la proteína codificada por el mismo.

Ejemplo 2: Selección de los aminoácidos a modificar en el gen del rhIFN- α 2b para obtener nuevos sitios de N-glicosilación

Con el objetivo de seleccionar los aminoácidos a mutar de manera de crear en forma artificial sitios de N-glicosilación, se decidió en primera instancia llevar a cabo el menor número posible de cambios en la secuencia de aminoácidos del hIFN- α 2b natural. Es decir, se idearon estrategias para obtener un sitio artificial de N-glicosilación mediante la sustitución de un único aminoácido de la cadena polipeptídica del rhIFN- α 2b natural, con el fin de minimizar la alteración estructural de la molécula. De esta forma y recordando la secuencia consenso buscada (Asn-Xaa-Ser/Thr), se analizaron dos estrategias:

- 1- Localización de todas las serinas y/o treoninas en la secuencia aminoacídica del hIFN- α 2b natural, tercera posición de la secuencia consenso, y cambio del aminoácido que ocupa la primera posición por asparagina.
- 2- Ubicación de todas las asparaginas presentes en la secuencia del hIFN- α 2b natural (primera posición de la secuencia consenso) y mutación del aminoácido en la tercera posición por una serina o treonina.

Una vez identificados dichos aminoácidos, se procedió a estudiar los sitios de glicosilación resultantes de las correspondientes mutaciones teniendo

67

en cuenta dos aspectos básicos: elevada probabilidad de glicosilación y conservación de la actividad biológica de la proteína.

El primer aspecto se evaluó con el objeto de generar, en lo posible, un alto grado de ocupación de los sitios elegidos. Para ello, se llevó a cabo el siguiente análisis:

a- Área superficial accesible al solvente (ASA %) del aminoácido ubicado en la primera posición de la secuencia consenso (Asn u otro aminoácido mutado por Asn). Este estudio proporcionó información con respecto al grado de exposición superficial del aminoácido presente en la estructura de la proteína al cual se uniría la cadena de oligosacáridos. Este parámetro se calculó utilizando el programa informático ASAview (Ahmed, S., Gromiha, M., Fawereh, H., Sorci, A., BMC Bioinformatics, 2004, 5:51; <http://www.netasa.org/asaview/>).

b- Probabilidad de glicosilación teniendo en cuenta la información presente en bases de datos de glicoproteínas conocidas. Este parámetro se determinó empleando el programa NetNGlyc 1.0 Server (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) creado por el Centro de Análisis de Secuencias Biológicas (CBS, Universidad Técnica de Dinamarca).

Por otro lado, se analizaron las mutaciones seleccionadas desde el punto de vista de evitar una pérdida de la actividad biológica de la proteína. Este aspecto se estudió teniendo en cuenta dos características:

a- Cercanía del sitio probable de glicosilación a la región molecular involucrada en la unión al receptor. De no tenerse en cuenta este parámetro, existiría una elevada probabilidad de generar glicoproteínas cuyas cadenas hidrocarbonadas interferirían en la unión al receptor, obteniéndose formas biológicamente inactivas del hIFN- α 2b.

b- Área superficial accesible al solvente (ASA%): la unión de oligosacáridos a residuos ocultos o en el interior de la proteína podría generar una alteración de la estructura terciaria de la misma, disminuyendo así su actividad biológica.

Los sitios posibles de ser sometidos a mutagénesis sitio-dirigida para obtener una secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr son: Leu9, Arg12, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Leu95, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Gln158 en estructuras secundarias tipo alfa hélice y Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Phe47, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161 fuera de estructuras secundarias tipo alfa hélice.

De los sitios posibles de ser sometidos a mutagénesis sitio-dirigida para obtener una secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr, fueron seleccionados los aminoácidos Pro4, Arg23, Lys70 y Asp77 (se muestran en la figura 1) para obtener construcciones de rhIFN- α 2b mutadas por Asn en las posiciones aminoacídicas indicadas. Estos sitios seleccionados satisficieron las pruebas y análisis mencionados anteriormente.

Ejemplo 3: Mutagénesis sitio-dirigida y clonado de los genes mutados en vectores de expresión para células eucariotas

El procedimiento de mutagénesis sitio-dirigida para la introducción de sitios de N-glicosilación en el gen del hIFN- α 2b se realizó mediante técnica de PCR en su variante extensión por solapamiento, la cual consistió básicamente en 2 reacciones de PCR consecutivas. La descripción de la técnica empleada se resume en la Fig. 2. Ambas etapas de PCR se llevaron a cabo en termociclador, durante 30 ciclos compuestos por las siguientes etapas: desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, hibridización a 60° C durante 30 segundos y elongación a 72° C durante 1 minuto.

Los oligonucleótidos empleados para llevar a cabo las mutaciones puntuales seleccionadas se describen en la Tabla II. De esta manera, se obtuvo la secuencia nucleotídica correspondiente a cuatro variantes mutadas del hIFN- α 2b donde se incorporó un único sitio de N-glicosilación, denominadas rhIFN- α 2bM4, rhIFN- α 2bM23, rhIFN- α 2bM70 y rhIFN- α 2bM77, en las cuales los codones correspondientes a los aminoácidos Pro4, Arg23, Lys70 y Asp77 fueron sustituidos por un codón que codifica para una Asn, respectivamente.

Los fragmentos de ADN obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI y clonados en el vector de expresión pCI-neo, obteniéndose las construcciones denominadas pCI-neo-rhIFN- α 2bM4, pCI-neo-rhIFN- α 2bM23, pCI-neo-rhIFN- α 2bM70 y pCI-neo-rhIFN- α 2bM77.

Tabla II: Oligonucleótidos empleados para la construcción de plásmidos conteniendo las diferentes variantes glicosiladas

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica
Mut4a	5' GGGCTGTGATCTGA <u>A</u> TCAAACCCACAGCCT 3'
Mut4b	5' AGGCTGTGGGTTTGAT <u>T</u> CAGATCACAGCCC 3'
Mut23a	5' GGCACAGATGAGGA <u>A</u> TATCTCTCTTTTCTC 3'
Mut23b	5' GAGAAAAGAGAGAT <u>A</u> TCCTCATCTGTGCC 3'
Mut70a	5' CTCTTCAGCACAAAT <u>G</u> ACTCATCTGCTGCTTGG 3'
Mut70b	5' CCAAGCAGCAGATGAGTC <u>A</u> TTTGTGCTGAAGAG 3'
Mut77a	5' CATCTGCTGCTTGG <u>A</u> ATGAGACCCTCCTAGACA 3'
Mut77b	5' TGTCTAGGAGGGTCTCAT <u>I</u> CCAAGCAGCAGATG 3'

Para la obtención de la mutante de rhIFN- α 2b con cuatro sitios de N-glicosilación, denominada pCI-neo-rhIFN- α 2bM4/23/70/77, se procedió a adicionar un sitio de N-glicosilación en forma secuencial empleando la

técnica de mutagénesis sitio-dirigida previamente descrita. De esta manera, se construyó una mutante con dos sitios de N-glicosilación, utilizando como molde una molécula conteniendo un sitio de N-glicosilación. Posteriormente se construyó una variante con tres sitios de N-glicosilación empleando como templado la molécula que contenía dos sitios de N-glicosilación. Finalmente se obtuvo la mutante con los cuatro sitios de N-glicosilación, realizando la reacción de mutagénesis sobre la molécula que contenía tres sitios de N-glicosilación. En cada paso se realizó el clonado de cada variante en el vector de expresión pCI-neo.

Todas las construcciones de ADN conteniendo las diferentes variantes N-glicosiladas del rhIFN- α 2b fueron secuenciadas, lo que permitió verificar el éxito de las mutaciones realizadas.

Ejemplo 4: Expresión transitoria de las variantes N-glicosiladas del interferón alfa humano en células CHO.K1 (Chinese Hamster Ovary)

Con el objeto de evaluar la integridad del gen correspondiente a cada variante del interferón alfa humano, su expresión, el grado de glicosilación de la citoquina y la actividad específica de cada variante se llevaron a cabo procedimientos de transfección de células CHO.K1 mediante técnica de lipofección con los plásmidos pCI-neo-rhIFN- α 2bM4, pCI neo-rhIFN- α 2bM23, pCI-neo-rhIFN- α 2bM70, pCI-neo-rhIFN- α 2bM77 y pCI-neo-rhIFN- α 2bM4/M23/M70/M77.

Para ello, se sembraron $3 \cdot 10^5$ células. ml^{-1} CHO.K1 por pozo de una placa de 6 cavidades utilizando medio de cultivo para células de mamífero (MC) preparado a partir de una mezcla 1:1 (V:V) de los medios D-MEM y Ham's F12 suplementado con NaHCO_3 2,441 g/l, D(+) glucosa anhidra 6,6 mM, piruvato de sodio 1 mM, glutamina 7,8 mM, triptofano 0,13 mM, ácido aspártico 0,3 mM, serina 0,76 mM y sulfato de gentamicina 50 $\mu\text{g/ml}$. Dicho

medio fue adicionalmente suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5 % (V/V). Al día siguiente, se retiró el sobrenadante de los cultivos y la capa celular fue lavada empleando el medio MC. Simultáneamente, se prepararon diferentes mezclas conteniendo 10 µg de lípido catiónico (LipofectAMINE® 2000, Invitrogen) y 6 µg del correspondiente ADN plasmídico diluido en medio MC. Estas preparaciones fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de ser adicionadas al cultivo celular. Posteriormente, la solución de lavado fue retirada de cada cavidad procediéndose al agregado de las diferentes soluciones conteniendo los liposomas las cuales fueron incubadas durante 4 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se eliminó el sobrenadante de cultivo, adicionándose medio de cultivo suplementado con SFB al 5 % (V/V). Luego de 72 horas de incubación, el sobrenadante de cultivo fue cosechado con el fin de evaluar la expresión de las variantes del rhIFN-α2b glicosilado.

La evaluación de la expresión y grado de glicosilación de las diferentes isoformas se llevó a cabo mediante técnica de ELISA *sandwich* y *Western Blot*, respectivamente.

Ejemplo 5: Cuantificación de rhIFN α2b mediante técnica de ELISA *sandwich*

Placas de poliestireno de fondo plano de 96 cavidades fueron sensibilizadas con 100 µl de una solución de 1 µg.ml⁻¹ de mAb (100 ng por cavidad) diluido en solución de carbonato/bicarbonato de sodio 50 mM, pH 9,6 (solución de sensibilización). Las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C y durante toda la noche a 4°C. Luego de lavar 6 veces con solución salina de fosfatos (PBS), Tween 20 0,05 % (V/V), las placas fueron bloqueadas con 200 µl PBS con el agregado de albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % (P/V). Posteriormente, se adicionaron 100 µl de diluciones sucesivas al medio de rhIFN-α2b no glicosilado (proteína estándar) desde 25 ng.ml⁻¹ hasta 0,39 ng.ml⁻¹ empleando solución de PBS,

BSA 0,1 % (P/V), Tween 20 0,05 % (V/V) (solución diluyente), incubándose durante 1 hora a 37°C. Luego de los lavados correspondientes, se adicionaron 100 µl de una solución de anticuerpos policlonales de conejo anti-rhIFN-α2b diluidos 1:2.000 con solución diluyente. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se agregaron 100 µl de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa diluidos 1:1.000 con solución diluyente, incubándose durante 1 hora a 37°C. Luego de lavar las placas, el revelado de las mismas se llevó a cabo empleando como sustrato agua oxigenada 0,12 volúmenes diluida en solución de citrato fosfato 50 mM, pH 5,3 con el agregado de o-fenilendiamina en una concentración de 3 mg.ml⁻¹. Se adicionaron 100 µl de la solución de revelado a cada cavidad y las placas se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente. Luego de incubar las placas durante 15 minutos se determinó la absorbancia de la solución presente en cada cavidad mediante lectura del color generado a 450 nm en un lector de placas de microtitulación. Los resultados de las experiencias de transfecciones transitorias demostraron la expresión de rhIFN-α2b recombinante para todas las variantes analizadas luego de 72 horas post-transfección

Ejemplo 6: Identificación de las variantes de rhIFN-α2b mediante técnica de *Western Blot*

En primera instancia, se llevó a cabo el procedimiento de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia del reactivo dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y un agente reductor de enlaces disulfuro siguiendo esencialmente el método descrito por Laemmli (1970). Para ello, las muestras fueron tratadas con solución de Tris-HCl 0,05 M, SDS 2 % (P/V), glicerol 10 % (V/V), β-mercaptoetanol 5 % (V/V), azul de bromofenol 0,05 % (P/V), pH 6,8. Las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 3 minutos y sembradas directamente sobre el gel de apilamiento, cuya concentración de monómero/ramificante (acrilamida/bisacrilamida) fue del 5

% (P/V). El gel de separación fue polimerizado con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 15 % (P/V). La corrida se llevó a cabo a voltaje constante (200 mV) hasta que el frente de corrida alcanzó 0,5 cm del borde inferior del gel de separación. Luego de la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Se utilizó un protocolo estándar de transferencia de proteínas empleando Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % (V/V), pH 8,3 como solución de transferencia. La transferencia se llevó a cabo a intensidad de corriente constante de 180 mA durante 1 hora. Finalizada la misma, el éxito de la transferencia se evaluó detectando la presencia de proteínas con solución de Rojo Ponceau al 0,25 % (P/V) en ácido acético glacial 15 % (V/V) y metanol 40 % (V/V). Posteriormente, el colorante se eluyó por lavados sucesivos con solución salina de Tris (TBS) y la membrana fue bloqueada con solución de TBS, BSA 1 % (P/V). Luego de tres lavados sucesivos con solución de TBS, la membrana fue incubada con una solución de anticuerpos policlonales de conejo anti-rhIFN- α 2b diluidos 1:1.000 con solución diluyente (TBS, BSA 0,1 % (P/V)). Luego de los correspondientes lavados, la membrana fue incubada con una solución de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa diluidos 1:2.000 en solución diluyente. Todas las incubaciones fueron llevadas a cabo en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió al revelado de la membrana mediante reacción de quimioluminiscencia empleando el kit comercial ECL Plus Western Blotting Reagent (GE Healthcare). La emisión de luminiscencia fue detectada mediante exposición de la membrana a películas fotográficas durante un período de tiempo variable. El revelado de la película se efectuó en forma manual empleando el método convencional de fijación y revelado fotográfico.

Todas las variantes con un único sitio susceptible de N-glicosilación exhibieron una mezcla de muteínas de IFN α de diferente masa molecular,

correspondientes a fracciones no glicosiladas, O-glicosiladas y N,O-glicosiladas, siendo la proporción de cada una de ellas variable de acuerdo con la mutante analizada. En el caso particular de la muteína rhIFN- α 2bM70, se observó la expresión de muteínas de mayor masa molecular con respecto a las restantes muteínas que incorporaron un único sitio susceptible de N-glicosilación. Dichas isoformas corresponderían a moléculas que exhiben un mayor contenido de estructuras glicosídicas. Con respecto a la muteína rhIFN- α 2bM4/M23/M70/M77, se observó un grado de glicosilación variable con desaparición de la isoforma O-glicosilada y disminución de la proporción de aquellas correspondientes a un bajo grado de ocupación. Por otro lado, se observó una mayor concentración de isoformas con elevado grado de ocupación en un rango de masas moleculares comprendido entre 21 y 45 kDa.

En todos los casos (mutantes portando un único sitio o 4 sitios susceptibles de N-glicosilación) se confirmó la presencia de oligosacáridos unidos por enlaces tipo N mediante tratamiento de N-desglicosilación específica empleando la enzima PNGasa F (Asparagina amidasa, Biolabs). De esta manera, todas las muteínas coincidieron con bandas proteicas correspondientes a la variante O-glicosilada, confirmando la presencia de cadenas hidrocarbonadas unidas a través de enlace N-glicosídico en los sitios incorporados. La figura 3 ilustra los resultados obtenidos.

Ejemplo 7: Evaluación de la estabilidad de variantes del hIFN- α 2b N-glicosiladas en posiciones dentro de estructuras secundarias alfa helicoidales y fuera de estructuras secundarias alfa helicoidales frente a la acción de la enzima PNGasa F (N-desglicosidasa)

Se analizó la estabilidad de las muteínas rhIFN- α 2bM70 (cuyo sitio de N-glicosilación se encuentra comprendido en una región de la proteína de estructura secundaria tipo alfa hélice) y rhIFN- α 2bM23 (cuyo sitio de N-glicosilación se encuentra fuera de estructuras tipo alfa hélice) frente a la

acción de la enzima PNGasa, la cual produce la liberación de los oligosacáridos unidos por un enlace *N*-glicosídico a la cadena polipeptídica. Además, para extender los resultados a otras variantes *N*-glicosiladas en sitios con similares características, se construyeron dos muteínas adicionales, siguiendo esencialmente los pasos descritos en los ejemplos 3 y 4. De esta manera, mediante mutación del residuo Leu95 por Thr, se creó un sitio de *N*-glicosilación (Asn93-Asp94-Thr95) dentro de una estructura alfa helicoidal (hélice C), obteniéndose la muteína rhIFN- α 2bM95. Por otro lado, mediante mutación del residuo Phe47 por Thr, se obtuvo la muteína rhIFN- α 2bM47, la cual porta el sitio de *N*-glicosilación Asn45-Gln46-Thr47 en un asa de conexión, es decir, fuera de estructuras alfa helicoidales. Las cuatro muteínas mencionadas fueron analizadas desde el punto de vista de su estabilidad frente a la enzima *N*-desglicosilante.

Para ello, 350 μ l de sobrenadante de cultivo correspondiente a cada una de las mencionadas mutantes fueron tratados con 250 U de PNGasa F (Biolabs) e incubado a 37°C. La reacción de desglicosilación fue inhibida a diferentes intervalos de tiempo (30, 60, 90, 120, 150, 180 y 300 minutos) tomando una alícuota de 45 μ l de dicha mezcla e incubándola con 15 μ l de solución de Tris-HCl 0,05 M, SDS 2 % (P/V), glicerol 10 % (V/V), β -mercaptoetanol 5 % (V/V), azul de bromofenol 0,05 % (P/V), pH 6,8 durante 5 minutos a 100°C. Al finalizar la reacción de desglicosilación todas las muestras fueron analizadas mediante técnica de SDS-PAGE reductor y posterior ensayo de *Western Blot* siguiendo las etapas esencialmente indicadas en el ejemplo 6.

Luego de revelar las membranas por reacción de quimioluminiscencia se estimó el porcentaje de isoformas *N,O*-glicosiladas, *O*-glicosiladas y no glicosiladas presentes en las muestras mediante densitometría y posterior

valoración porcentual de las mismas empleando el software comercial ImageMaster TotalLab V1.11 (GE Healthcare, Suecia).

En la Fig. 4 se resumen los resultados de desglicosilación enzimática correspondientes a las 4 variantes mutadas de hIFN- α 2b. La mutante IFN- α 2bM23 demostró completa eliminación del enlace N-glicosídico luego de 150 minutos de incubación con la enzima, mientras que la mutante IFN- α 2bM47 redujo su grado de N-glicosilación en un 50 % luego de los 30 minutos de tratamiento enzimático. Por otro lado, las mutantes IFN- α 2bM70 y IFN- α 2bM95 conservaron aproximadamente un 40 % de las variantes N,O-glicosilada al final del experimento, con respecto al total de formas de IFN presentes en cada muestra.

En la Fig. 5 se observa la variación porcentual de N-glicosilación en función del tiempo expresada como porcentaje de la misma con respecto a la cantidad presente al inicio del procedimiento de desglicosilación enzimática. Notoriamente, se visualiza la mayor estabilidad de las variantes IFN- α 2bM70 y IFN- α 2bM95 que conservaron una elevada proporción de dicha isoforma (90% y 70%, respectivamente) luego de 300 minutos de reacción.

Analizando la estructura molecular del hIFN- α 2b, se observa que la posición aminoacídica Arg23 se halla en el inicio de un asa de conexión de dos estructuras α -hélices y la posición aminoacídica Phe47 se encuentra en la región central de otra asa de conexión, lo que le conferiría mayor susceptibilidad a la acción de la enzima desglicosilante. Las posiciones Lys70 y Leu95, en cambio, forman parte de una α -hélice (hélice B' y hélice C, respectivamente). Este tipo de estructura conferiría a ambos sitios mayor resistencia y como consecuencia superior estabilidad a la acción de N-glicanasas.

Ejemplo 8: Evaluación de la actividad biológica antiviral *in vitro* de las variantes mutadas de rhIFN- α 2b

La actividad biológica de las diferentes variantes del hIFN- α 2b fue determinada mediante medición del efecto antiviral de las mismas sobre cultivos de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney, ATCC CCL-22) infectados con el virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), cepa Indiana (ATCC VR-158). Para ello, placas de fondo plano de 96 cavidades fueron sembrados con 100 μ l de una suspensión celular de 250.000 cél.ml⁻¹ empleando medio de cultivo MEM suplementado con L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 2,2 mg.ml⁻¹, gentamicina 50 μ g.ml⁻¹ y suero fetal bovino al 10 %(V/V) (medio de crecimiento).

La actividad biológica de las diferentes muteínas fue determinada mediante medición del efecto antiviral de las mismas sobre cultivos de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney, ATCC CCL-22) infectados con el virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), cepa Indiana (ATCC VR-158). Para ello, placas de fondo plano de 96 cavidades fueron sembrados con 100 μ l de una suspensión celular de 250.000 cél.ml⁻¹ empleando medio de cultivo MEM suplementado con L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 2,2 mg.ml⁻¹, gentamicina 50 μ g.ml⁻¹ y suero fetal bovino al 10 %(V/V) (medio de crecimiento). Las placas se incubaron durante toda la noche en estufa a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% saturada de humedad. Al día siguiente, se eliminó el sobrenadante de cultivo y se agregaron 100 μ l de sucesivas diluciones al medio de rhIFN- α 2b no glicosilado (estándar) desde 20 U.ml⁻¹ hasta 0,156 U.ml⁻¹ y las correspondientes muestras a evaluar en diluciones adecuadas. Todas las diluciones se efectuaron en un medio de cultivo idéntico al de crecimiento con una concentración de SFB al 2% (V/V) (medio de ensayo). Las placas fueron incubadas en estufa durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante y las placas se lavaron mediante el empleo de medio de ensayo. Finalmente, se agregaron 100 μ l de una suspensión del virus VSV preparado en medio de ensayo. Se

trabajó con aquella dilución viral capaz de generar al cabo de 20-24 horas una acción citopática del 100 %. Las placas se incubaron toda la noche en estufa a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% saturada de humedad. Al día siguiente, al observar una acción citopática aproximada del 100 % en aquellas cavidades controles en ausencia de IFN, se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión de las placas y se procedió al revelado de las mismas empleando 50 µl de solución de cristal violeta 0,75 %(P/V) en metanol 40 %(V/V). Las placas se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Se eliminó el colorante y las placas fueron lavadas con agua destilada hasta verificar la ausencia de colorante en los lavados. Luego de escurrir las placas, se adicionaron 250 µl de solución de ácido acético al 20 %(V/V). Las placas fueron homogeneizadas hasta observar una coloración uniforme en cada cavidad, determinándose finalmente la absorbancia del colorante por mediciones espectrofotométricas a $\lambda=540$ nm.

Se determinó el parámetro actividad biológica específica (ABE) de cada molécula (Tabla III). Las mutantes rhIFN- α 2bM4, rhIFN- α 2bM23 y rhIFN- α 2bM77 exhibieron niveles variables de actividad específica en un rango comprendido entre 160 y 290 U.ng⁻¹. De esta manera, la incorporación de mutaciones en la secuencia proteica y/o la presencia de cadenas hidrocarbonadas de tipo N- no alteraron significativamente la actividad de dichas variantes al comparar con la actividad biológica específica del rhIFN- α 2b no-glicosilada (entre 150 y 200 U.ng⁻¹). En el caso de la muteína rhIFN- α 2bM70 se evidenció un descenso del mencionado parámetro en un 48%. Sin embargo, considerando la conservación de la actividad biológica específica de las variantes IFN- α 2bM4, IFN- α 2bM23 e IFN- α 2bM77 y el superior grado de glicosilación de la muteína rhIFN- α 2bM70, se obtuvo la correspondiente muteína portadora de los mencionados 4 sitios susceptibles de N-glicosilación. Al evaluar su

actividad biológica específica (26 U.ng⁻¹), se observó un descenso del 87% con respecto a la molécula no-glicosilada.

Tabla III: Evaluación de diferentes muteínas glicosiladas de rhIFN-α2b

Variante de rhIFN-α2b	Concentración (ng.ml ⁻¹)	ABE (U.ng ⁻¹)
IFN-α2bM4	186	265
IFN-α2bM23	143	287
IFN-α2bM70	221	105
IFN-α2bM77	153	164
IFN-α2bM4/23/70/77	109	26

Ejemplo 9: Obtención de líneas celulares estables productoras de rhIFN-α2b mutado

Para la obtención de líneas celulares estables productoras de rhIFN-α2b N-glicosilado, células CHO.K1 fueron transfectadas en forma transitoria con las diferentes construcciones siguiendo, esencialmente, las etapas descritas en el ejemplo 4. Posteriormente, los cultivos fueron sometidos a presión de selección con el antibiótico Neomicina (200 µg.ml⁻¹) entre 72 y 168 horas post-transfección. Luego de dos semanas de cultivo en presencia del mencionado antibiótico, se cuantificaron los niveles de expresión de la citoquina mediante técnica de ELISA sándwich y las líneas productoras (CHO pCI-neo-rhIFN-α2bM4, CHO pCI-neo-rhIFN-α2bM23, CHO pCI-neo-rhIFN-α2bM70, CHO pCI-neo-rhIFN-α2bM77 y CHO pCI-neo-rhIFN-α2bM4/23/70/77) fueron conservadas en nitrógeno líquido. Posteriormente, las líneas celulares que conservaron la expresión de la citoquina fueron clonadas por el método de dilución límite. En la Tabla IV se detallan los clones seleccionados y su productividad específica en fase estacionaria. En la misma, se remarcan los clones de cada línea celular que demostraron mayor productividad, los cuales fueron empleados para la fase de producción de cada variante de rhIFN-α2b mutado.

Tabla IV: Clonado de las líneas productoras y evaluación de la productividad específica de los clones obtenidos

Línea	Clon	Productividad específica (ng. 10 ⁶ cél ⁻¹ .día ⁻¹)
CHO pCI-neo-IFN-α2bM4	m41A6	20,52
	m42E5	27,01
	m42F8	45,43
	m42G5	16,40
CHO pCI-neo-IFN-α2bM23	m231F2	46,67
	m231D7	106,93
CHO pCI-neo-IFN-α2bM70	m701E3	42,55
	m702B2	6,67
CHO pCI-neo-IFN-α2bM77	m771A6	36,95
	m771C6	76,29
	m772B1	47,27
	m772D4	54,37
	m772E7	44,33
	m772G8	36,30
CHO pCI-neo-IFN-α2bM4/23/7077	L1A8	19,16
	L1B8	21,26
	L2A8	11,55
	L2C8	39,72
	3D2F5	46,50
	3D2C8	12,28
	3D2G8	6,65
	7D1H6	16,86
	7D1F7	9,92
	7D2H3	5,91
	7D2A5	6,99
	7D2H7	5,46
	7D2F8	2,32
	7D1H6	16,86
	7D1F7	9,92
	7D2H3	5,91

Ejemplo 10: Producción de rhIFN- α 2b mutado mediante el cultivo de los clones seleccionados en condiciones de adherencia

En primera instancia, se determinó la productividad específica de rhIFN- α 2b durante las diferentes fases del cultivo celular, exhibiendo los clones evaluados, una mayor productividad específica de la citoquina durante la fase estacionaria del cultivo.

En segundo lugar, se ensayaron diferentes concentraciones de SFB para suplementar el medio de cultivo, con el objeto de disminuir el contenido proteico de los sobrenadantes y facilitar la posterior purificación de la variante del rhIFN- α 2b. Con este fin, los clones se cultivaron empleando medio de cultivo (MC) suplementado con SFB al 5% (V/V) y, cuando alcanzaron la fase estacionaria, el sobrenadante condicionado fue sustituido por medio de cultivo fresco conteniendo diferentes concentraciones de suero: 5%, 1%, 0,5% y 0,1% (V/V). Luego de 24 horas de cultivo, se observó una drástica caída de la productividad específica al pasar de una concentración de SFB del 5% al 1% (V/V). Sin embargo, la productividad específica empleando concentraciones de SFB al 1% y 0,5% (V/V) fue similar, seleccionándose esta última concentración de suero para llevar a cabo la producción. De esta manera, se logró disminuir diez veces el contenido proteico de las muestras a purificar.

Por último, se realizó una experiencia para determinar el número de recambios de medio de cultivo y el intervalo de tiempo óptimo entre los mismos con el objetivo de obtener la mayor masa posible de proteína recombinante. Se realizaron ocho cosechas y sus correspondientes recambios de medio de cultivo cada 24 horas y cuatro cosechas cada 48 horas en cultivos en fase estacionaria de crecimiento. Se encontró que la masa total acumulada del rhIFN- α 2b era similar en ambas experiencias, obteniéndose una mayor concentración de la citoquina en los sobrenadantes cosechados cada 48 horas.

En todas las experiencias anteriormente mencionadas, se evaluó la calidad de las proteínas producidas demostrándose que, independientemente de las condiciones ensayadas, se conservó la actividad biológica específica y el perfil de isoformas de masa molecular de las diferentes moléculas.

De esta manera, se procedió a la producción de las diferentes variantes del rhIFN- α 2b empleando frascos de cultivos de 500 cm² de superficie. Para ello, se sembraron aproximadamente $2 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹ empleando medio de cultivo MC suplementado con SFB al 5% (V/V). Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento se iniciaron los recambios secuenciales cada 48 y 72 horas empleando medio de cultivo MC suplementado con SFB al 0,5% (V/V). El sobrenadante de cultivo fue centrifugado a 3.000 r.p.m durante 10 minutos y conservado a -20°C para la posterior purificación de la variante correspondiente.

Ejemplo 11: Purificación del muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención a partir de sobrenadantes de cultivo

La purificación de las diferentes variantes mutadas del rhIFN- α 2b se realizó empleando el método de cromatografía de inmunofinidad, utilizando como ligando el mAb seleccionado como anticuerpo de captura para la técnica de ELISA *sandwich*.

En primera instancia, se realizó la producción in vivo del mAb en líquido ascítico, empleando un lote de 10 ratones BALB/c hembras de 2 meses de edad. Para ello, se realizó la inoculación intraperitoneal de 0,5 ml de ácido 2, 6, 10, 14-tetrametildecanoico (Pristane®, Sigma) a cada ratón y luego de 10 días se realizó la inoculación de $2 \cdot 10^6$ células de hibridoma por animal resuspendidas en 0,5 ml de PBS por la misma vía. El líquido ascítico fue recolectado por punción de la región intraperitoneal con aguja de 1,2 mm de diámetro, a partir de la primera semana posterior a la inoculación de

hibridomas. La concentración de inmunoglobulinas murinas en el fluido ascítico se determinó mediante técnica de ELISA sándwich.

La purificación del mAb se realizó por cromatografía de afinidad empleando una columna de proteína A Sepharose High Trap de 5 ml (GE Healthcare), siguiendo la técnica descrita por Harlow y Lane (1998). La concentración de inmunoglobulina pura fue calculada mediante lectura espectrofotométrica a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción porcentual ($E_{1cm}^{1\%}$) de 12,5. Multiplicando $10 \times (E_{1cm}^{1\%})^{-1}$ por la lectura de densidad óptica se obtiene la concentración de mAb expresada en mg.ml^{-1} .

El ligando de afinidad fue acoplado a una matriz de Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno siguiendo el protocolo estándar (GE Healthcare). El porcentaje de acoplamiento del mAb a la resina fue de un 98,3% y la capacidad teórica de la matriz fue de 186 μg de rhIFN- $\alpha 2\text{b}$ no glicosilado por ml de gel.

El protocolo de purificación de las muteínas del rhIFN- $\alpha 2\text{b}$ con un sitio de N-glicosilación y con cuatro sitios de N-glicosilación se describe a continuación. El sobrenadante de cultivo que contenía la citoquina fue acondicionado mediante el agregado de Tritón X-100 hasta alcanzar una concentración de 0,3% (V/V). La muestra acondicionada se aplicó a la columna previamente equilibrada con solución de Tris 0,1 M, Tritón X-100 0,3% (V/V) (pH 7,5) a un flujo de $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$. Posteriormente, se lavó con 5 volúmenes de columna empleando cada una de las siguientes soluciones:

1-solución de NaCl 0,5 M, Tritón X-100 0,2% (V/V) en Tris 0,025 M (pH 7,5).

2-solución de NaCl 0,15 M en agua (pH 5,0).

La elución del rhIFN- α 2b fue evaluada empleando tres soluciones diferentes:

- 1- solución de NaCl 0,15 M en ácido acético 0,2 M (pH 3,0)
- 2- solución de glicina 0,1 M (pH 2,5)
- 3- solución de glicina 0,1 M (pH 2,0).

Se recolectaron fracciones de 2 ml. Cada fracción fue neutralizada mediante el agregado de solución de Tris 1 M (pH 9,0). La matriz se conservó en solución de azida 0,02 % (P/V) en Tris 0,025 M (pH 7,5).

La presencia del rhIFN- α 2b fue evaluada en todas las fracciones mediante técnica de ELISA sándwich, obteniendo un mayor porcentaje de recuperación (en un rango comprendido entre el 95% y 100 %) mediante el empleo de la solución de glicina 0,1 M (pH 2,0).

La eficiencia de purificación se estudió mediante la técnica de SDS-PAGE en condiciones reductoras con posterior tinción argéntica y ensayos de *Western blot* (Figura 6). El porcentaje de pureza, estimado por densitometría de bandas, fue del 85 %. Además, los ensayos de *Western blot* demostraron que, para ambas variantes del rhIFN- α 2b, el perfil de isoformas de la molécula purificada fue muy similar al de la citoquina presente en los sobrenadantes de cultivo.

Ejemplo 12- Evaluación de los parámetros farmacocinéticos de las variantes con un único sitio de N-glicosilación denominadas rhIFN- α 2bM23 y rhIFN- α 2bM70 en animales de experimentación empleando la vía de inoculación subcutánea

Se evaluaron las propiedades farmacocinéticas de las variantes con un sitio susceptible de N-glicosilación fuera de regiones α -hélice (rhIFN- α 2bM23) y formando parte de una α -hélice (rhIFN- α 2bM70), empleando la vía de inoculación subcutánea. Para tal fin, ratas Wistar hembras, de dos

meses de edad, con un peso promedio de 200 g fueron inoculadas con las mencionadas variantes de IFN empleando una dosis única de $5 \times 10^5 \text{ U.Kg}^{-1}$ de peso corporal del animal. Posteriormente, a diferentes tiempos post inyección se recolectaron muestras de sangre mediante punción de la vena retroorbital empleando capilares heparinizados y se determinó la presencia de la citoquina cuantificando su actividad biológica volumétrica. Con los datos obtenidos se graficó actividad biológica de cada muestra en función del tiempo (Fig. 7). El mismo experimento se llevó a cabo empleando la molécula de IFN *wild type* (rhIFN- α 2bwt).

El cálculo del área debajo de las curvas (AUC) de actividad biológica en función del tiempo correspondiente a la variante glicosilada rhIFN- α 2bM70 demostró un incremento en una magnitud de 1,63 veces con respecto a la variante rhIFN- α 2bM23.

Ejemplo 13: Evaluación de parámetros farmacocinéticos de las diferentes variantes de rhIFN- α 2b en animales de experimentación

13-a)- Vía de inoculación endovenosa

Con el propósito de evaluar la influencia de la porción glicosídica sobre los parámetros farmacocinéticos de las variantes glicosiladas de rhIFN- α 2b se seleccionó la variante rhIFN- α 2bM77 (representante de las moléculas con un único de sitio susceptible de *N*-glicosilación fuera de una estructura alfa-hélice) y la muteína rhIFN- α 2bM4/23/70/77. Los estudios se realizaron en comparación con la molécula de rhIFN- α 2b producida en bacterias (no-glicosilada) y la versión conjugada covalentemente con una molécula de polietilenglicol (PEG) de 12 kDa (rhIFN- α 2b-PEG 12kDa; Schering Plough). Para tal fin, ratas Wistar hembras, de dos meses de edad, con un peso promedio de 200 g fueron inoculadas con una dosis única de 52,6 pmol de cada variante de IFN por animal empleando, en primera instancia, la vía de administración endovenosa (vena de la cola). En dicho ensayo, se utilizaron lotes de 4 animales por cada variante estudiada. Posteriormente,

a diferentes tiempos post-inyección se recolectaron muestras de sangre mediante punción de la vena retroorbital empleando capilares heparinizados. A partir de las mismas, se determinó la presencia de la citoquina cuantificando su actividad biológica volumétrica (AB) mediante el ensayo de valoración de la actividad biológica *in vitro* anteriormente mencionado. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de actividad biológica remanente en cada muestra con respecto a las unidades de actividad biológica de IFN suministrada a cada rata y se graficó dicho porcentaje en función del tiempo transcurrido desde su inoculación (Fig.8). El comportamiento de las diferentes moléculas se ajustó adecuadamente a un modelo bicompartimental, el cual se rige por la siguiente ecuación:

$$C = A \cdot e^{-t/t_1} + B \cdot e^{-t/t_2},$$

donde C es la fracción del fármaco remanente en la circulación al tiempo t, A y t1 son parámetros de la fase inicial que reflejan la distribución de la proteína a los fluidos extravasculares del organismo, mientras que B y t2 son parámetros que caracterizan la fase terminal de eliminación del fármaco.

De esta manera, se realizó un ajuste de regresión para todas las curvas obtenidas, determinándose los parámetros farmacocinéticos que se detallan en la Tabla V.

Tabla V. Evaluación de parámetros farmacocinéticos de las diferentes variantes de rhIFN-α2b.

Variante	t1 (minuto)	t2 (minuto)	Clearance plasmático (ml.min ⁻¹)
rhIFN-α2b noglicosilado	2,3 ± 0,1	14,1 ± 2,8	3,21
rhIFN-α2b M77	2,4 ± 0,2	62,0 ± 0,7	2,33
rhIFN-α2b M4/23/70/77	4,7 ± 0,3	125,8 ± 16,4	0,36
rhIFN-α2b-PEG (12kDa)	4,3 ± 1,0	59,6 ± 6,0	0,37

En dicha Tabla, se observa que el tiempo de vida media de la fase inicial (el cual es proporcional a t_1) de las moléculas de rhIFN- α 2b no-glicosilado e rhIFN- α 2bM77 es similar entre sí resultando inferior con respecto al calculado para las variantes rhIFN- α 2bM4/23/70/77 y rhIFN- α 2b-PEG. Por otro lado, el tiempo de vida media correspondiente a la fase de eliminación fue superior para la variante de rhIFN- α 2bM4/23/70/77.

Teniendo en cuenta las variantes no glicosiladas y glicosiladas de IFN, se observó un descenso del *clearance* plasmático a medida que se incrementó el contenido de hidratos de carbono. En el caso particular de la variante rhIFN- α 2bM4/23/70/77, se visualizó una reducción en dicho parámetro en una magnitud de 9 veces con respecto a la molécula de rhIFN- α 2b no modificada. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el cálculo del *clearance* plasmático correspondiente a las moléculas de rhIFN- α 2bM4/23/70/77 y rhIFN- α 2b-PEG.

13 b)-Vía de inoculación subcutánea

Adicionalmente, se evaluaron las propiedades farmacocinéticas de la muteína con cuatro sitios susceptibles de N-glicosilación (IFN- α 2bM4/23/70/77) empleando la vía de inoculación subcutánea. Para tal fin, ratas Wistar hembras, de dos meses de edad, con un peso promedio de 200 g fueron inoculadas con la mencionada variante de IFN empleando una dosis única de 5×10^5 U.Kg⁻¹ de peso corporal del animal. Simultáneamente, se inocularon animales con idéntica dosis de rhIFN- α 2b no glicosilado ó rhIFN- α 2b-PEG 12kDa. Posteriormente, a diferentes tiempos post inyección se recolectaron muestras de sangre mediante punción de la vena retroorbital empleando capilares heparinizados. A partir de las mismas, se determinó la presencia de la citoquina cuantificando su actividad biológica volumétrica mediante el ensayo de valoración de la actividad biológica *in vitro* anteriormente mencionado. Con los datos

obtenidos se graficó actividad biológica de cada muestra en función del tiempo (Fig. 9).

El cálculo del área debajo de las curvas (AUC) de actividad biológica en función del tiempo correspondiente a la variante N-glicosilada rhIFN- α 2bM4/23/70/77 demostró un incremento en una magnitud de 37 veces con respecto a la variante no glicosilada de la citoquina. Simultáneamente, la citoquina glicosilada alcanzó una concentración máxima de actividad biológica a partir de la primera hora post-inyección manteniéndose aproximadamente constante durante 10 horas. Dicha concentración máxima fue superior a la alcanzada por la variante no glicosilada, la cual se evidenció como un pico de concentración luego de 30 minutos posteriores a la inoculación de la misma. Finalmente, los niveles de actividad biológica de esta última variante se tornaron no detectables luego de 4 horas post-inyección.

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Una muteína recombinante del interferón alfa 2b humano con al menos un sitio de N-glicosilación de secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr **CARACTERIZADA PORQUE** dicho sitio es generado por la sustitución de un aminoácido que se encuentra comprendido en una estructura tipo alfa hélice, y dicho sitio es seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156.
2. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con la Reivindicación 1, **CARACTERIZADA PORQUE** dicho sitio es seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Lys70, Asn93, Glu113.
3. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, **CARACTERIZADA PORQUE** dicho sitio de N-glicosilación es uno y dicha muteína presenta una estabilidad frente a Nglicanasas de al menos 70% respecto de la concentración inicial luego de 300 minutos de reacción.
4. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con las Reivindicaciones 1 o 2, **CARACTERIZADA PORQUE** además posee al menos un sitio de glicosilación en una posición fuera de una estructura tipo alfa hélice.

5. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con la Reivindicación 4, **CARACTERIZADA PORQUE** dicho sitio de glicosilación en una posición fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice es seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Asn45, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.
6. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con las Reivindicaciones 1 o 2, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende dos sitios de N-glicosilación.
7. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con la Reivindicación 6, **CARACTERIZADA PORQUE** posee un sitio de N-glicosilación en la posición Lys70 y un sitio de N-glicosilación en una posición fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Arg23 y Asp77.
8. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con las Reivindicaciones 1 o 2, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende tres sitios de N-glicosilación.
9. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con la Reivindicación 8, **CARACTERIZADA PORQUE** posee un sitio de N-glicosilación en la posición Lys70 y dos sitios de glicosilación seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Arg23 y Asp77.
10. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con las Reivindicaciones 1 o 2, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende cuatro sitios de N-glicosilación.

11. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con la Reivindicación 10, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha muteína presenta un clearance plasmático menor o igual a 0,36 ml/min.
12. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con la Reivindicación 10 u 11, **CARACTERIZADA PORQUE** dicha muteína comprende los sitios de glicosilación Pro4, Arg23, Lys70 y Asp77.
13. La muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con las Reivindicaciones 1 o 2, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende cinco sitios de N-glicosilación en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos Lys70, Pro4, Arg23, Asp77, Leu95 y Glu113.
14. Un gen que codifica para una muteína recombinante del interferon alfa 2b humano con al menos un sitio de N-glicosilación de secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr **CARACTERIZADO PORQUE** dicho sitio es generado por una mutación sitio-dirigida que genera dicho sitio de N-glicosilación en una estructura tipo alfa hélice, y dicho sitio es seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156.
15. El gen de acuerdo con la Reivindicación 14, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende mutaciones sitio-dirigidas de manera de generar la sustitución de un aminoácido para la obtención de una muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con la reivindicación 3, y dicha muteína presenta una estabilidad frente a Nglicanasas de al menos 70% respecto de la concentración inicial luego de 300 minutos de reacción.

16. El gen de la Reivindicación 14 o 15, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha mutación se realiza en el aminoácido de la posición Lys70.
17. El gen de la Reivindicación 14, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicho gen presenta además al menos una mutación sitio-dirigida que genera una secuencia consenso tipo Asn-Xaa-Ser/Thr, donde la Asn es susceptible de sufrir una unión N-glicosídica con un oligosacárido y está fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice.
18. El gen de la Reivindicación 17, **CHARACTERIZADA PORQUE** dicha mutación sitio-dirigida , que genera un sitio de N-glicosilación fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice, se realiza en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Phe47, Ala50, Leu66, Phe67, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.
19. El gen de acuerdo con la Reivindicación 14, **CHARACTERIZADA PORQUE** comprende mutaciones sitio-dirigidas que modifican dos posiciones aminoacídicas.
20. El gen de acuerdo con la Reivindicación 19, **CHARACTERIZADA PORQUE** dichas mutaciones se realizan en el aminoácido correspondiente a la posición Lys70 y en un aminoácido seleccionado del conjunto comprendido por los aminoácidos Pro4, Arg23 y Asp77.
21. El gen de acuerdo con la Reivindicación 14, **CHARACTERIZADA PORQUE** comprende mutaciones sitio-dirigidas que modifican tres posiciones aminoacídicas.
22. El gen de acuerdo con la Reivindicación 21, **CHARACTERIZADA PORQUE** dichas mutaciones sitio-dirigidas se realizan en el aminoácido correspondiente a la posición Lys70 y a dos de los

aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos Pro4, Arg23 y Asp77.

23. El gen de acuerdo con la Reivindicación 14, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende mutaciones sitio-dirigidas que modifican cuatro posiciones aminoacídicas.
24. El gen de acuerdo con la Reivindicación 23, **CARACTERIZADA PORQUE** dichas mutaciones sitio-dirigidas se realizan en los aminoácidos correspondientes a las posiciones Lys70, Pro4, Arg23 y Asp77.
25. El gen de acuerdo con la Reivindicación 14, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende mutaciones sitio-dirigidas que modifican cinco posiciones aminoacídicas.
26. El gen de acuerdo con la Reivindicación 25, **CARACTERIZADA PORQUE** dichas mutaciones se realizan en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos Lys70, Pro4, Arg23, Asp77, Leu95 y Glu113.
27. Un método para producir el gen de las Reivindicaciones 14 a 26, **CARACTERIZADA PORQUE** codifica a la muteína del interferón humano de la invención caracterizado porque comprende los pasos de:
 - a) clonar el gen que codifica para el interferón alfa 2b humano en un vector adecuado para su amplificación,
 - b) producir el gen que codifica la muteína del interferón alfa 2b humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 mediante la técnica de mutagénesis sitio-dirigida,

- c) clonar el gen modificado genéticamente obtenido en el paso b, en un vector de expresión eucariota adecuado.
28. Un método para producir una línea celular eucariota productora de la muteína recombinante de interferón alfa 2b humano de acuerdo con las Reivindicaciones 1 a 13, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende los pasos de:
- a) transformar o transfectar dicha célula eucariota con dicho vector de expresión eucariota,
 - b) seleccionar aquel clon que exprese la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con las Reivindicaciones 1 a 13.
29. El método de la Reivindicación 28, **CARACTERIZADA PORQUE** la línea celular eucariota comprende a una línea celular derivada de la línea CHO.K1.
30. Un método para producir la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende los pasos de:
- a) cultivar dicha célula eucariota transformada o transfectada con un vector de expresión que contiene el gen que codifica para la muteína del interferón alfa humano de las Reivindicaciones 1 a 13,
 - b) aislar la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano excretada al medio de cultivo.
31. Un método para purificar la muteína del interferón humano de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13, presente en el medio de cultivo de la Reivindicación 30, **CARACTERIZADA PORQUE** la purificación de dicha muteína se realiza mediante cromatografía de inmunoafinidad.

32. Un método para producir el gen de las Reivindicaciones 14 a 26, que codifica a la muteína del interferón humano de la invención **CARACTERIZADA PORQUE** comprende los pasos de:
- a) clonar el gen que codifica para el interferón alfa 2b humano en un vector adecuado para su amplificación,
 - b) producir el gen que codifica la muteína del interferón alfa 2b humano de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13 mediante la técnica de mutagénesis sitio-dirigida,
 - c) clonar el gen modificado genéticamente obtenido en el paso b, en un vector de expresión procariota adecuado.
33. Un método para producir la muteína recombinante del interferón humano de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13, **CARACTERIZADA PORQUE** comprende los pasos de:
- a) transformar o transfectar una célula procariota con vector de expresión procariota adecuando,
 - b) seleccionar aquel clon que exprese el polipéptido de la muteína recombinante del interferón alfa 2b humano de acuerdo con las Reivindicaciones 1 a 13,
 - c) cultivar dicho clon, transformado o transfectado, con dicho vector de expresión procariota adecuado que contiene el gen que codifica para la muteína del interferón alfa 2b humano de las Reivindicaciones 1 a 13,
 - d) purificar el polipéptido de la muteína del interferón alfa 2b humano de acuerdo con las Reivindicaciones 1 a 13,
 - e) glicosilar "*in vitro*" el polipéptido de la muteína del interferón alfa 2b humano de acuerdo con las Reivindicaciones 1 a 13,
 - f) purificar la muteína del interferón alfa 2b humano de las Reivindicaciones 1 a 13.

34. Una composición farmacéutica **CARACTERIZADA PORQUE** comprende al menos una muteína recombinante del interferon alfa 2b humano de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13.
35. La composición de acuerdo con la Reivindicación 34 **CARACTERIZADA PORQUE** además contiene excipientes farmacológicamente aceptables.

RESUMEN

Una muteína recombinante del interferón alfa humano con al menos un sitio de glicosilación en una posición de su secuencia aminoacídica que forma parte de una estructura secundaria tipo alfa hélice, un gen que codifica para dicha muteína, un método de producción de dicho gen, un método para obtener una célula eucariota productora de dicha muteína, un método para producir dicha muteína, un procedimiento para purificar dicha muteína, una composición farmacéutica de dicha muteína, el uso de dicha muteína para elaborar un medicamento

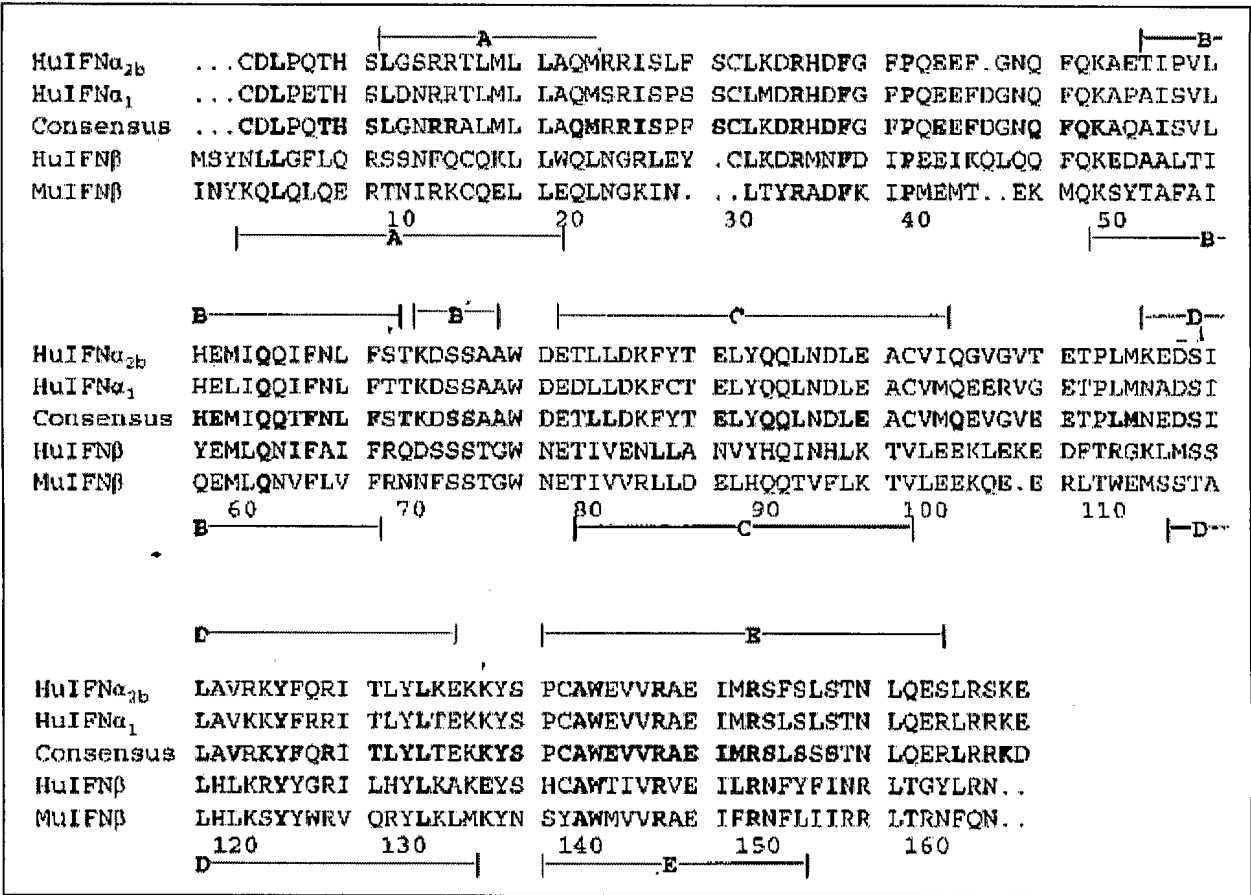


FIGURA 1A

50

Cys

1	TGTGATCTGC	CTCAAACCCA	CAGCCTGGGT	AGCAGGAGGA	CCTTGATGCT
	ACACTAGACG	GAGTTTGGGT	GTCGGACCCA	TCGTCCTCCT	GGAACCTACGA
51	CCTGGCACAG	ATGAGGAGAA	TCTCTCTTTT	CTCCTGCTTG	AAGGACAGAC
	GGACCGTGTC	TACTCCTCTT	AGAGAGAAAA	GAGGACGAAC	TTCTGTCTG
101	ATGACTTTGG	ATTTCCCCAG	GAGGAGTTTG	GCAACCAGTT	CCAAAAGGCT
	TACTGAAACC	TAAAGGGGTC	CTCCTCAAAC	CGTTGGTCAA	GGTTTTCCGA
151	GAAACCATCC	CTGTCCTCCA	TGAGATGATC	CAGCAGATCT	TCAATCTCTT
	CTTTGGTAGG	GACAGGAGGT	ACTCTACTAG	GTCGTCTAGA	AGTTAGAGAA
201	CAGCACAAAG	GACTCATCTG	CTGCTTGGGA	TGAGACCCTC	CTAGACAAAT
	GTCGTGTTTC	CTGAGTAGAC	GACGAACCCT	ACTCTGGGAG	GATCTGTTTA
251	TCTACACTGA	ACTCTACCAG	CAGCTGAATG	ACCTGGAAGC	CTGTGTGATA
	AGATGTGACT	TGAGATGGTC	GTCGACTTAC	TGGACCTTCG	GACACACTAT
301	CAGGGGGTGG	GGGTGACAGA	GACTCCCCTG	ATGAAGGAGG	ACTCCATTCT
	GTCCCCCACC	CCCACTGTCT	CTGAGGGGAC	TACTTCCTCC	TGAGGTAAGA
351	GGCTGTGAGG	AAATACTTCC	AAAGAATCAC	TCTCTATCTG	AAAGAGAAGA
	CCGACACTCC	TTTATGAAGG	TTTCTTAGTG	AGAGATAGAC	TTTCTCTTCT
401	AATACAGCCC	TTGTGCCTGG	GAGGTTGTCA	GAGCAGAAAT	CATGAGATCT
	TTATGTCGGG	AACACGGACC	CTCCAACAGT	CTCGTCTTTA	GTA CT CTAGA
451	TTTTCTTTGT	CAACAAACTT	GCAAGAAAGT	TTAAGAAGTA	AGGAATGA
	AAAAGAAACA	GTTGTTTGAA	CGTTCTTTCA	AATTCTTCAT	TCCTTACT

Glu STOP

FIGURA 1B

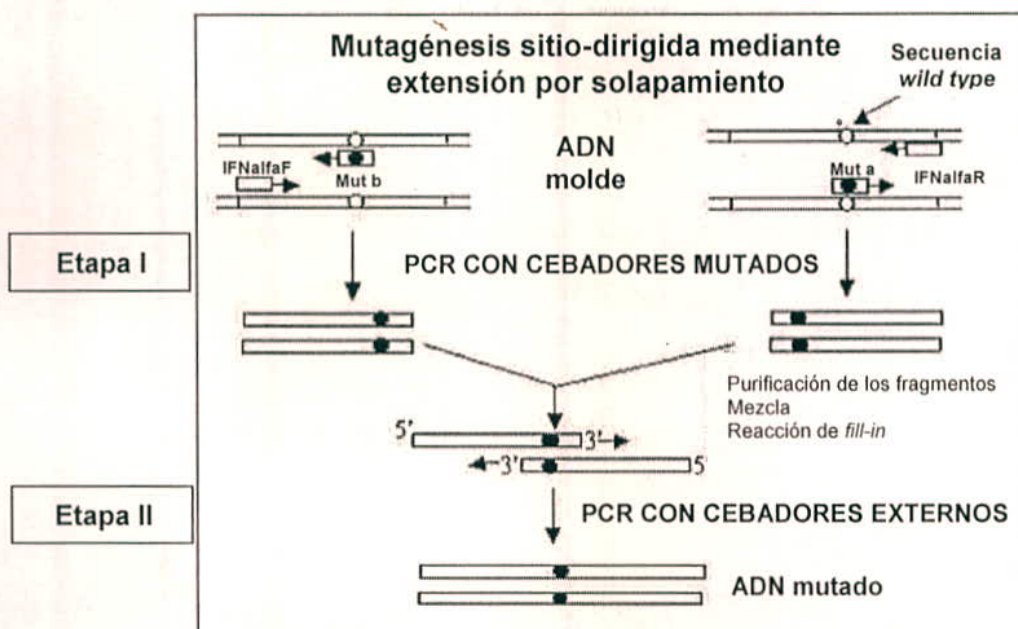


Figura 2

03

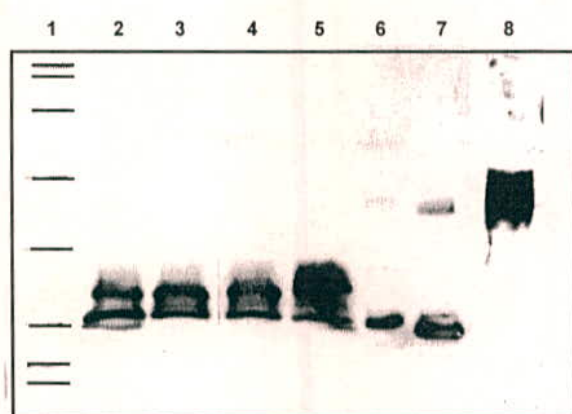


Figura 3

84

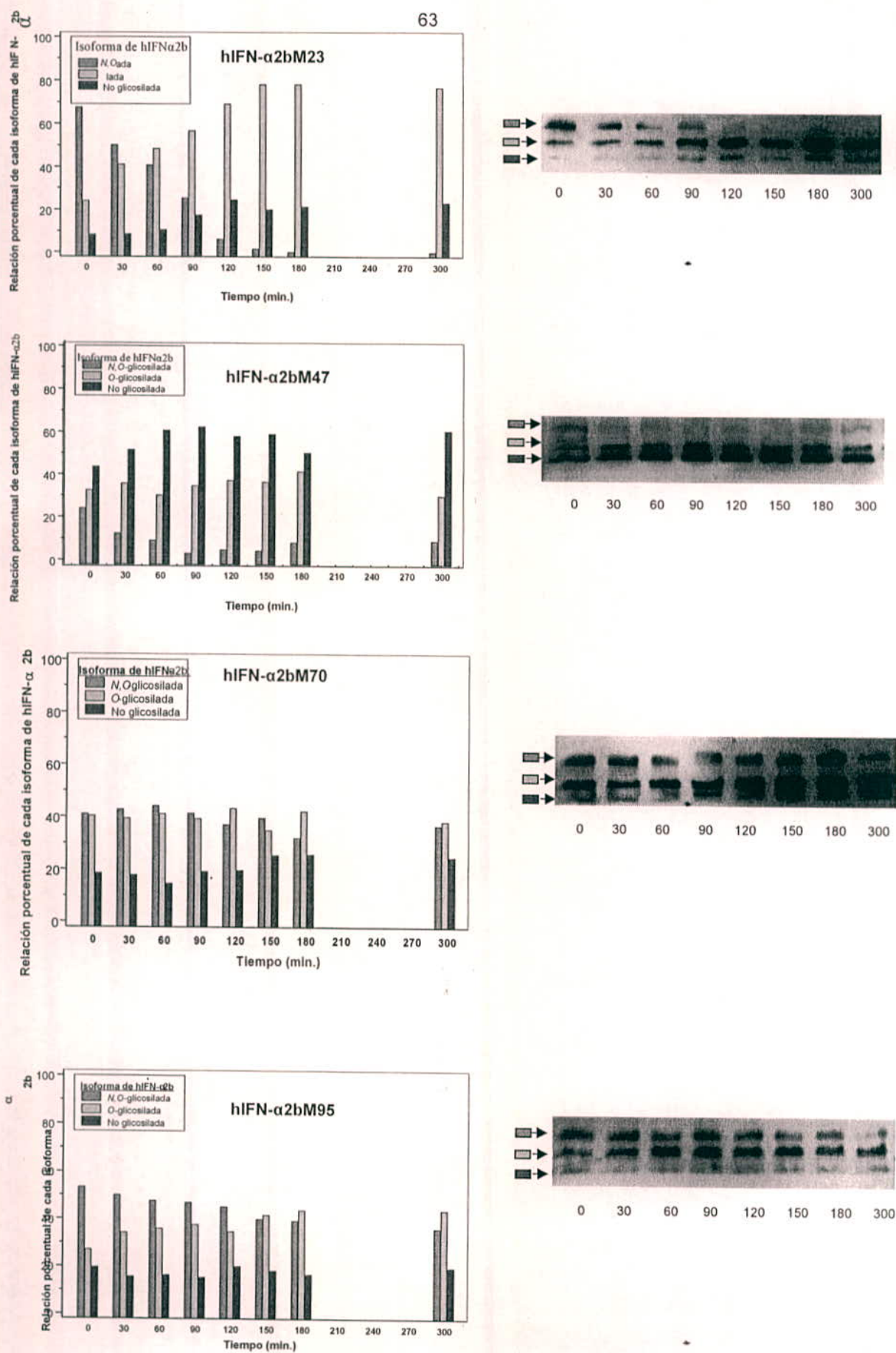


Figura 4

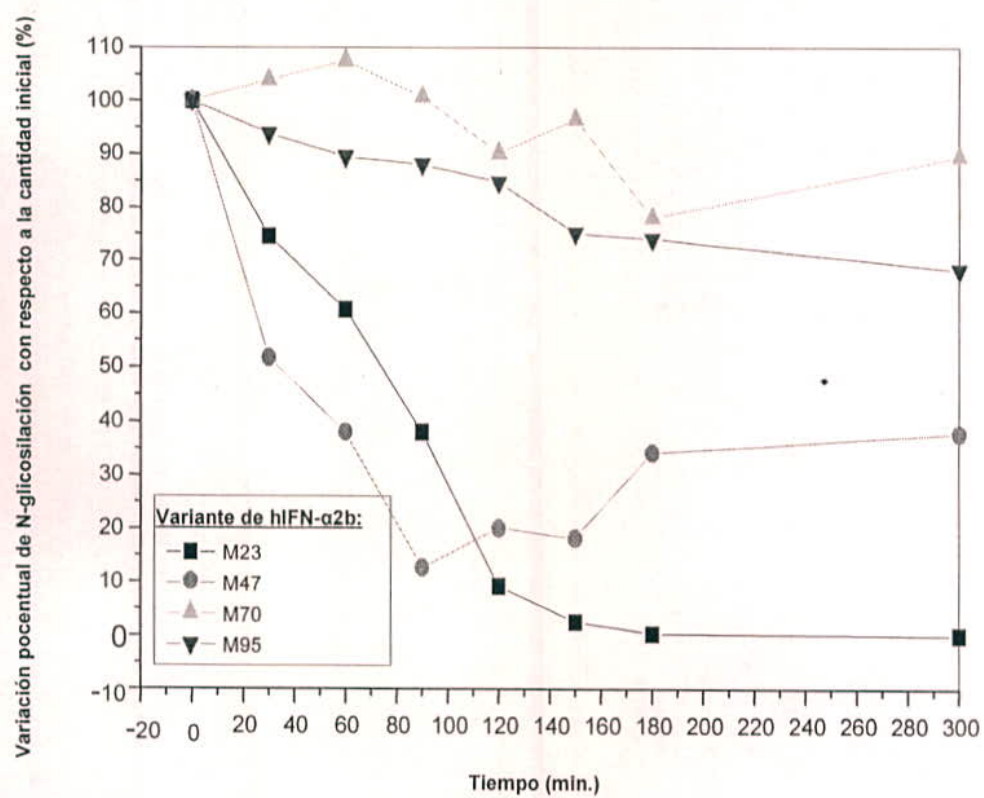


Figura 5

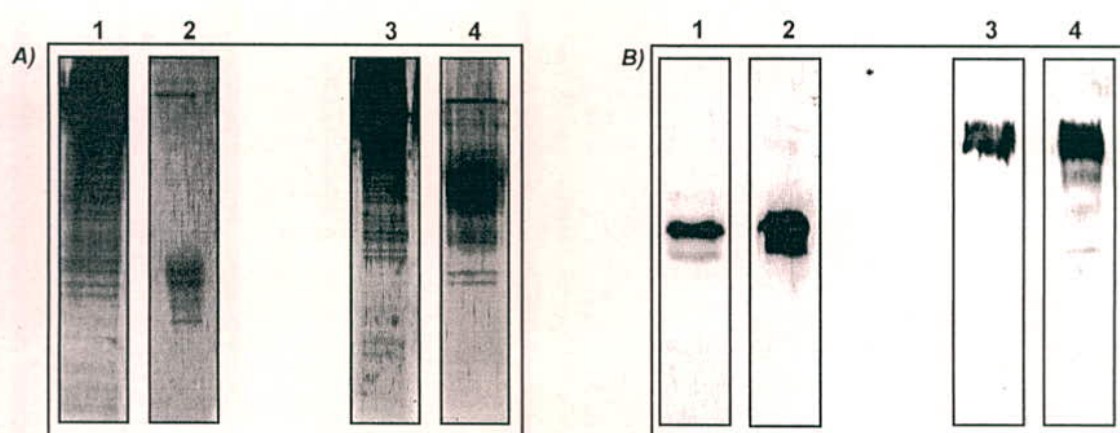


Figura 6 (A y B)

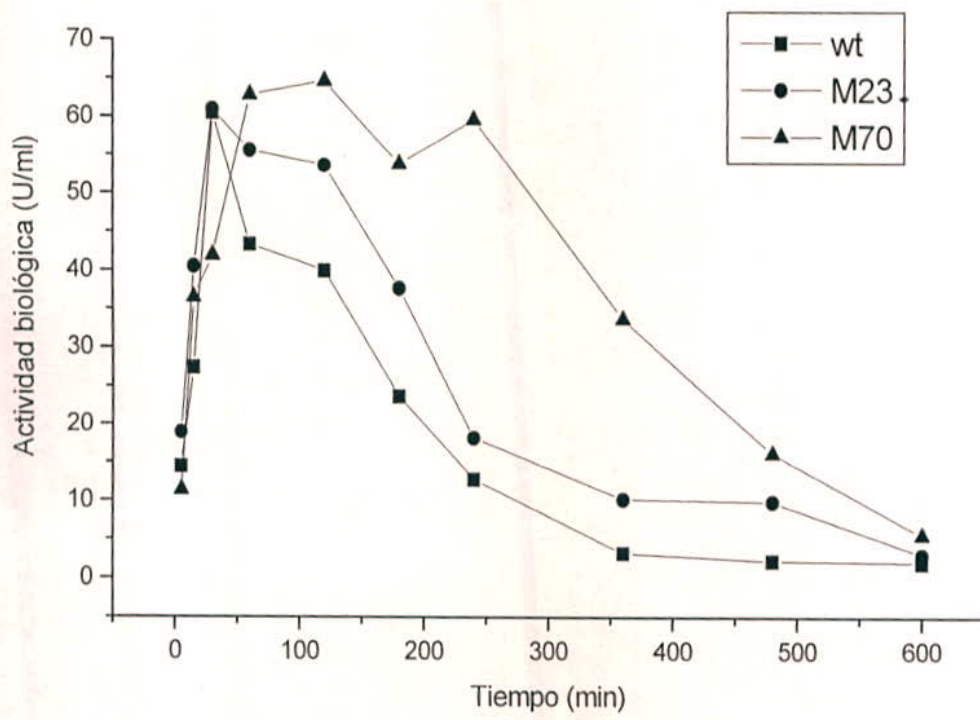


Figura 7

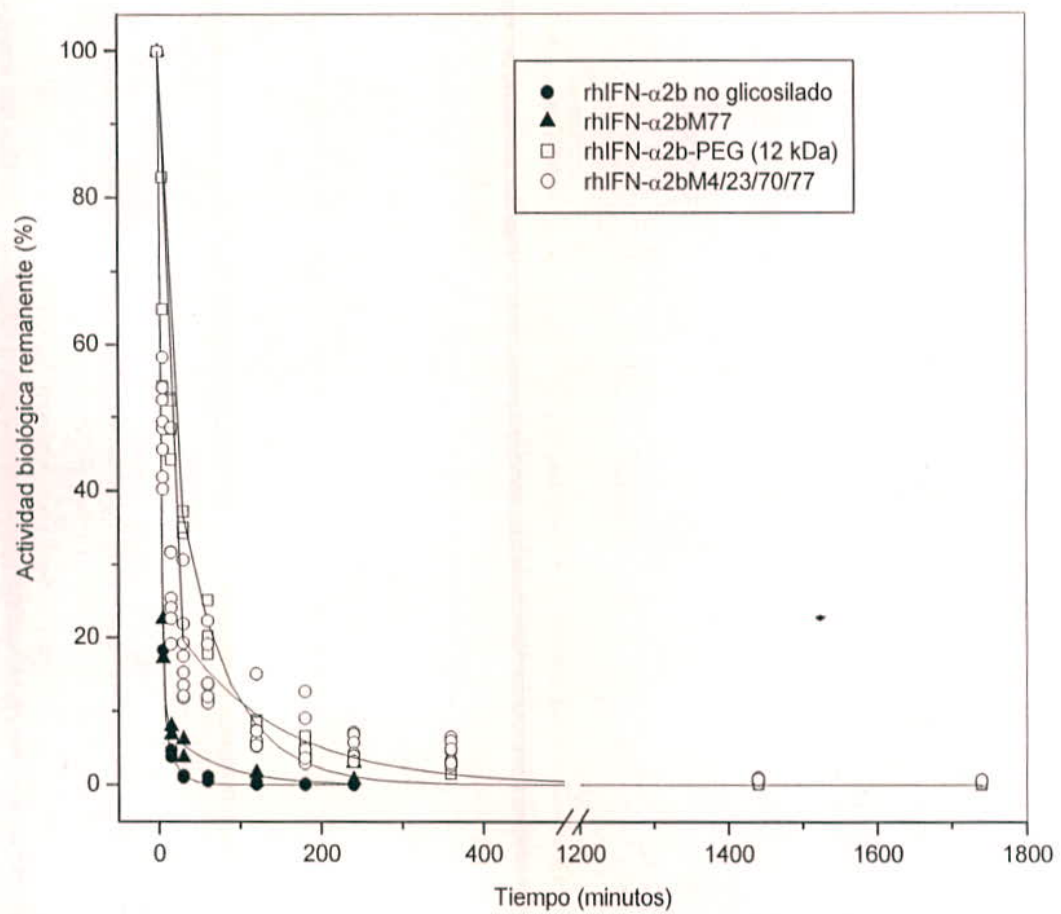
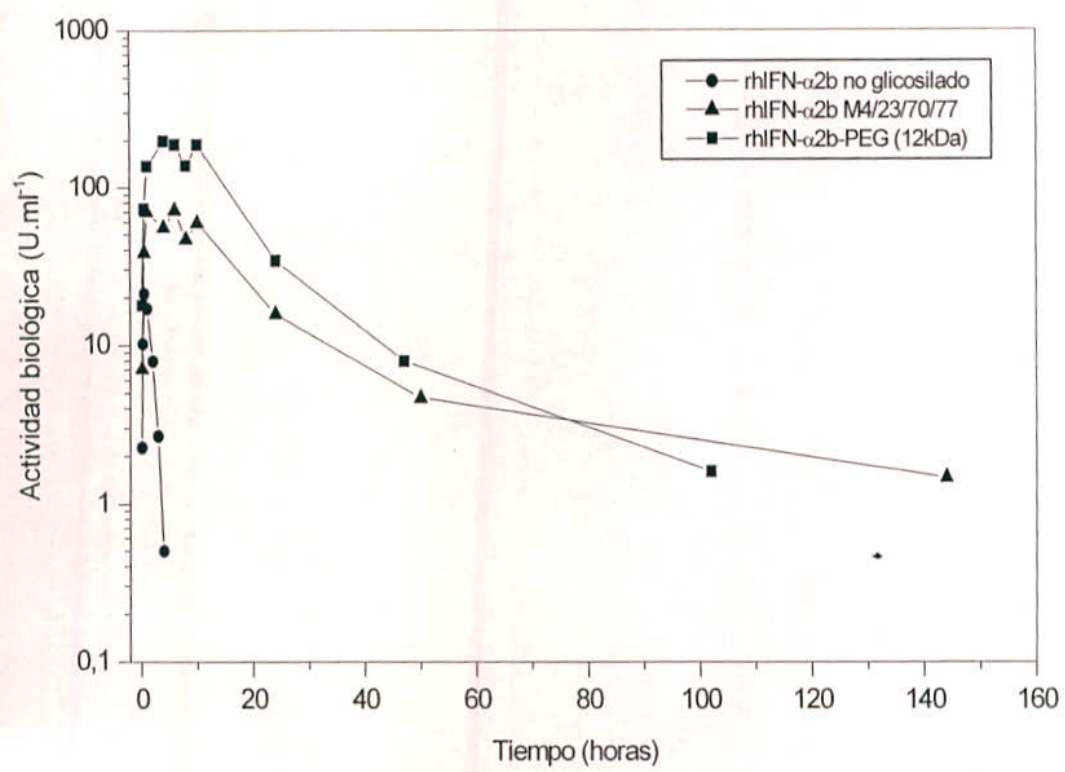


Figura 8



Fi
gu
ra
9

Zinc mediated dimer of human interferon- α_{2b} revealed by X-ray crystallography

Ramaswamy Radhakrishnan¹, Leigh J Walter¹, Alan Hruza², Paul Reichert², Paul P Trotta³, Tattanahalli L Nagabhushan² and Mark R Walter^{1,4*}

Background: The human α -interferon (hulFN- α) family displays broad spectrum antiviral, antiproliferative and immunomodulatory activities on a variety of cell types. The diverse biological activities of the IFN- α 's are conveyed to cells through specific interactions with cell-surface receptors. Despite considerable effort, no crystal structure of a member of this family has yet been reported, because the quality of the protein crystals have been unsuitable for crystallographic studies. Until now, structural models of the IFN- α 's have been based on the structure of murine IFN- β (mulFN- β). These models are likely to be inaccurate, as the amino acid sequence of mulFN- β differs significantly from the IFN- α 's at proposed receptor-binding sites. Structural information on a hulFN- α subtype would provide an improved basis for modeling the structures of the entire IFN- α family.

Results: The crystal structure of recombinant human interferon- α_{2b} (hulFN- α_{2b}) has been determined at 2.9 Å resolution. HulFN- α_{2b} exists in the crystal as a noncovalent dimer, which associates in a novel manner. Unlike other structurally characterized cytokines, extensive interactions in the dimer interface are mediated by a zinc ion (Zn^{2+}). The overall fold of hulFN- α_{2b} is most similar to the structure of mulFN- β . Unique to hulFN- α_{2b} is a 3_{10} helix in the AB loop which is held to the core of the molecule by a disulfide bond.

Conclusions: The structure of hulFN- α_{2b} provides an accurate model for analysis of the >15 related type I interferon molecules. HulFN- α_{2b} displays considerable structural similarity with mulFN- β , interleukin-10 and interferon- γ , which also bind related class 2 cytokine receptors. From these structural comparisons and numerous studies on the effects of mutations on biological activity, we have identified protein surfaces that appear to be important in receptor activation. This study also reveals the potential biological importance of the hulFN- α_{2b} dimer.

Introduction

The human α -interferons (hulFN- α 's) are encoded by a family of at least 15 intronless genes which are differentially expressed by cells in response to a variety of infectious agents [1,2]. Although originally discovered for their broad spectrum antiviral properties, IFN- α 's also have antiproliferative and immunomodulatory effects on a variety of cell types [3]. The practical importance of these pleiotropic activities is shown by the approval of recombinant hulFN- α_{2b} (Intron A) for the treatment of >14 diseases world-wide, including hairy-cell leukemia, condyloma acuminatum, Kaposi's sarcoma, and hepatitis [4,5].

The diverse biological activities of IFN- α 's are conveyed to cells through specific interactions with cell-surface receptors. Although the components of the IFN- α signaling complex are still being defined, two distinct receptor proteins have been cloned and characterized (IFN- α R1

[6] and IFN- α/β R [7]). Because the IFN- α/β R can bind several IFN- α subtypes as well as IFN- β , it appears to be the major ligand-binding component of the receptor complex. In contrast, the IFN- α R1, which is required for IFN- α /IFN- β signaling, can only bind to IFN- α_2 [8]. The IFN- α R1 seems to have a complementary role in ligand binding, as it increases the affinity of the receptor for the ligand by ~10-fold [9]. The observed properties of the two receptors seem to be consistent with the idea that the receptors bind to IFN- α sequentially; first IFN- α/β R and then IFN- α R1. Such stepwise binding is observed in better characterized cytokine signaling systems [10]. Sequence comparisons reveal that IFN- α R1 and IFN- α/β R are both members of the class 2 cytokine receptor family which includes the receptors for interferon- γ (IFN- γ), interleukin-10 (IL-10), and tissue factor [11]. The extracellular portions of the receptors should therefore resemble the crystal structure of the IFN- γ receptor [12], which contains

Addresses: ¹Center for Macromolecular Crystallography, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA, ²Schering Plough Research Institute, Kenilworth, NJ 07033, USA, ³Applied Clinical Communications Inc., Parsippany, NJ 07054, USA and ⁴Department of Pharmacology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA.

*Corresponding author.
E-mail: Walter@mimas.cmc.uab.edu

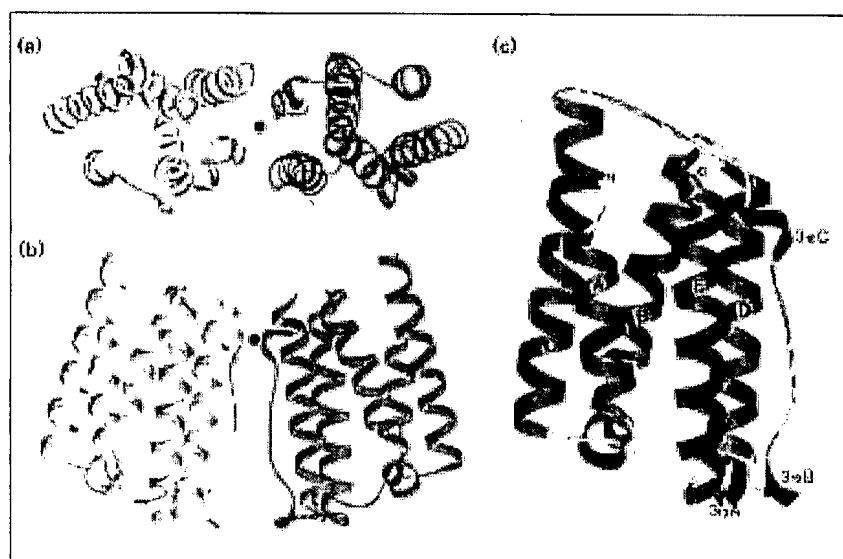
Key words: cytokine, interferon- α , protein structure, X-ray diffraction

Received: 22 August 1996
Revisions requested: 17 September 1996
Revisions received: 30 September 1996
Accepted: 1st October 1996

Structure 15 December 1996, 4:1453–1463

© Current Biology Ltd ISSN 0969-2126

Figure 1



Molecular structure of hIFN- α_{2b} . (a) The hIFN- α_{2b} dimer viewed approximately parallel to the twofold axis. (b) View of the hIFN- α_{2b} dimer perpendicular to the twofold symmetry axis. The monomers of hIFN- α_{2b} are colored yellow and green. The zinc ion is represented as a magenta sphere. (c) Structure of hIFN- α_{2b} monomer color-coded by secondary structure: α helices are colored blue, 3_{10} helices magenta and loops yellow. Although not observed in electron density maps, the connection between helices C and D is modeled for completeness.

two fibronectin type III domains with an angle between them of $\sim 120^\circ$. The longer extracellular sequence of the IFN- $\alpha R1$ (~ 400 amino acids versus ~ 200 amino acids for the IFN- $\gamma R\alpha$, and IFN- $\alpha/\beta R$) is likely to contain two putative class 2 ligand binding domains linked in tandem. The intracellular domains of the IFN- $\alpha/\beta R$ and IFN- $\alpha R1$ are associated with the Jak-1 and Tyk-2 kinases, respectively [7,13].

Characterization of the individual IFN- α gene products revealed mature proteins of 165 (IFN- α_2) or 166 (all other IFN- α 's) amino acids in length. All α -interferon species have two conserved disulfide bonds; Cys1–Cys98 and Cys29–Cys138 [14]. Despite sharing $\sim 80\%$ sequence identity (IFN- α_1 and IFN- α_2 differ at only 28 amino acid positions), each IFN- α subspecies elicits different levels of antiviral and antiproliferative responses on various cells [15]. From their biophysical properties, the α -interferons form part of the type I interferon family, which also includes IFN- β and IFN- ω [16,17]. Although the IFN- α 's are encoded by a multigene family, only one gene for IFN- β has been identified. The amino acid sequences of IFN- α and IFN- β are $\sim 50\%$ homologous [18]. Based on the crystal structure of muIFN- β [19], the type I interferons were classified as members of the longchain cytokine family [20]. IFN- γ , the only type II interferon, and muIFN- β share virtually no sequence homology, but have related three-dimensional structures [21].

Efforts to elucidate the three-dimensional structure of the IFN- α 's by X-ray diffraction have been hampered by the lack of high-quality crystals, although small crystals were first reported 14 years ago [22]. The crystal structure of muIFN- β has therefore been used for homology modeling of the IFN- α 's [23]. Although useful, these models are

inevitably inaccurate due to significant amino acid differences between the IFN- α 's and muIFN- β in biologically important loops. Furthermore, the original coordinates of muIFN- β contained several errors which have only recently been corrected by high resolution refinement [19]. Here we report the $2.9\text{\AA}$ structure of recombinant human zinc IFN- α_{2b} , which unexpectedly exists in the crystal as a dimer. Structural comparisons of hIFN- α_{2b} with muIFN- β and other α -helical cytokines identify conformational features in hIFN- α_{2b} that are probably critical for receptor binding. By combining structural analysis with the results of mutagenesis studies performed on the IFN- α 's, it is possible to propose putative interaction sites for the known receptor components of the IFN- α signaling complex.

Results and discussion

Dimeric structure and non-crystallographic symmetry

The crystallographic asymmetric unit contains six copies of the hIFN- α_{2b} monomer, which form three equivalent non-covalent dimers with dimensions of $40\text{\AA} \times 60\text{\AA} \times 20\text{\AA}$ (Fig. 1a,b, Table 1). The monomers in each dimer (dimer A [molecules 1 and 2], B [molecules 3 and 4], and C

Table 1

The hIFN- α_{2b} model.

Dimer	Molecule	Residues modelled			
A	1	6–102		112–159	
	2	8–44	50–102	112–158	
B	3	11–44	50–91	112–156	
	4	8–44	50–96	112–158	
C	5	8–44	50–97	112–158	
	6	10–43	52–92	112–156	

13 to 24 amino acids and pack against one another with crossing angles of 18° to 31°. Each helix is approximately straight except for helix B which contains a pronounced bend of 70° centered on Thr69. The extension of helix B after the bend (residues 70–75, denoted helix B' in Fig. 1c) packs against the end of the helix bundle. The disruption in the α -helical hydrogen-bonding pattern is compensated for by a network of substitute hydrogen bonds between the mainchain nitrogens and carbonyl oxygens in the bend and the sidechain oxygens of Ser68, Thr69, Ser72 and Tyr85. In addition to Ser72, which participates in the above interaction, several other polar residues are buried in the hydrophobic core of the molecule. The buried groups, which include Ser11, Thr14, Gln91, Tyr122, Ser150, Ser154, Thr155 and Gln158, form several hydrogen bonds that link helices A, C, D, and E in the core. Of all the buried polar groups, Gln91, Tyr122, Ser150, and Ser154 are conserved in all human IFN- α amino acid sequences, but only Tyr122 and Ser154 are conserved in all vertebrate IFN- α sequences.

The long connection between helices A and B (AB loop) is structurally diverse and best described in three segments (AB1: residues 22–33, AB2: residues 34–39 and AB3: residues 40–51). As observed in other longchain cytokines, the AB1 loop encircles the N-terminal end of helix E. Residues 26–29 and 30–33 within the AB1 loop form two turns of 3_{10} helix ($3_{10}A$, $3_{10}B$). Cys29 links the $3_{10}A$ helix to helix E through a disulfide bond with Cys138. Residues on the $3_{10}A$ and $3_{10}B$ helices include Leu26, Phe27 and Leu30, displaying solvent-accessible surface areas of 23%, 70%, and 52%, respectively. The $3_{10}B$ helix precedes the AB2 loop and redirects the mainchain by 90° to run parallel to the helix bundle. The conformation of the $3_{10}B$ helix allows three additional interactions with sidechain residues from helix D. Specifically, the mainchain carbonyl oxygen of Asp32 hydrogen bonds with the OH of Tyr129 while its sidechain O δ 1 and O δ 2 atoms are sandwiched between the N ζ groups of Lys31 and Lys133. With the exception of Gly37, which adopts a left handed conformation, the AB2 loop forms an extended structure with Phe36 and Phe38, inserting into the hydrophobic core of the molecule. Immediately preceding the AB2 loop, residues 40–43 of the AB3 loop form a third 3_{10} helix ($3_{10}C$). Following the $3_{10}C$ helix, residues 44–51 link the AB loop into helix B. In contrast to the long AB loop, the BC and DE loops are short, consisting of two and four residues, respectively. A notable feature of the DE loop is the left handed α -helical conformation of Lys134 and Tyr135.

Five highly flexible regions of huIFN- α_{2b} have been identified based on missing electron density or high B factors. For three regions, namely the five N-terminal residues, the six C-terminal amino acids, and residues 103–111 (the CD loop), no electron density was observed in any of the six crystallographically independent copies

Table 2

HuIFN- α_{2b} superposition.*

Molecule	1	2	3	4	5	6
1	–	0.39	0.78	0.42	0.44	0.70
2	0.21	–	0.73	0.39	0.35	0.67
3	0.50	0.48	–	0.76	0.77	0.79
4	0.16	0.22	0.52	–	0.40	0.72
5	0.26	0.20	0.48	0.28	–	0.73
6	0.31	0.33	0.39	0.33	0.31	–

*Rms differences (Å) based on residues 11–43, 52–91 and 112–156. Comparisons are made for C α atoms (lower left corner) and all atoms (upper right corner).

of the molecule. For one additional segment in the AB3 loop (residues 45–50), weak density (0.6 σ) was observed in molecule 1 only. In this segment Ala50 is an outlier in the Ramachandran plot indicating that errors may still be present in this portion of the loop. All four of these flexible regions described above are solvent-exposed and located on one end of the helix bundle. The fifth flexible region consists of residues 26–31 and is located in the AB1 loop. In contrast to the other flexible segments, strong electron density is observed for the AB1 loop in molecules 2–5, but not in molecules 1 and 6. The absence of electron density for the AB1 loops of molecules 1 and 6 correlates with the lack of crystal contacts for these segments. In contrast, crystal contacts presumably stabilize the AB1 loops in molecules 2–5. This suggests that although the AB1 loop is held to the N terminus of helix E by a disulfide bond, it is flexible in solution. Although it is generally thought that disulfide bonds convey rigidity to protein structures, both of the disulfide bonds in huIFN- α_{2b} (Cys1–Cys98 and Cys29–Cys138) are in regions of high mobility. For residues that could be placed into electron density, there are no significant structural differences between the six copies of huIFN- α_{2b} (Table 2).

The dimer interface

All contacts across the dimer interface are made from residues on the AB loop and helix D. Residues on these segments presented to the interface are predominantly charged and run the entire length of the molecule. This observation is consistent with the pH-dependent polymerization of IFN- α_2 [25]. Approximately 1000 Å² of surface area is buried in the interface. The most extensive interactions are mediated by a zinc ion which is positioned on the non-crystallographic symmetry (ncs) dyad axis. The zinc-binding site is formed from adjacent glutamic acid residues (Glu41 and Glu42) located on the $3_{10}C$ helix. A distorted tetrahedral zinc-coordination sphere is completed by identical glutamates from the twofold related molecule (Fig. 3). The unidentate interactions of the Glu41 and Glu42 carboxylate oxygens with Zn²⁺ occur in the *anti* and *syn* conformations, respectively [26,27]. The average oxygen-Zn²⁺ distances for the three

924

metal sites are 1.9 Å (molecules 1,3,5:Glu41(Oε2)-Zn²⁺), 2.3 Å (molecules 1,3,5:Glu42(Oε2)-Zn²⁺), 1.9 Å, (molecules 2,4,6:Glu41 (Oε2)-Zn²⁺), and 2.2 Å (molecules 2,4,6:Glu42(Oε1)-Zn²⁺) with maximal deviations from the mean of 0.1 Å, 0.2 Å, 0.1 Å, and 0.2 Å, respectively. On either side of the zinc-binding site, two hydrogen bonds are formed between the Oε1 atom of Gln40 and the NH of Lys121 and the Oδ1 atom of Asp114 with the amide nitrogen of Gly44. From this band of interactions centered on the 3₁₀C helix, the molecules separate at an angle of ~20°. On the opposite end of the interface, one potential salt bridge is formed between Arg33 and Glu132. Because the packing surfaces formed from the twofold related AB loop and helix D have non-complementary shapes, the interface contains two buried cavities. The cavities appear to contain water molecules that could mediate additional hydrogen bonds across the interface. However, because only low resolution data are available, water molecules were not included in the refined model.

Comparison of IFN- α and IFN- β subspecies

Receptor-binding studies have shown that the human IFN- α 's and IFN- β compete for the same receptors on cells [7]. To understand the basis for this competition we compared the structures of huIFN- α_{2b} and muIFN- β [19] (Fig. 4a). As previously predicted based on sequence homology, their overall folds are similar; 116 C α atoms can be superimposed with a root mean square (rms) deviation of 1.5 Å. C α atom positions that differ by more than 2.0 Å occur for residues 6–9 at the N terminus, 22–33 and 40–51 in the AB loop, 69–76 corresponding to the bend in helix B, and 154–159 at the C terminus. Based on this comparison, all type I interferons should display a conserved core of five helices (excluding the C terminus of helix E) and

the AB2 loop, with structurally distinct regions located on either end of the helical bundle.

The largest structural difference between IFN- β and the IFN- α 's is found in the AB1 loop; it contains three more residues in huIFN- α_{2b} than muIFN- β . The shorter AB1 loop of muIFN- β adopts an extended conformation which crosses helix E ~5 Å further down the helix (towards the C terminus) than does the AB1 loop of huIFN- α_{2b} . The different crossing position of the AB1 loop on helix E in huIFN- α_{2b} exposes two highly conserved residues on helix E (Arg144 and Glu146) to the solvent which could potentially interact with receptor molecules. The AB1 loop of muIFN- β lacks the two 3₁₀ helices that are linked through a disulfide bond (Cys29–Cys138) to helix E in huIFN- α_{2b} . Based on sequence analysis, the structural features noted above should be conserved in other IFN- α molecules. Compared to the IFN- α 's, the sequence of huIFN- β contains a one-residue deletion (Ser28 in huIFN- α_{2b}) in the AB1 loop. This deletion, along with significant amino-acid differences for residues 23–26, may alter the conformation of a potential 3₁₀A helix in huIFN- β . In huIFN- β , the presence of an equivalent disulfide bond (Cys29–Cys138) and the conservation of all residues which maintain the conformation of the 3₁₀B helix in huIFN- α_{2b} , suggest that the 3₁₀B helix found in huIFN- α_{2b} is conserved in huIFN- β .

Residues within the AB3 loop of huIFN- α_{2b} and MuIFN- β each adopt a turn of 3₁₀ helix (3₁₀C in huIFN- α_{2b} ; residues 40–43, muIFN- β ; residues 41–44) although they pack with different orientations against the helix bundle. This difference can be attributed to a 4.5 Å-shift in the position of the C α atom of Gln40 (Glu40 in MuIFN- β), which causes a rotation of the helix with respect to the molecular core. As a result, Gln40, Glu-41, and Glu42 are

Figure 3

HuIFN- α_{2b} zinc-binding site and dimer interface. Stereo view of residues 34–43 from the AB loops of molecules 1 (green) and 2 (gold) in the dimer interface. The zinc ion is represented as a silver sphere. Electron density for the protein model (blue) is calculated with $2F_o - F_c$ coefficients and contoured at 1σ . Difference density (6σ) for the zinc ion before its addition to the model is shown in magenta.

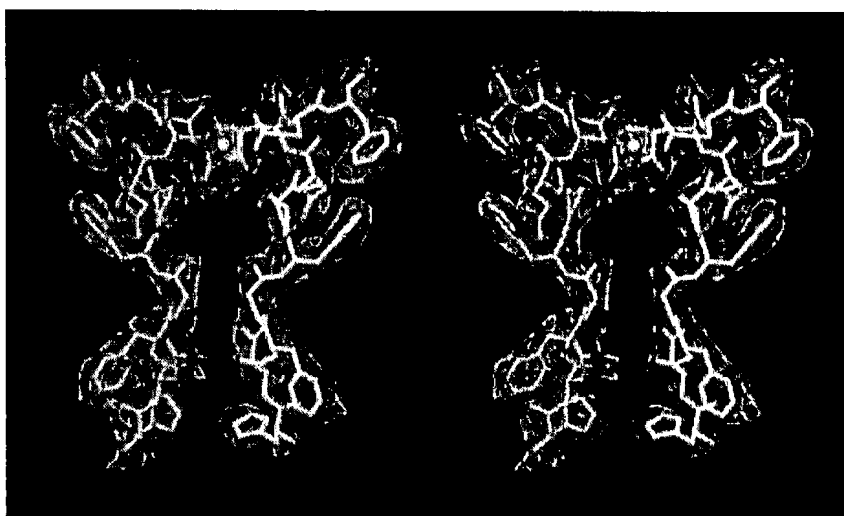
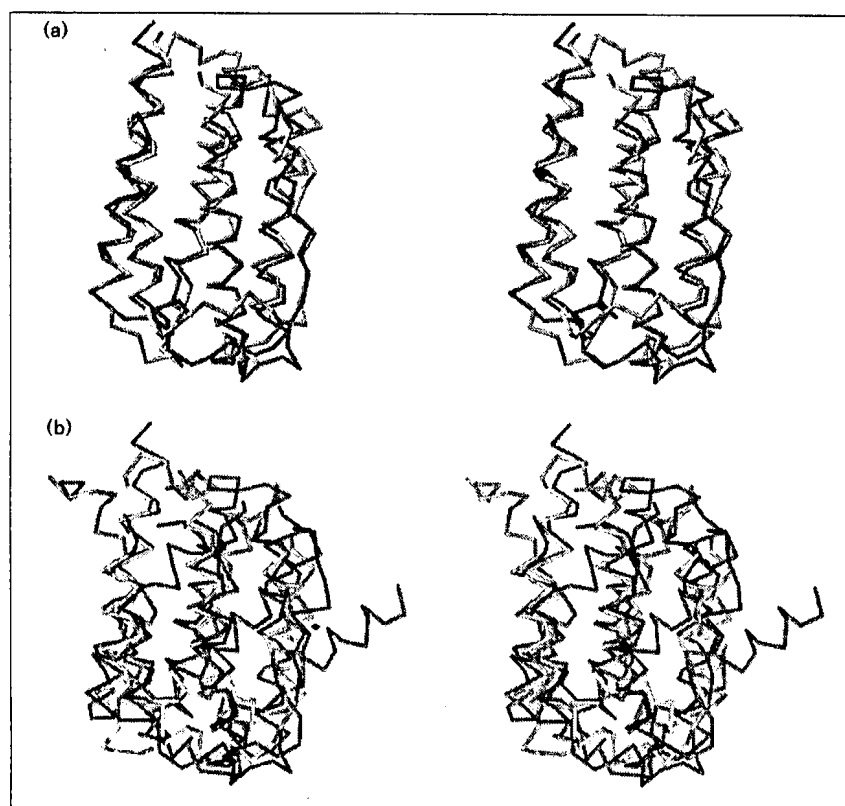


Figure 4



Comparisons of the structure of huIFN- α_{2b} with other cytokines. (a) Stereo view α -carbon atom superposition of huIFN- α_{2b} (magenta) and muIFN- β (gold). The Cys29-Cys138 disulfide bond is shown in cyan. (b) Stereo view α -carbon atom superposition of huIFN- α_{2b} (magenta), IL-10 (gold), and IFN- γ (blue). Only one domain of the IL-10 and IFN- γ dimers is shown.

solvent-accessible, whereas Phe43 is buried in huIFN- α_{2b} . In muIFN- β , Met43, Glu44, and Thr46 are solvent-accessible and Met45 is buried in the core. Analysis of the amino acid sequences of the type I interferons in light of this different pattern of exposed and buried residues (e.g. the fourth residue is buried in the helix in huIFN- α_{2b} while the third residue is buried in muIFN- β) suggests that all IFN- α species adopt a 3_{10} C helix oriented as in huIFN- α_{2b} , while huIFN- β is likely to adopt an orientation similar to muIFN- β . This analysis also suggests that the structure of the 3_{10} C helix of huIFN- α_{2b} is not altered by the extensive interactions in the dimer. The zinc-binding residue, Glu42, in huIFN- α_{2b} is replaced by a hydrophobic residue in the IFN- β sequences. This substitution would probably disrupt the zinc-binding site observed in huIFN- α_{2b} , but it may be restored by the additional substitution of Ala118 on helix D with His118 in both murine and human IFN- β . In the crystal structure of muIFN- β the putative zinc-binding site is occupied by a water molecule [19].

Helix B in huIFN- α_{2b} is distinguished from muIFN- β by the presence of a 70° bend centered on Thr69. After the bend, helix B contains an additional six residues (helix B') compared to the extended structure of the BC loop in

muIFN- β . The additional residues used to form helix B' shorten the extension of the BC loop towards the end of the helix bundle by $\sim 6\text{\AA}$ relative to the loop in muIFN- β . The polar sidechain residues that make interactions in the bend of helix B for huIFN- α_{2b} are not conserved in the human or murine IFN- β sequences (Ser68 is replaced with arginine, Thr69 is replaced by glutamine or asparagine, and Tyr85 is replaced by leucine). This suggests that the structure of huIFN- β is similar to muIFN- β in this region.

A final region of structural divergence between huIFN- α_{2b} and muIFN- β is found in the C terminus of helix E. Following Ser150, which forms a hydrogen bond with Tyr122, differences in C α atom positions are about $1.6\text{\AA}$ for residues 151–153 and increase to $2.5\text{--}3.5\text{\AA}$ for residues 154–159. The difference in C α positions is best described as a 45° clockwise rotation (looking down the helix axis from the C terminus) of residues 154–159 in huIFN- α_{2b} relative to muIFN- β . The different orientations of the E helices of huIFN- α_{2b} and muIFN- β appear to be dependent on the interaction made between the residue at position 150 in huIFN- α_{2b} (Ser150) and the tyrosine residues located on helix D. As Ser150 and Tyr122 are conserved in all huIFN- α sequences, the orientation of helix E in huIFN- α_{2b} is likely to be present in all huIFN- α

molecules. Similarly, the conservation of Asn148 (equivalent to Ser150 in huIFN- α_2) and Tyr120 and Tyr121 (muIFN- β numbering) in murine and human IFN- β , suggests that the structure of helix E in huIFN- β is similar to muIFN- β . It is interesting that Arg144, Glu146 and Arg149, which are conserved in all known type I interferons, are located on helix E prior to the structural divergence of helix E.

Structural comparison with other helical cytokines

We made additional structural comparisons between huIFN- α_{2b} and other α -helical cytokine structures (Fig. 4b). Consistent with their common classification as class 2 cytokines, the best overall structural similarity (excluding muIFN- β) of huIFN- α_{2b} is with IL-10 (102 equivalent C α atoms, rms deviation of 2.2 Å). A more limited similarity is observed within the class 1 long chain cytokines, where the number of equivalent atoms ranged from 86 (rms deviation of 2.0 Å) for growth hormone (GH) to 75 atoms (rms deviation of 1.9 Å) for leukemia inhibitory factor (LIF). These comparisons reveal a relatively well conserved four-helix bundle for all of the longchain cytokines, whereas the mainchain positions of the long overhand loops of the class 1 cytokines differ considerably from the class 2 molecules. One exception occurs for GH, where a general structural correspondence is found for residues equivalent to the AB1 loop in huIFN- α_{2b} , although, the mainchain deviates considerably from that of huIFN- α_{2b} in the AB2 and AB3 portions of the loop. In contrast to the high structural similarity between huIFN- α_{2b} and IL-10, the overall structure alignment of huIFN- α_{2b} and IFN- γ is very poor. However, helix A, the AB loop and helix F from IFN- γ can be overlaid onto helix A, the AB loop, and helix E of huIFN- α_{2b} with an rms deviation of 2.3 Å for 59 residues. For all three human class 2 cytokine structures (huIFN- α_{2b} , IFN- γ , and IL-10), the AB loop which encircles the C-terminal helix is flexible [21,28,29]. The recent crystal structure of IFN- γ complexed with its high affinity receptor showed that this flexible loop adopts a 3_{10} helical conformation upon a direct interaction with its receptor [12]. The location of this 3_{10} helix in IFN- γ corresponds to that of the 3_{10} B helix in huIFN- α_{2b} . Also conserved in the huIFN- α_{2b} /IFN- γ structure alignment is the position of a glutamic acid (Glu146 in huIFN- α_{2b} , Glu112 in IFN- γ), which in IFN- γ is known to directly interact with the IFN- γ receptor. Although considerable structural similarity is observed in the AB loop regions of huIFN- α_{2b} , IFN- γ and IL-10, there are significant structural differences in the regions corresponding to the BC and DE loops of huIFN- α_{2b} .

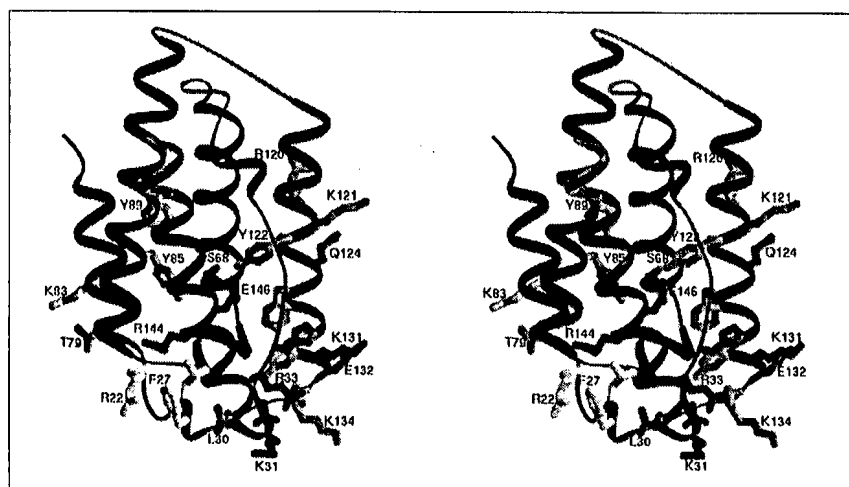
Residues affecting biological activity

There are several amino acid residues in IFN- α for which mutations are known that change the biological activity of the protein by more than fivefold. These include Leu30, Lys31, Arg33, His34, Phe36, Arg120, Lys121, Gln124, Tyr122, Tyr129, Lys131, and Glu132 [30,31]. Of these

residues, Arg33 is especially sensitive to amino acid substitutions; this is reflected in the 500 and 2500 fold drop in activity in the Arg33→Lys and Arg33→Ala mutants, respectively [32]. Additional residues reported to cause large reductions in biological activity are Arg144 [19], and Glu146 [33]. The inclusion of Arg144 as an important residue is based on the loss of activity reported for the Arg144 to Ala144 mutant of huIFN- β . In addition to mutagenesis studies, a 50-fold activity loss was observed for the IFN- α_1 /IFN- α_2 hybrid molecule which differs from huIFN- α_{2b} at three positions: Arg22→Ser, Leu26→Pro, and Phe27→Ser [34]. Additional hybrid studies found that sequence differences between IFN- α_1 and IFN- α_2 at positions Ser68, Thr79, and Tyr85 of huIFN- α_{2b} caused a reduction of IFN- α_2 activity on human cells while simultaneously increasing its activity on murine cells [35]. Similarly, using IFN- α_1 /IFN- α_8 chimeras, Lys83 and Tyr89 were shown to make direct interactions with the IFN- α R1 [36]. In contrast to residues which alter biological activity, changes to Phe47, Gln48, or Gln61, or the deletion of residues 1–4, 102–111, or 156–165 have no effect on the antiviral activity of IFN- α_2 [37–39].

The locations of these important residues on huIFN- α_{2b} are shown in Figure 5. Based on the structure of huIFN- α_{2b} , Phe36, Tyr122 and Tyr129 are buried in the molecular core and are presumably important for the structural integrity of the protein. The rest of the residues implicated in receptor binding and biological activity are located on the AB loop (Arg22, Leu26, Phe27, Leu30, Lys31, Arg33, His34), the bend in helix B (Ser68) and helices C (Thr79, Lys83, Tyr85, and Tyr89), D (Arg120, Lys121, Gln124, Lys131, and Glu132) and E (Arg144, and Glu146). These 'active' regions of IFN- α are all located at one end of the helix bundle. The AB1 loop, (the region that is most sensitive to amino-acid replacement) and helix C (which has been implicated in binding to the IFN- α R1) are located on opposite sides of the molecule and probably form two distinct receptor-binding sites.

The two regions of huIFN- α_{2b} identified by mutagenesis as critical for biological activity are found in positions similar to the receptor-binding sites defined in the crystal structures of the GH and IFN- γ receptor-ligand complexes [12,40]. In GH and IFN- γ , the high affinity receptor-binding site (site 1) consists of residues on helix A, the AB loop and the C-terminal helix (helix E in huIFN- α_{2b}), while in GH a second site (site 2) is formed from different residues on helix A and helix C. Consistent with the structural similarities between IFN- γ and huIFN- α_{2b} , the site 1 binding surface of huIFN- α_{2b} would include the AB loop, helix E (up to Asn156) and possibly residues on helix A (currently no residues on the helix have been identified as important for binding by mutagenesis). The electrostatic potential of this surface is predominantly neutral except for three highly conserved arginine residues (Arg33, Arg144,



Stereo view of IFN- α residues that appear to be important for biological activity. Single residue mutations which alter biological activity are shown in red. Sidechain residues in green represent single mutations that are important in maintaining the structural integrity of the molecule. Simultaneous mutations which affect biological activity are grouped by color. These consist of the residue clusters Arg22, Leu26, Phe27 (yellow); Ser68, Thr79, Tyr85 (orange); Lys83, Tyr89 (cyan); Arg120, Lys121 (gray); and Lys133, Lys134 (magenta). The mainchain for residues 102–112 and 156–160, which do not effect biological activity are shown as a green ribbon. Residues 103–111 were not observed in the structure and are modeled to provide their general position. Residues are numbered according to the hIFN- α_{21} sequence.

and Arg149) and Glu146. These four residues, which are implicated in receptor binding, are conserved amongst all type I interferons, as are the residues that stabilize the conformation of the AB loop (Cys29–Cys138, Phe36, Tyr122, Arg125 and Tyr129). Based on the high sequence conservation of site 1 between the human IFN- α 's and IFN- β , the IFN- α/β R (and/or possibly another, as yet unidentified, receptor) may bind at this site. It seems likely from the hybrid data, that the IFN- α R1 would interact with huIFN- α_{2b} at a site analogous to site 2 of GH as defined in the GH-receptor complex. Unlike site 1, which is well conserved, the huIFN- α_{2b} residues implicated in binding to the IFN- α R1 (residue positions 79, 83, 85, and 89) are the amino acids on helix C that are least conserved among the IFN- α family. Similar sequence variations are observed for the adjacent helices A and B which probably also contribute residues to receptor binding site 2.

Clearly, this two-site model does not explain all of the IFN- α structure-function data. Specifically, the model fails to explain how residues of helix D that are important for biological activity interact with a receptor molecule. It has been suggested that helix D and the AB-loop form one continuous binding surface [19]. But the crystal structure shows that the relevant residues on the AB1 loop and helix D are located on opposite sides of huIFN- α_{2b} , and so are unlikely to form a single receptor-binding surface. As an alternative model, we propose that the IFN- α R1 makes two contacts with IFN- α . This could be accomplished using the two putative cytokine-binding domains displayed by IFN- α R1. The membrane proximal domain would interact with helices A and C (site 2), while the N-terminal domain would bind residues on helix D (site 3). Similar models have been previously proposed for LIF [41] and ciliary neurotrophic factor [42] which each share multidomain receptors. It is interesting that this apparent discrepancy is

avoided if the receptors interact with an hULFN- α_{2b} dimer. Further high resolution epitope mapping studies with purified receptor components are necessary to evaluate the accuracy of this model.

Functional role of the dimer

The structure of hIFN- α_{2b} reveals yet another unique mode of dimer association for α -helical cytokines. In contrast to the structures of IFN- γ [21], IL-10 [29,43], IL-5 [44], and macrophage colony-stimulating factor [45], which are known to function as dimers, the biological role of the hIFN- α_{2b} dimer is unknown. Gel filtration studies at physiological conditions (phosphate buffered saline [PBS], pH 7.4) demonstrate that hIFN- α_{2b} is monomeric at concentrations of up to 50 μ M (data not shown). Furthermore, although zinc is observed in the hIFN- α_{2b} dimer interface, addition of up to 1 mM zinc in gel filtration experiments does not shift the monomer-dimer equilibrium towards the dimer. These experiments, as well as the extremely low concentrations of hIFN- α_{2b} required for *in vivo* activity, suggest that the active form of hIFN- α_{2b} is monomeric.

Consistent with the work of Shire [25], the monomer-dimer aggregation state of hufFN- α_{2b} is highly dependent on ionic strength, as would be expected given the high concentration of charge at the dimer interface. At low ionic strength (20mM Tris, pH 7.5, 100mM NaCl), hufFN- α_{2b} forms a dimer at concentrations of 20 μ M. This may allow hufFN- α_{2b} to exist in a storage form analogous to the GH zinc dimer [46], which is inactive because several residues which form direct interactions with the GH receptor are buried in the dimer interface. In contrast, in the hufFN- α_{2b} dimer only Glu41 and Glu42 (which form the zinc-binding site) are completely buried in the interface, while His34 is partially occluded. The other residues



believed to be important for the biological activity of IFN- α are located on the exterior surfaces of the dimer, where they are accessible for receptor binding. Although current experiments suggest that it is unlikely that the huIFN- α_{2b} dimer participates in the active recruitment of receptor subunits to the IFN- α signaling complex, more studies must be completed to prove this. It is possible that conditions at the receptor surfaces may favor the formation of the huIFN- α_{2b} dimer which can clearly exist under certain *in vitro* conditions. If we assume that the dimer is the 'active' species, there is no need for a distinct receptor-binding site (site 3) on helix D as proposed above. In the dimer, the close proximity of helix D to the AB loop would allow the formation of one continuous conserved binding surface at site 1 as proposed by Senda *et al.*, [19]. Since the residues that can form the specific interactions in the dimer interface are conserved in all human IFN- α 's, mixed dimers would be possible, allowing further modulation of IFN- α activity. Further experimentation to elucidate the biological role of the huIFN- α_{2b} dimer will be facilitated by the determination of its three-dimensional structure.

Biological implications

The human α -interferons (huIFN- α 's) are composed of at least 15 different, but closely related amino acid sequences and have distinct antiviral, immunomodulatory and cytostatic effects on a variety of cell types. These important biological activities are stimulated through the specific high affinity interactions of the IFN- α 's with their cell-surface receptors. The 2.9 Å crystal structure of huIFN- α_{2b} provides a basis for understanding how the structural differences between different members of the IFN- α family affect biological activity.

The topology of huIFN- α_{2b} resembles the classical up-up-down-down four-helix bundle motif observed for other ligands of the class 1 and class 2 cytokine receptors. The fold of huIFN- α_{2b} may be grouped with other cytokines which bind to class 2 cytokine receptors (IFN- α , IFN- β , IFN- γ and IL-10) by the presence of a fifth helix in the molecular core. This helix replaces the extended overhand loop (CD loop) first observed in the structure of growth hormone. Further comparisons of huIFN- α_{2b} with other α -helical cytokines revealed the greatest structural similarity with IFN- β and IL-10. Previous site directed mutagenesis data has been used to determine which residues are important for biological activity. The structure of huIFN- α_{2b} reveals which of these are likely to be structurally important, and which are solvent accessible and therefore likely to interact directly with receptor molecules.

Unexpectedly, huIFN- α_{2b} exists in the crystal as a dimer. Interactions in the dimer interface are stabilized predominantly through a zinc ion giving rise to a novel mode of

subunit association not previously observed for other cytokines. The biological role of the dimer is currently unknown, although experimental evidence to date suggests the active species of huIFN- α_{2b} is monomeric. The dimer may serve as an inactive storage form of the molecule, or be important in as yet undetermined ways of recruiting the various IFN- α receptors to the signaling complex. The structure of huIFN- α_{2b} provides a basis for further biochemical studies aimed at understanding the receptor-ligand interactions for this biologically important family of molecules.

Materials and methods

Crystallization

Crystals of recombinant huIFN- α_{2b} were grown using the hanging drop vapor diffusion method. The protein drops, consisting of 1 μ l of recombinant human IFN- α_{2b} solution (40 mg ml⁻¹), were mixed with 1 μ l of the reservoir solution (40 mM ZnAc₂, 30 mM cacodylate, pH 5.6) and equilibrated at 23°C. These experiments produced intergrown aggregates which were crushed with a needle. The needle was then streaked across new protein drops which had been equilibrated at 4°C for 6 h. Following streak seeding, the crystallization trays were transferred to a 13°C incubator. After several days, a number of small perfect crystals grew along the needle trail. The seed crystals were transferred into fresh protein drops (4 μ l + 4 μ l drops) and returned to the 13°C incubator. The crystals reached maximum dimensions of 0.5 mm $\times$ 0.5 mm $\times$ 0.3 mm within two weeks. The crystals belong to the monoclinic space group P2₁ with unit cell dimensions $a = 62.4$ Å, $b = 75.5$ Å, $c = 148.2$ Å, and $\beta = 90.8^\circ$. The crystallographic asymmetric unit contains six molecules of huIFN- α_{2b} which corresponds to a solvent content of ~60%.

Structure determination

The structure of huIFN- α_{2b} was elucidated using a combination of multiple isomorphous replacement (MIR) and symmetry averaging techniques. X-ray intensity data were collected on an R-axis IIC image plate detector mounted on a Rigaku RU-200 rotating anode generator (CuK α radiation) operating at 100 mA and 40 kV. The data were integrated and scaled using the programs provided by Molecular Structure Corporation. All native and derivative data sets were collected at -170°C (Table 3).

Almost all data manipulations were carried out using the CCP4 suite of programs [47]. Two derivatives of huIFN- α_{2b} (K₂Pt(NO₂)₄, and K₂UO₂Ac₂) were identified by difference Patterson analysis of the heavy-atom data. Refinement of the heavy-atom parameters and subsequent phase calculations were carried out in MLPHARE [48]. Calculation of a 5 Å electron-density map revealed a well defined protein-solvent boundary that outlined the position of six clusters of rod-shaped density, where each cluster resembled a four helix bundle. Using computer graphics, α -carbon atoms of huIFN- β (PDB entry, 1rmi) were fitted into each of the six density clusters. The fitted coordinates were used to obtain initial non-crystallographic symmetry (ncs) matrices relating the six molecules of huIFN- α_{2b} to each other. Molecular envelopes for symmetry averaging the six huIFN- α_{2b} molecules were constructed with MAMA [49]. Optimization of the ncs operators was done using the IMP option of the RAVE program suite [50]. Sixfold symmetry averaging combined with solvent leveling produced exceptionally clear and continuous 3 Å electron density for model building, while unaveraged MIR maps were uninterpretable. Phase refinement using solvent leveling, histogram matching, and sixfold symmetry averaging were accomplished using the program DM [51]. Using the symmetry averaged map, residues 10–46, 53–96 and 113–156 were aligned into the density using CHAIN [52] and TURBO-FRODO [53]. Confidence in the peptide-chain tracing was obtained from the well defined density observed for Trp76 and Trp140 as well as the Cys29–Cys138 disulfide bond. The other five molecules of huIFN- α_{2b} were placed into the asymmetric unit using the ncs operators.

09

Table 3

HuIFN- α_{2b} crystallographic statistics.

Data set	Resolution (Å)	Reflections		Coverage (%)	R_{sym}^* (%)	MIFD [†] (%)	Phasing [‡] power	$R_{cullis}^§$
		Measured	Unique					
Native	2.9	217 393	31 925	96	9.5	—	—	—
K ₂ Pt(NO ₂) ₄	3.1	76 303	21 021	81	5.4	21.6	1.16	0.86
K ₂ Pt(NO ₂) ₄	3.7	32 435	12 320	83	9.1	24.8	1.11	0.84
UO ₂ Ac ₂	3.7	30 056	11 238	76	10.3	8.3	0.76	0.92

* $R_{sym} = \sum |I_h - \langle I_h \rangle| / \sum I_h$, where $\langle I_h \rangle$ is the average intensity over symmetry equivalents. [†]Mean isomorphous difference = $\sum |F_{PH} - F_P| / \sum F_{PH}$ where F_{PH} and F_P are the derivative and native structure factor amplitudes, respectively. [‡]Phasing power = $\sum |F_H| / \sum |F_{PH}^{obs} - |F_{PH}^{calc}||$. [§] $R_{cullis} = \sum ||F_{PH} \pm F_P| - |F_{Hcalc}|| / \sum |F_{PH} - F_P|$.

The structure of huIFN- α_{2b} was refined with the program X-PLOR [54] using the stereochemical parameter files defined by Engh and Huber [55]. A randomly selected 5% of the data were removed prior to refinement for analysis of the free R factor [56]. The initial R factor for the six molecules consisting of residues 10–43, 53–96, and 113–156 was 32.0% ($R_{free} = 42.0\%$). The progress of further refinements were monitored by the decrease in both the conventional and free R factor values. Residue segments restrained by the ncs symmetry include 12–15, 17–42, 51–63, 65–84 and 114–155. The ncs weight of 30 kcal mol^{−1} Å^{−2} was used for all segments based on the analysis of the free R factor over multiple refinement runs where the ncs weight was varied. Additionally, two temperature factors, one for mainchain atoms, and one for sidechain atoms, were refined for each residue in the model. The current model is comprised of 6 476 non-hydrogen atoms and four zinc ions. The R factor is 22.7% (22.2%, $F > 2\sigma$) with an R_{free} of 31.3% (30.4% for $F > 2(F)$ for all data at 6–2.9 Å [27 021 reflections]). No solvent molecules have been added to the model. The rms deviations from ideal bond lengths and angles are 0.015 Å and 1.97°, respectively. With the exception of Ala50, all residues are located in allowed regions of ϕ, ψ , space with > 90% in the most favored region of the Ramachandran plot. The average temperature factor for the six IFN- α_{2b} monomers ranges from 22.6 Å² to 37.8 Å².

The improvement in the stereochemical parameters of the model were followed using PROCHECK [57]. Model superpositions were defined manually using the computer graphics and improved using the least squares procedure in O [58]. Figures 1, 3, 4 and 5 were made with the program package RIBBONS [59].

Accession numbers

Atomic coordinates have been deposited in the protein data bank (Accession number 1RH2).

Acknowledgements

We thank Maxine Rice for help in preparation of the manuscript. MRW is funded by grants CA36871 and NS29719 from NIH and a grant-in-aid from the American Heart Association

References

1. Hiscott, J., Cantell, K. & Weissmann, C. (1984). Differential expression of human interferon genes. *Nucl. Acids Res.* **12**, 3727–3746.
2. Weissmann, C. & Weber, H. (1986). The interferon genes. *Prog. in Nucl. Acid Res. Molec. Biol.* **33**, 251–300.
3. Sen, G.C., & Lengyel, P. (1992). The interferon system. *J. Biol. Chem.* **267**, 5017–5020.
4. Baron, S., et. al., & Hughes, T.K. (1991). The interferons: mechanisms of action and clinical applications. *JAMA* **266**, 1375–1383.
5. Nagabhushan, T.L. & Giaquinto, A. (1995). Interferon α_{2b} : an overview from a regulatory perspective. In *Regulatory Practice for Biopharmaceutical Production*. (Lubiniecki, A.S. & Vargo, S.A., eds), pp. 221–234, John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
6. Uzé, G., Luffalla, G. & Gresser, I. (1990). Genetic transfer of a functional human interferon α receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell* **60**, 225–234.

7. Novick, D., Cohen, B. & Rubinstein, M. (1994). The human interferon α/β receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* **77**, 391–400.
8. Cleary, C.M., Donnelly, R.J., Soh, J., Mariano, T.M. & Pestka, S. (1994). Knockout and reconstitution of a functional human type I interferon receptor complex. *J. Biol. Chem.* **269**, 18747–18749.
9. Cohen, B., Novick, D., Barak, S. & Rubinstein, M. (1995). Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4208–4214.
10. Wells, J.A. (1994). Structural and functional basis for hormone binding and receptor oligomerization. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**, 163–173.
11. Bazan, J.F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6934–6938.
12. Walter, M.R., et. al., & Narula, S.K. (1995). Crystal structure of a complex between interferon- γ and its soluble high-affinity receptor. *Nature* **376**, 230–235.
13. Berbieri, J., Velasquez, L., Scrobogna, M., Fellous, M. & Pellegrini, A. (1994). Activation of the protein tyrosine kinase tyk2 by interferon- α/β . *Eur. J. Biochem.* **223**, 427–435.
14. Wetzel, R. (1981). Assignment of disulfide bonds of leukocyte interferon. *Nature* **289**, 606–607.
15. Fish, E. N., Banerjee, K. & Stebbing, N. (1983). Human leukocyte interferon subtypes have different antiproliferative and antiviral activities on human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**, 537–546.
16. Langer, J.A. & Pestka, S. (1985). Structure of interferons. *Pharmacol. Ther.* **27**, 371–401.
17. Capon, D.J., Shepard, H.M., & Goeddel, D.V. (1985). Two distinct families of human and bovine interferon- α genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 768–779.
18. Taniguchi, T., Mantei, N., Schwarzstein, M., Nagata, S., Muramatsu, M. & Weissmann, C. (1980). Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. *Nature* **285**, 547–549.
19. Senda, T., Saitoh, S. & Mitsui, Y. (1995). Refined crystal structure of recombinant murine interferon- β at 2.15 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **253**, 187–207.
20. Sprang, S. & Bazan, J.F. (1993). Cytokine structural taxonomy and mechanisms of receptor engagement. *Curr. Opin. in Struc. Biol.* **3**, 815–827.
21. Ealick, S.E., et. al., & Bugg, C.E. (1991). Three-dimensional structure of recombinant human interferon- γ . *Science* **252**, 698–702.
22. Miller, D.L., Kung, H. & Petska, S. (1982). Crystallization of recombinant human leukocyte interferon A. *Science* **215**, 689–690.
23. Murgolo, N.J., et. al., & Trotta, P.P. (1993). A homology model of human Interferon α_2 . *Proteins–Struct. Funct. Genet.* **17**, 62–74.
24. Brewely, T.A., Levine, H.L. & Wetzel, R. (1982). Structural features of human leukocyte interferon A as determined by circular dichroism spectroscopy. *Int. J. Pept. Protein Res.* **20**, 93–96.
25. Shire, S.J. (1983). pH-dependent polymerization of a human leukocyte interferon produced by recombinant deoxyribonucleic acid technology. *Biochemistry* **22**, 2664–2671.
26. Vallee, B.L. & Auld, D.S. (1990). Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 220–224.
27. Chakrabarti, P. (1990). Interaction of metal ions with carboxylic and carboxamide groups in protein structures. *Protein Eng.* **4**, 49–56.
28. Grzsiak, S., Döbeli, H., Gentz, R., Garotta, G., Labhardt, A.M. & Box, A. (1992). ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon- γ . *Biochemistry* **31**, 8180–8190.

29. Walter, M.R. & Nagabhushan, T.L. (1995). Crystal structure of interleukin 10 reveals an interferon- γ -like fold. *Biochemistry* **34**, 12118–12125.
30. Mitsui, Y., Senda, T., Shimazu, T., Matsuda, S. & Utsumi, J. (1993). Structural, functional and evolutionary implications of the three-dimensional crystal structure of murine interferon- β . *Pharmacol. Ther.* **58**, 93–132.
31. Uzé, G., Lutfalla, G. & Mogensen, K.E. (1995). α and β interferons and their receptor and their friends and relations. *J. Interferon Cyt. Res.* **15**, 3–26.
32. Camble, R., *et al.*, & Edge, M.D. (1986). Functionally important conserved amino-acids in interferon- α_2 identified with analogues produced from synthetic genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**, 1404–1411.
33. Korn, A.P., Rose, D.R. & Fish, E.N. (1994). Three-dimensional model of a human interferon- α consensus sequence. *J. Interferon Res.* **14**, 1–9.
34. Weber, H., Valenzuela, D., Lujber, G., Gubler, M. & Weissmann, C. (1987). Single amino acid changes that render human IFN- α_2 biologically active on mouse cells. *EMBO. J.* **6**, 591–598.
35. Rehberg, E., Kelder, B., Hoal, E.G. & Pestka, S. (1982). Specific molecular activities of recombinant and hybrid leukocyte interferons. *J. Biol. Chem.* **257**, 11497–11502.
36. Uzé, G., *et al.*, & Mogensen, K.E. (1994). Domains of interaction between α -interferon and its receptor components. *J. Mol. Biol.* **243**, 245–257.
37. Valenzuela, D., Weber, H. & Weissmann, C. (1985). Is sequence conservation in interferons due to selection for functional proteins? *Nature* **313**, 698–700.
38. Edge, M.D., Camble, R., Moore, V.E., Hockney, R.C., Carr, F.J. & Fitton, J.E. (1986). Interferon analogues from synthetic genes: An approach to protein structure–activity studies. *Interferon* **7**, 1–46.
39. Levy, W.P., *et al.*, & Pestka, S. (1981). Amino acid sequence of a human leukocyte interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6186–6190.
40. de Vos, A.M., Ulstich, M. & Kossiakoff, A. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of a complex. *Science* **255**, 306–312.
41. Robinson, R.C., *et al.*, & Jones, E.Y. (1994). The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding. *Cell* **77**, 1101–1116.
42. McDonald, N.O., Panayotatos, N. & Hendrickson, W.A. (1995). Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing. *EMBO. J.* **14**, 2689–2699.
43. Zdanov, A., Schalk-Hihi, C., Gustchina, A., Tsang, M., Weatherbee, J. & Wlodawer, A. (1995). Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon- γ . *Structure* **3**, 591–601.
44. Milburn M.V., *et al.*, & Wells, T.N.C. (1993). A novel dimer configuration revealed by the crystal structure at 2.4 Å resolution of human interleukin-5. *Nature* **363**, 172–176.
45. Pandit, J., Bohm A., Jancari, J., Halenbeck, R., Kothe, K. & Kim, S.-H. (1992). Three-dimensional structure of dimeric human recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Science* **258**, 1358–1362.
46. Cunningham, B.C., Mulkerrin, M.G. & Wells, J.A. (1991). Dimerization of human growth hormone by zinc. *Science* **253**, 545–548.
47. CCP4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D* **50**, 760–763.
48. Otwinoski, Z. (1991). Maximum likelihood refinement of heavy atom parameters. In *Isomorphous replacement and anomalous scattering*. (Wolf, W., Evans, P.R. & Leslie, A.G.W. eds.) pp. 80–86, SERC Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
49. Kleywegt, G.J. & Jones, T.A. (1993). Masks made easy. In *The joint CCP4 and ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography* **28**. (Wilson, K.S., ed), pp. 56–59, Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
50. Kleywegt, G.J. & Jones, T.A. (1994). From first map to final model. In *Proceedings of the CCP4 Study Weekend*. (Bailey, S., Hubbard R., & Waller, D., eds), pp. 59–66, Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
51. Cowtan, K. (1994). 'DM' an automated procedure for phase improvement by density modification. In *Joint CCP4 and ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography* **31**. (Bailey, S. and Wilson, K., eds), pp. 34–38, Daresbury Laboratory, Hamburg, Germany.
52. Sack, J.S. (1988). CHAIN: a crystallographic modeling package. *J. Mol. Graph.* **6**, 224–225.
53. Cambillau, C. & Horjales, E. (1987). TOM: a FRODO subpackage for protein–ligand fitting with interactive energy minimization. *J. Mol. Graph.* **5**, 175–177.
54. Brünger, A.T. (1992). X-PLOR, Manual Version 3.1. Yale University Press, New Haven, CT, USA.
55. Engh, R.A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst. A* **47**, 392–400.
56. Brünger, A.T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472–475.
57. Lakowski, R.J., Macarthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. (1993). Procheck: a program to check stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283–290.
58. Jones, A.T. & Kjeldgaard, M. (1993). O - the manual. Version 5.9. Uppsala, Sweden.
59. Carson, M. (1991). Ribbons 2.0. *J. Appl. Cryst.* **24**, 958–961.

The Three-dimensional High Resolution Structure of Human Interferon α -2a Determined by Heteronuclear NMR Spectroscopy in Solution

Werner Klaus*, Bernard Gsell, Alexander M. Labhardt, Beat Wipf and Hans Senn

F. Hoffmann-La Roche AG
Pharma Preclinical Research
Department, CH-4070, Basel
Switzerland

The solution structure of recombinant human interferon α -2a (Roferon-A) has been determined by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy. The calculations using simulated annealing produced a family of 24 convergent structures which satisfy the experimental restraints comprising 1541 NOE-derived inter-proton distances, 187 dihedral restraints, 66 pairs of hydrogen bond restraints, and six upper and lower limits for two disulfide bridges. The fractional labeling of methyl groups allowed their direct and unambiguous stereospecific assignment which proved to be essential for obtaining a high resolution of the structures. A best fit superposition of residues 10 to 47, 50 to 101 and 111 to 157 gives an rms deviation of 0.62 Å for the backbone heavy atoms and 1.39 Å for all heavy atoms of these segments. The dominant feature of the structure is a cluster of five α -helices, four of which are arranged to form a left-handed helix bundle with an up-up-down-down topology and two over-hand connections. The interpretation of heteronuclear ^{15}N - ^1H NOE data shows the co-existence of flexible regions within an otherwise rigid framework of the protein. Four stretches of pronounced flexibility can be located: Cys1-Ser8, Gly44-Ala50, Ile100-Lys112, and Ser160-Glu165. Among the structurally related four-helical bundle cytokines, the structure of IFN α -2a is most similar to that of human interferon α -2b and murine interferon- β . From this structural information and mutagenesis data, areas on the surface of the protein are identified which seem to be important in receptor interactions.

© 1997 Academic Press Limited

*Corresponding author

Keywords: cytokine; four-helix bundle; interferon α ; NMR spectroscopy; protein structure

Introduction

Research in the 1930s demonstrated that virally infected animals were often resistant to simultaneous co-infection with a second virus, a phenomenon which became known as "viral interference". Two decades of work into this phenomenon culminated when Isaacs & Lindenmann (1957) showed it to be due to the cellular pro-

duction of a soluble factor, which they named "interferon" (IFN). In subsequent studies this IFN factor was characterized as a group of proteins. IFNs have since been classified into two categories on the basis of their immunological, biological and chemical properties. Type I IFNs are stable at acidic pH (pH 2) and are represented by two major subtypes, the fibroblast or beta interferon (IFN- β) and the leukocyte or alpha family of interferons (IFN- α). Besides a broad spectrum of antiviral properties, IFNs of type I also have antiproliferative and immunomodulatory effects on a variety of cell types (Seng & Lengyel, 1992; Pestka *et al.*, 1987). The only known interferon of type II is IFN- γ , which is produced exclusively by lymphocytes. The medical potential of IFNs was soon recognized and demonstrated by the early

Abbreviations used: CD, circular dichroism; CT, constant time; HMQC, heteronuclear multiple-quantum coherence; HSQC, heteronuclear single-quantum coherence; IFN, interferon; GH, growth hormone; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy; rms, root mean square; 2D, two-dimensional; 3D, three-dimensional; 4D, four-dimensional.

approval of recombinant human IFN α -2a (Roferon-A) in 1986 as a drug for the treatment of malignant and virus diseases. IFN α -2a was the first pure human protein found to be effective in the treatment of cancer and has been the prototype for the clinical introduction and development of other immunomodulatory and growth-regulating cytokines, such as interleukin-2 and the hematopoietic growth factor (Borden, 1992).

In humans there are at least 18 IFN- α non-allelic genes together with a single IFN- β gene. While huIFN- α s elicit similar types of cellular response, the level of antiviral and antiproliferative response on various cells is different for various subspecies (Evinger *et al.*, 1981). Each member of the type I IFN- α s contains 165 (IFN α -2) or 166 amino acids (all other). A high level of sequence homology (80%) is displayed among the various IFN- α subtypes, and about 50% homology exists between these species and the single IFN- β subtype. All cellular responses to IFNs require the interaction of the ligand with a high-affinity, species-specific cell surface receptor. While all IFN- α / β subtypes cross-compete for the same receptor (type I receptor), IFN- γ binds to a distinct molecule (type II receptor). A functional type I interferon receptor appears to consist of at least two different subunits, the IFN- α R1 and the IFN- α / β R protein (Uzé *et al.*, 1990; Novick *et al.*, 1994). Both receptor proteins have been cloned and characterized. IFN- α / β R can bind both IFN- α and IFN- β subtypes and thus appears to be the major ligand binding component of the receptor complex. In contrast, IFN- α R1 can only bind to IFN- α 8, but has been shown to increase the affinity of the receptor complex for the ligand by approximately tenfold and also to be essential for signal transduction. The presence of two IFN- α receptor proteins indicates that ligand induced dimerization could be a key step in transmembrane signaling as is observed in better characterized cytokine receptor systems (Wells, 1994).

Although IFN- α s have been readily available for more than a decade, the determination of the three-dimensional structure of human interferon- α has been hampered by the lack of suitable crystals and by low-quality solution ^1H NMR spectra with broad resonance lines. In both cases the problems were caused by unspecific protein aggregation that prevented the 3D structural analysis. The first 3D structural information on a type I protein was obtained by Senda *et al.* (1992) for murine IFN- β . Recently, Radhakrishnan *et al.* (1996) succeeded in the crystallization of interferon α -2b in the form of a zinc mediated dimer, and the X-ray structure of the dimer could be determined at a resolution of 2.9 Å. Here, we report on the high resolution NMR solution structure of monomeric human IFN α -2a and present a structural comparison with murine IFN- β . The results are discussed in the context of sequence comparisons with other IFN- α species, known mutagenesis and functional data, thus

allowing the delineation of putative sites for the receptor interaction.

Results and Discussion

Sequential and stereospecific NMR assignment of Interferon- α

The ^1H , ^{13}C , and ^{15}N NMR chemical shifts of IFN- α at 298 K and pH 3.5 were obtained by a combination of 3D ^1H - ^{13}C , ^1H - ^{15}N , and ^1H - ^{13}C - ^{15}N experiments as outlined in Materials and Methods. All resonances of the polypeptide backbone and of side-chain atoms were assigned with the exception of the ^1H , ^{13}C and ^{15}N shifts of some peripheral atoms of the "long side-chain" amino acids Pro, Arg and Lys. Stereospecific assignments were obtained for 48 non-degenerate methylene groups, the methyl groups of all Val and all but one Leu by the various NMR experiments. The compilation of the results will be published elsewhere.

Assignment of NOESY cross-peaks and secondary structure

The interproton distance restraints used for the structure calculations were derived from the analysis of several multi-dimensional NOE spectra recorded on various samples as given in Materials and Methods: NOEs involving H^{N} protons were extracted from a 3D ^{15}N -NOESY-HSQC spectrum measured in H_2O (sample 1), NOEs between aliphatic protons from two 3D ^{13}C -NOESY-HSQC spectra measured in $^2\text{H}_2\text{O}$ (sample 2), and distances involving aromatic protons of Phe and Trp were determined from a heteronuclear-filtered 3D NOESY spectrum recorded with the "reverse" labeled sample in $^2\text{H}_2\text{O}$ (sample 4). The 4D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ NOESY data (recorded with sample 3) were mainly used to resolve ambiguities arising from signal degeneracies in the lower dimensional spectra. Intensities of overlapping signals in 3D spectra that could be assigned to specific pairs of protons in the 4D spectra, were classified as strong, medium strong or weak. As they involved predominantly methyl groups, the corresponding distances were transformed into upper limits of 4.0, 5.0 and 7.0 Å while a continuous calibration with a r^{-5} dependence was applied for the well-resolved cross-peaks in the 3D experiments.

Elements of secondary structure were identified based on characteristic patterns of sequential and medium-range NOEs, small values of $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constants (see below), deviations of the chemical shift of C^α -atoms from random coil values, and slowly exchanging amide protons. Five helices are found within the protein: helix A (Ser11-Met21), helix B and B' (Thr52-Ser68, Lys70-Ala75), helix C (Glu78-Ile100), helix D (Leu110-Glu132), and helix E (Pro137-Leu157). Short stretches of NOEs between H^α of residue i and H^{N} of residue $(i+2)$ are observed for Leu26-Lys31, Gln40-Phe43, and Lys133-Ser136 indicative of turns or short helices.

J coupling constants and angular restraints **$^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constants: ϕ - and ψ -dihedral angle restraints**

Homonuclear $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constants could be measured for 132 of the 159 potentially observable residues. Stretches of residues with coupling constants below 5.0 Hz were observed for residues Leu15-Arg22, Leu56-Asn65, Glu78-Ala97, Asp114-Glu132, and Cys138-Ser154. For the core residues of the five regular α -helices angular restraints of $-65^\circ \pm 25^\circ$ for ϕ and $-40^\circ \pm 25^\circ$ for ψ were applied. Larger ranges of $\pm 50^\circ$ were imposed for the N- and C-terminal regions of the helices to allow for fraying. Coupling constants with values larger than 9.0 Hz occurred only at Cys29, Phe43, and Trp76 and were translated into dihedral restraints of $-120^\circ (\pm 50^\circ)$ for ϕ only. Loose restraints for ϕ of $-90^\circ (\pm 90^\circ)$ were imposed on residues Asp2-Leu9, Lys23, Val99-Gln101, Thr106-Thr108, and Glu159-Glu165 restricting these residues to the allowed left-hand half of the Ramachandran plot.

 $^3J_{\text{C-N}}$, $^3J_{\text{C-CO}}$, $^3J_{\text{N-H}\beta}$ and $^3J_{\text{CO-H}\beta}$ coupling constants: χ^1 -dihedral angle restraints

Heteronuclear coupling constants $^3J_{\text{C-N}}$ and $^3J_{\text{C-CO}}$ could be measured for six out of eight Ile, eight out of ten Thr, and five out of seven Val residues. The size of the coupling constants indicated a unique side-chain configuration for four Ile, four Thr, and four Val. For two more Thr and Ile and one more Val residue a preferred χ^1 angle became evident in the course of the structure calculations and the corresponding dihedral restraints were additionally included in subsequent refinement stages. Heteronuclear coupling constants $^3J_{\text{N-H}\beta}$ and $^3J_{\text{CO-H}\beta}$ were determined qualitatively based on the absence or presence of the expected cross-peaks. Therefore, the rotameric state and concomitantly the stereospecific assignment of β -methylene protons could be deduced unambiguously only for 13 residues. For three more amino acids their χ^1 configuration and subsequently their stereospecific assignment was established from an analysis of preliminary conformations at intermediate stages of the structure determination. Further stereospecific assignments were obtained from an interpretation of the results of the floating chirality feature of the X-PLOR program.

 $J_{\text{C}\alpha\text{-C}\delta}$ coupling constants of Ile and Leu: χ^2 -dihedral angle restraints

For nine out of 21 Leu- and five out of eight Ile-residues large coupling constants $^3J_{\text{C}\alpha\text{-C}\delta}$ of ≈ 3 Hz between $\text{C}\alpha$ and $\text{C}\delta^1$ were measured indicating a *trans* configuration of the side-chain ($\chi^2 = 180^\circ$). The *gauche* minus arrangement ($\chi^2 = 60^\circ$) was found only for Leu66 while the evaluation of the signals for the other leucines was hampered by

Table 1. Summary of structural restraints derived from NOEs, coupling constants and hydrogen/deuterium exchange experiments

Distance restraints:	
Intra-residual	201
Sequential ($ i-j =1$)	452
Medium-range ($1 < i-j < 5$)	366
Long-range ($ i-j > 4$)	522
Hydrogen bonds ^a :	2*66
Disulfide bridges ^a :	3*2
Angular restraints:	
Dihedral angle ϕ	69
Dihedral angle ψ	69
Dihedral angle χ^1	33
Dihedral angle χ^2	16

^a For each hydrogen bond there are two distance restraints: $1.6 \text{ \AA} < r_{\text{NH}\cdots\text{O}} < 2.0 \text{ \AA}$ and $2.7 \text{ \AA} < r_{\text{N}\cdots\text{C}'} < 4.0 \text{ \AA}$. For disulfide bridges there are three distance restraints: $1.9 \text{ \AA} < r_{\text{S}\gamma\text{-S}\gamma} < 2.1 \text{ \AA}$, $2.9 \text{ \AA} < r_{\text{C}\beta\text{-S}\gamma} < 3.1 \text{ \AA}$ and $2.9 \text{ \AA} < r_{\text{S}\gamma\text{-C}\beta} < 3.1 \text{ \AA}$.

cross-peak overlap or gave intermediate values of ≈ 1.5 Hz indicating rotameric averaging. A small coupling constant (< 1 Hz) for Ile147 pointed to a *gauche* plus ($\chi^2 = -60^\circ$) configuration.

Structure calculation of interferon- α

The various types of restraints for the structure calculations are summarized in Table 1. They included 1541 NOE-derived inter-proton distance limits, of which 201 were intra-residual, 452 were sequential, 366 were medium-range involving amino acids two to four residues apart in the protein chain, and 522 were long-range between amino acids more than four residues apart. Their distribution (omitting intra-residual NOEs) along the sequence is shown in Figure 1(a). The number of long-range distance restraints is low both at the N and C terminus, between residues 27 and 31, 48 and 49, and particularly between 106 and 110. For the latter segment many of the observed intra-residual and sequential NOEs were discarded as they could not be fulfilled simultaneously. The presence of strong NOEs of both type $\text{H}_\text{N}(i)/\text{H}_\text{N}(i+1)$ and $\text{H}_\alpha(i)/\text{H}_\text{N}(i+1)$, chemical shift degeneracies for the atoms involved, and their insignificant deviation from random chain values were taken as indicators for a flexible loop being in fast exchange among various conformations, and therefore preventing the determination of a unique fold of this part of the protein backbone. Large numbers of NOEs were identified for the helical regions of IFN- α involving numerous methyl groups of hydrophobic side-chains. They could be assigned from the 3D ^{13}C -edited constant-time NOESY spectrum due to its high resolution in the carbon dimension (sample 2) and from the 3D ^{13}C -edited-HMQC-NOESY spectrum recorded for the reverse labeled sample 4. One-hundred and thirty-two upper and lower distance restraints representing 66 hydrogen bonds and six upper and lower limits for the two disulfide bridges were incorporated into the structure calculations. The relatively low number of intra-residual NOEs was compensated

189

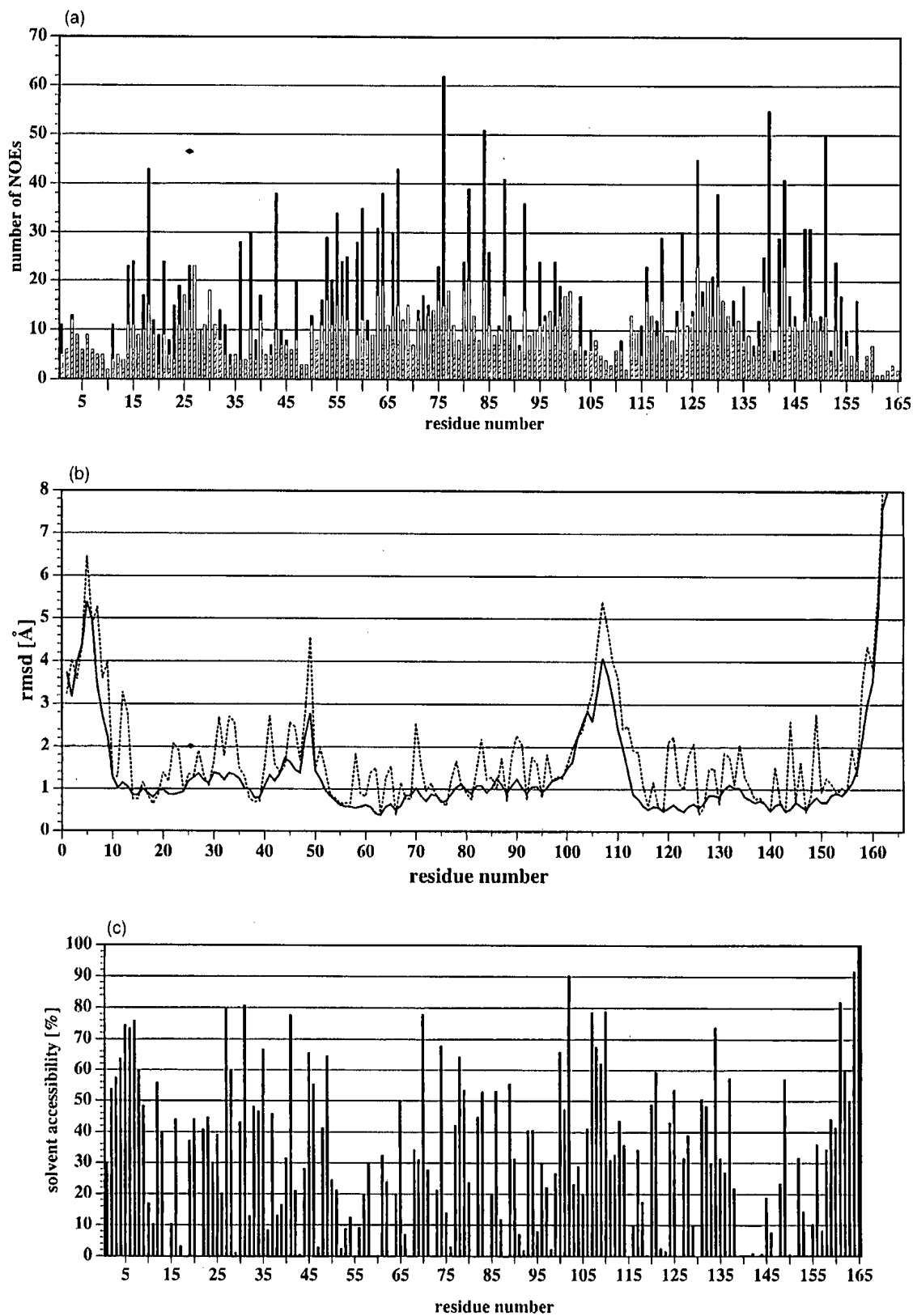


Figure 3(a-c).

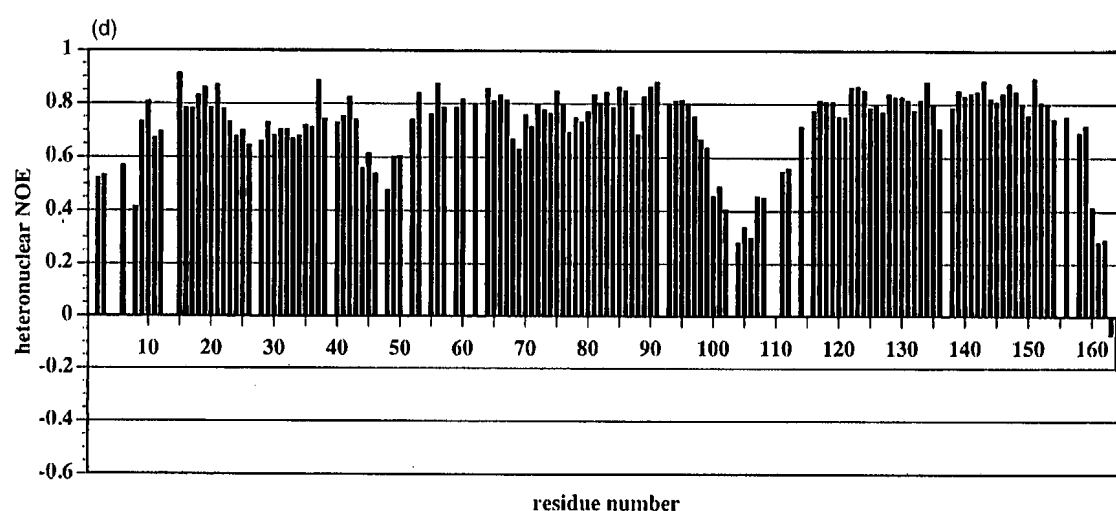


Figure 1. (a) Number and distribution of sequential (hatched bars), medium-range (open bars) and long-range (filled bars) NOEs along the sequence of interferon α -2a. (b) Plot of rmsd values of the backbone (continuous line) and side-chain (dotted line) heavy atoms after superposition for minimum deviation for residues 1 to 165. (c) Plot of the normalized solvent accessibility for the individual amino acids in the 24 final NMR structures. The water-accessible surface-area of each residue Xxx was calculated using a probe radius of 1.4 Å and normalized by its maximum accessible surface area of a fully extended tripeptide Gly-Xxx-Gly (Kabsch & Sander, 1983). (d) Distribution of ^{15}N - ^1H -detected heteronuclear NOE values over the sequence of interferon α -2a. Missing bars are due to proline residues (at positions 4, 39, 55, 109, 137) or overlapping cross-peaks. The errors in the hetero-NOE values are estimated to

by the determination of dihedral restraints derived from J -coupling constants. Restraints for ϕ of $90^\circ(\pm 90^\circ)$ were introduced to prevent residues from falling outside the allowed regions of the Ramachandran plot. In the final round of structure calculations a set of 100 random conformations was subjected to simulated annealing and

restrained energy minimization using X-PLOR (Nilges *et al.*, 1988; Nilges, 1995), and the 24 structures with the lowest value of the total energy term were selected to represent the solution conformation of IFN- α . None of the structures had violations of the distance restraints exceeding 0.4 Å or of the angular restraints exceeding 3° . Table 2 gives an overview of the structural statistics. The atomic rms deviations for backbone and side-chain atoms, together with the normalized solvent-accessible surface area are plotted on a per residue basis in Figure 1(b) and (c). There are well-defined regions in the structure of the protein, mainly the helical regions, but also segments that exhibit a considerable degree of flexibility especially in the loops that connect the helices. This is illustrated in Figure 2 which shows a stereo representation of the 24 final NMR structures after a best fit superposition of the backbone atoms (N, C $^\alpha$, C $^\beta$, O) of the five helices (helix A, residues 11 to 21 shown in pink; helix B, residues 52 to 68, helix B', residues 70 to 75 shown in cyan; helix C, residues 78 to 100 shown in green; helix D, residues 110 to 132 shown in magenta; helix E, residues 137 to 157, shown in red).

Table 2. Summary of the statistics for the 24 final structures

Atomic rmsd values (Å) ^a	Backbone atoms	All heavy atoms
All residues	2.40	2.97
All residues except 1–9, 48–49, 102–110, 158–165	0.62	1.39
Helices A–E & B' (residues 11–21, 52–68, 70–75, 78–100, 110–132, 137–157)	0.48	1.31
X-PLOR energy terms ^b (kcal mol ^{−1})		
Energy term	Average $\pm$ standard deviation	
E_{tot}	-223.82 ± 18.70	
E_{bond}	31.57 ± 1.24	
E_{angl}	113.01 ± 5.85	
E_{dihed}	149.08 ± 10.29	
E_{impr}	25.23 ± 1.40	
E_{vdw}	-607.12 ± 22.01	
E_{NOE}	63.15 ± 7.03	
E_{CDIH}	1.25 ± 1.11	

^a Numbers represent the minimized sum of mutual squared deviations between corresponding backbone atoms (N, C $^\alpha$, C $^\beta$ and O) or heavy-atoms in the final X-PLOR-structures (Gerber & Müller, 1987).

^b The values for the X-PLOR energy terms were obtained with force constants of 4 kcal mol^{−1} Å^{−4} (E_{vdw}), 50 kcal mol^{−1} Å^{−2} (E_{NOE}) and 200 kcal mol^{−1} (E_{CDIH}).

The solution conformation of interferon- α

Figure 3 shows the schematic representation of the energy-minimized average solution structure of IFN- α . Its dominant structural feature is a cluster of five major α -helices (A to E) four of which are arranged to form a left-handed four-helix bundle with an up-up-down-down topology and two

608

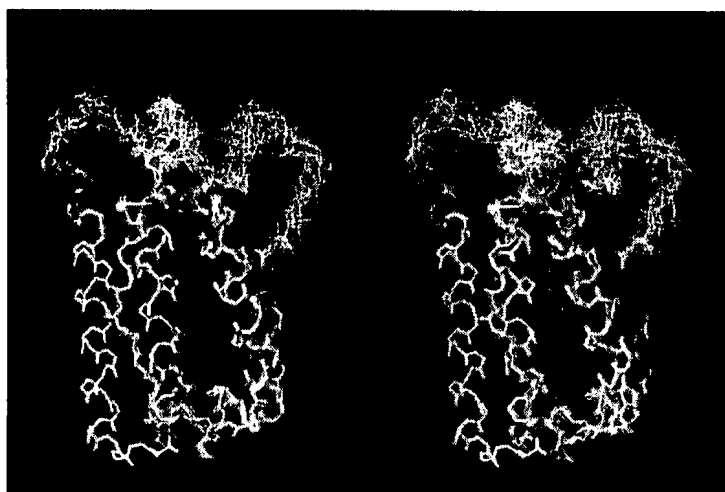


Figure 2. Stereo representation of the 24 final structures of interferon α -2a after a best-fit superposition over the backbone atoms (N, C $^{\alpha}$, C', O) of the five helices. The color coding scheme is as follows: helices A to E are shown, respectively: pink, cyan, green, magenta, red. The connecting loop segments are shown in orange.

overhead connections (Presnell & Cohen, 1989). The bundle consists of helices A, B, C, and E; residues Arg22-Glu51 (including the short 3_{10} helix

Gln40-Phe43) and residues Gln101-Ser136 (including helix D) make up the first and second overhead connection (loop 1 and loop 2). Helix A with

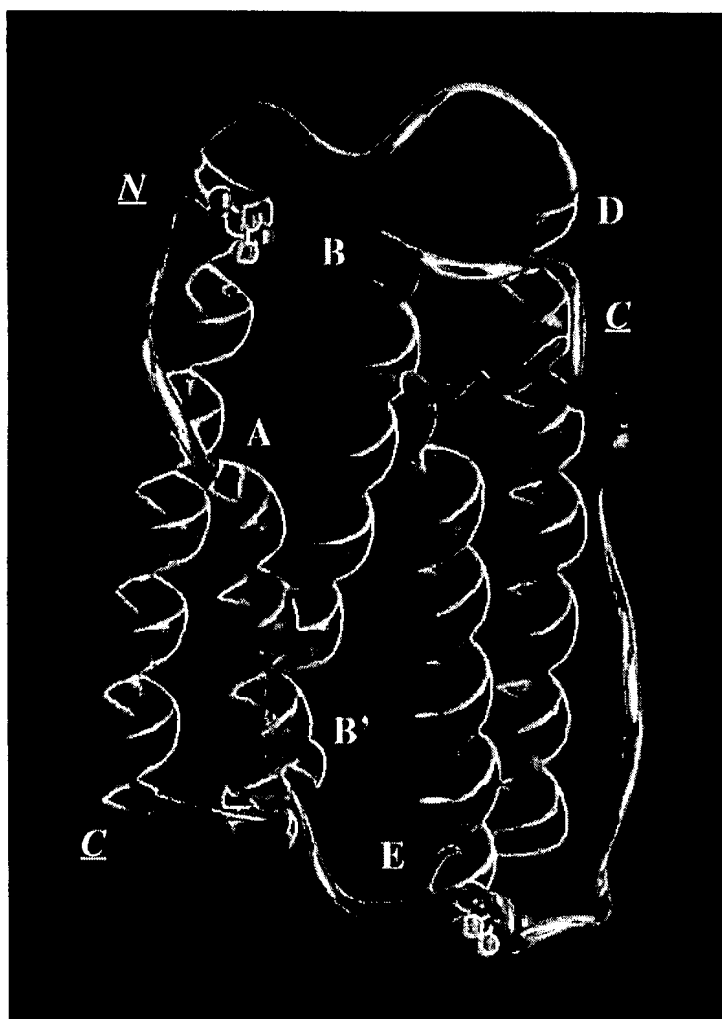


Figure 3. Ribbon display of the overall fold of interferon α -2a based on the energy-minimized structure averaged over the 24 final structures of the ensemble. The α -helices (in orange) are marked with labels A to E close to their N-terminal end. The 3_{10} helix is shown in red, and the termini of the protein are indicated by N and C. The two disulfide bridges are shown in a ball-and-stick representation with the sulfur atoms in yellow, and the carbon atoms in grey. The Figure was prepared using the program Ribbons 2.0 (Carson, 1991).

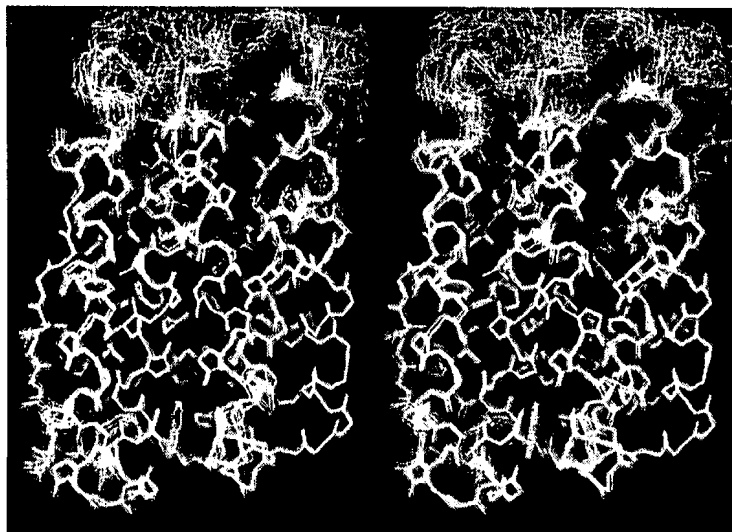


Figure 4. Overlay of the side-chains of the well-defined amino acids of the final structures together with the polypeptide backbones (in yellow). The side-chains are colored according to residue type: Asp, Glu: red; Arg, Lys: dark blue; Ala, Ile, Leu, Phe, Val: cyan; Pro, Trp: green; Thr, Tyr, Ser: white. The flexible loops are clustered at the top of the structures.

11 amino acids is the shortest one of the five major helices while the other four are made up of about 20 residues on average. Between helix A and helix B there is a long loop of 30 residues. The protein backbone of its first part (Arg22-Asp32) runs approximately perpendicular to the axis of the helix bundle and displays multiple conformations. The second part (Arg33-Gly44) runs parallel to the axis of the bundle with the backbone in an extended conformation up to Pro39. Residues Gln40 to Phe43 in this second segment are consistently found in a 3_{10} helical conformation. The third part comprising Gly44 to Gly50 is flexible and therefore ill-defined. In about 50% of the structures the dihedral angles ϕ and ψ of residues 49 and 50 are found in the region of a left-handed α -helix in the Ramachandran plot. After the C-terminal end of helix B residue Thr69 has backbone angles that fall into the core β -sheet region in the Ramachandran plot. The following short piece of helical conformation comprising Lys70-Ala75 (helix B') runs almost perpendicular with respect to helix B. The latter segment is followed by a tight turn of type VIII (Lewis *et al.*, 1973) at Ala75/Trp76 that leads into helix C. The CD-loop connecting helices C and D is essentially unstructured as evidenced by the low number of NOEs and the high degree of backbone mobility as measured by the heteronuclear ^{15}N - ^1H NOE (see below). In contrast, the loop between helices D and E is well-defined with dihedral angles ϕ and ψ of Lys134 and Tyr135 in the region of a left-handed α -helix in the Ramachandran plot.

The core of the helix bundle (defined as those residues which are located in the helices and show less than 15% solvent accessibility) is made up of mostly hydrophobic residues with the exceptions of six polar (Ser11, Thr14, Ser72, Ser150, Ser154, Thr155) and four charged side-chains (Glu87, Glu141, Arg144, Glu146). Figure 4 displays the well-defined side-chains together with the back-

bone structures of IFN- α . The O^γ of Ser11 could participate in a hydrogen bond to the O^ϵ of Gln91, while the hydroxyl oxygens of the other buried polar residues appear in most conformers to be hydrogen-bonded to the backbone carbonyl oxygen of residues *i*-4 or *i*-5 (in the case of Ser72). For Glu87 there is no obvious intra-molecular partner for forming a hydrogen bond. The side-chains of the buried charged amino acids Glu141 and Arg144 are stabilized by forming an internal salt-bridge with each other and by a network of hydrogen bonds to the side-chain of Arg22 in the case of Glu141 or the backbone carbonyls of Leu18 or Glu141 for Arg144. The O^ϵ atoms of Glu146 form hydrogen bonds to the backbone nitrogen of Phe36, to O^γ of Tyr122 or to the guanidino group of Arg149. Helix D and loop AB are attached to the core of the four-helix bundle *via* hydrophobic clusters comprising mainly Leu, Ile, and Val residues of helix D and aromatic ringsystems of Phe for loop AB. A further anchoring of the N-terminal segment of this loop is provided by the disulfide bridge between Cys29 and Cys138. Some large, apolar side-chains are exposed to the solvent to more than 30% of their van der Waals surface; with the exception of Phe27 and Leu30 within the N-terminal part of the AB loop and Met111, Leu117 and Leu128 of helix D they are located in flexible segments of the molecule.

Backbone dynamics

The interpretation of the heteronuclear ^{15}N - ^1H NOE data clearly shows the co-existence of flexible regions within an otherwise rigid framework of the protein. Taking an upper limit of 0.6 for the NOE to differentiate the more flexible backbone segments from the less mobile parts of IFN- α , four regions of pronounced flexibility can be located: Cys1-Ser8, Gly44-Ala50, Ile100-Lys112, and Ser160-Glu165 (Figure 1(d)). Although one would expect the same degree of internal backbone flexibility for

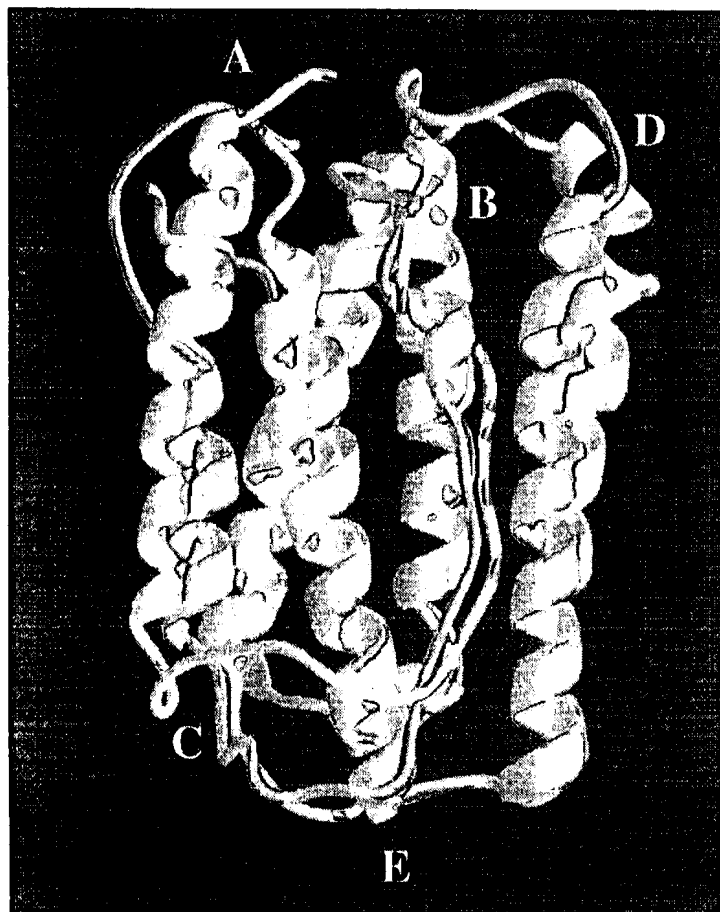


Figure 5. Overlay of the average NMR conformation of human interferon α -2a (in orange) and the X-ray structure of murine interferon- β (in cyan) (Senda *et al.*, 1995). The α -helices are marked with labels A to E close to their N-terminal end. The Figure was prepared using the program Ribbons 2.0 (Carson, 1991).

both chain ends, the N terminus is less mobile presumably due to the presence of the disulfide bridge between Cys1 and Cys98. A remarkable feature is the relatively high mobility of residues Ile100 to Glu112 which in the three-dimensional structure represent a solvent-exposed loop. Similarly, the stretch between Gly44 and Ala50 constitutes an unstructured and therefore mobile part of the protein. This interpretation is supported by the evaluation of the T_1 and T_2 relaxation measurements where especially in the latter longer relaxation times are observed for the same four segments of the protein backbone (data not shown).

Structural comparison with other interferones

Based on their known tertiary structures the family of helical bundle cytokines can be divided into three subfamilies, namely the short-chain, the long-chain and the IFN-like cytokines as reviewed by (Rozwarski *et al.* (1994) and Mott & Campbell, (1995). Key features of the long-chain subfamily are a bundle of four well-aligned helices 20 to 30 residues in length and a helix A to helix B crossover passing in front of helix D. The crossover connections include short helices which are not well-aligned with or integrated into the bundle core.

For the short-chain subfamily members the helices of the bundle are aligned less well and are only 10 to 20 residues long. In addition, the crossover from helix A to helix B passes behind helix D and is part of a short two-stranded anti-parallel β -sheet which contributes to the bundle core. The interferon-like cytokines have features which are intermediate between the other two. The helix packing angles in these molecules are closer to those found in short-chain cytokines, but their helix A to helix B crossover passes in front of helix D, as it does in the long-chain subfamily. One unique feature of the IFN fold is that the loop connecting the third helix (C in our case) and the fourth helix (E) contains a fifth α -helix (D) which contributes to the protein core. The schematic representation given in Figure 3 shows that huIFN- α fulfills the criteria to be classified as a member of IFN fold subfamily of helical cytokines. The helix bundle is the dominating feature of the tertiary structure as it is the case for IFN- β and IFN- γ . The backbone fold of huIFN- α resembles very closely those of muIFN- β as they both belong to the type I subclass of interferons. No indication of dimerization could be found for IFN- α whereas IFN- γ , the only representative of the type II interferons, occurs as a natural homo-dimer.

Recently, the X-ray structure of IFN α -2b at 2.9 Å resolution was published (Radhakrishnan *et al.*, 1996). The amino acid sequences of IFN α -2a and α -2b differ by only one residue (K23R), and concomitantly the overall structures, as can be inferred from the publication (the coordinates have not yet been released), are identical. The presence of the five helices and their location within the primary sequence differ only marginally. Also the kink at residue Thr69 between helices B and B' is observed in both structures. Furthermore, virtually all the other structurally important features are found in the liquid as well as in the crystalline state. However, in solution IFN α -2a remains stable as a monomer even at concentration of up to 2 mM and low ionic strength, whereas the crystal structure of IFN α -2b describes a Zn-mediated dimer with a large interface area of approximately 1000 Å. The biological role of a dimer is unknown, and all experimental evidence to date suggests the active species of IFN- α to be monomeric (Radhakrishnan *et al.*, 1996). As the dimer interface also involves residues implicated in receptor binding, conformational differences might occur compared to the monomeric solution structure of IFN α -2a. However, these differences cannot be assessed in detail as the coordinates of IFN α -2b have not yet been released.

Murine interferon- β (mIFN- β) is the only representative of the type I interferons for which the coordinates are available (Senda *et al.*, 1992, 1995). A superposition of IFN- β with the averaged NMR solution structure of human IFN α -2a shows that the overall conformations are similar. The rmsd value amounts to 1.38 Å for 80 pairs of C α -atoms located in regions of helical secondary structure which are common to both proteins (IFN- α -residues Gly10-Ala19, Thr52-Ser68, Glu78-Ala97, Asp114-Glu132, Pro137-Thr155). Figure 5 gives an illustration of the superposition of the forementioned parts of both proteins. The lengths of the helices vary to some extent. The largest difference is associated with helix A which in mIFN- β is 19 residues long (Tyr3-Glu22). Its counterpart in huIFN- α is shorter and runs from Gly10 to Met21 while the residues from Leu3 to Leu9 are flexible and unstructured. The sequence of turns from Leu26 to Cys29 is another unique feature of the human protein which is absent in murine interferon- β . A structure-based sequence alignment of both proteins may explain these differences as there is a short deletion of three residues in huIFN- α close to the N terminus corresponding to Tyr3-Gln5 of mIFN- β , and an insertion of four amino acids Phe27-Leu30 in huIFN- α . Helix B of mIFN- β runs from Lys48 to Val65 and occurs at a slightly shifted position within the sequence of IFN- α . Here it is longer and runs from Ile53 (corresponding to Ala52 in IFN- β) to Ala75 but is kinked at Thr69. The segment equivalent to the C-terminal part of helix B after Thr69 (termed B' in IFN- α) adopts a 3_{10} helical conformation in mIFN- β . No equivalent of the murine IFN- β CD helix (Glu103-

Table 3. Residues absolutely conserved among 35 species of IFN- α

Residue	Location	Putative role ^a
Cys1	N terminus	Disulfide bond
Leu3		
Leu9		
Ser28	AB loop	Receptor interaction
Cys29	AB loop	Disulfide bond
Arg33	AB loop	Receptor interaction
Phe36	AB loop	Packing against helix D
Gln46	AB loop	
Gln61	Helix B	
Leu80	Helix C	Helix packing
Leu81	Helix C	Helix packing
Cys98	Helix C	Disulfide bond
Gln101	Loop CD	
Leu110	Helix D	
Tyr122	Helix D	Packing against AB loop
Phe123	Helix D	Helix packing
Arg125	Helix D	Receptor interaction
Leu130	Helix D	Helix packing
Cys138	Helix E	Disulfide bond
Ala139	Helix E	Helix packing
Trp140	Helix E	Helix packing
Glu141	Helix E	Salt bridge
Ala145	Helix E	
Arg149	Helix E	
Ser154	Helix E	Helix stabilizing

^a Putative roles for each residue were assigned "helix packing" if they were found to be involved in the interior packing of the four-helix bundle, or "receptor interaction" on the basis of published mutagenesis data. "Disulfide bond" refers to the cysteines' role in maintaining the overall structural integrity.

Glu109) is found in IFN- α which instead shows a high degree of flexibility in this part of the structure. In the crystal the CD loop, containing the CD helix, participates in inter-molecular interactions due to crystal packing, and the existence of a helix within this loop may be a consequence of the crystalline state. Other differences occur within the BC loop where the tip of this segment approaches quite closely the DE loop in IFN- β within a distance of about 5 Å whereas in huIFN- α the minimum distance between the corresponding parts of the backbone amounts to 8 Å. The two disulfide bridges which are not present in the murine protein clearly lead to different conformations of the segments involved. This is manifested in IFN- α in the turn-like arrangement of the region from Phe27 to Leu30 which comprises Cys29 and constitutes an insertion not found in the murine sequence. On the other side, the somewhat unusual backbone conformation of Lys134/Tyr135 (corresponding to Lys132/Tyr133 in IFN- β) is present in both structures.

Implications for receptor binding

So far structure determinations of complexes of interferons and their receptors have been reported only for human IFN- γ and its receptor (Walter *et al.*, 1995). No structural information on receptor binding is available for any of the other interferons (α , β , τ , ω). Based on sequence alignments of several type I interferons and on site-directed mutagenesis

three patches of conserved residues implicated in interacting with the receptor(s) were found on the AB loop (Cys29-Phe36, termed AB domain), on helix C (Glu78-Asp95, C domain) and on helix D including the adjacent DE loop (Tyr122-Ala139, D domain) (Waine *et al.*, 1992; Fish, 1992; Mitsui *et al.*, 1993). Uzé and co-workers proposed one more receptor binding epitope located on helix A, namely Met16-Ser28, i.e. the last two turns of helix A and the proximal part of the AB loop (A domain) (Uzé *et al.*, 1994). They also suggested a sequential two-step model for the binding of an IFN- α molecule to its cellular receptors where all four domains would be involved. To learn more about the role of conserved residues, a sequence alignment of 35 IFN- α species shows that 25 amino acid residues are absolutely conserved (Table 3). Sixteen of these invariant residues are found in the helical regions of IFN- α , four are cysteines (of which two are also part of helices), and five map to the AB loop (including Cys29). Three conserved residues are located in flexible elements while none is found in helix A. However, there are clear preferences for certain types of amino acids at position 13 (Arg), 17, 18 (both Leu) and 21 (Met). Due to their location within the three-dimensional structure they play an important role in maintaining the integrity of the helix-bundle. Interestingly, no resi-

due on that helix has been identified as important for binding by mutagenesis studies. The clustering of important amino acids in the AB loop is remarkable. Almost conserved sites are found at position 23 (Arg), 24 (Leu, Ile or Val) and 30 (Leu). The latter site is also substantially accessible to solvent as is position 27, although it is less strictly conserved, and they may well be important in mediating hydrophobic interactions with the receptor molecules. The adjacent segment from Lys31 to Asp35 of the AB domain comprises exclusively polar residues which, with the exception of Asp32, show a high degree of solvent accessibility. Furthermore, they exhibit a slightly higher mobility than the other well-defined parts of the protein structure. Taken together these features make them ideally suited for electrostatic interactions with oppositely charged regions of the receptor molecules. Furthermore, their flexibility would allow for structural adaptations upon intermolecular contacts. This polar interface is nicely extended upon inclusion of the charged residues Lys131, Glu132, Lys133, and Lys134 located at the C-terminal end of helix D and of the absolutely conserved residues Cys138-Glu141 which together make up the D domain. Their locations in the three-dimensional structure of IFN α -2a imply that they together might form one bipartite epitope for binding of one of the two

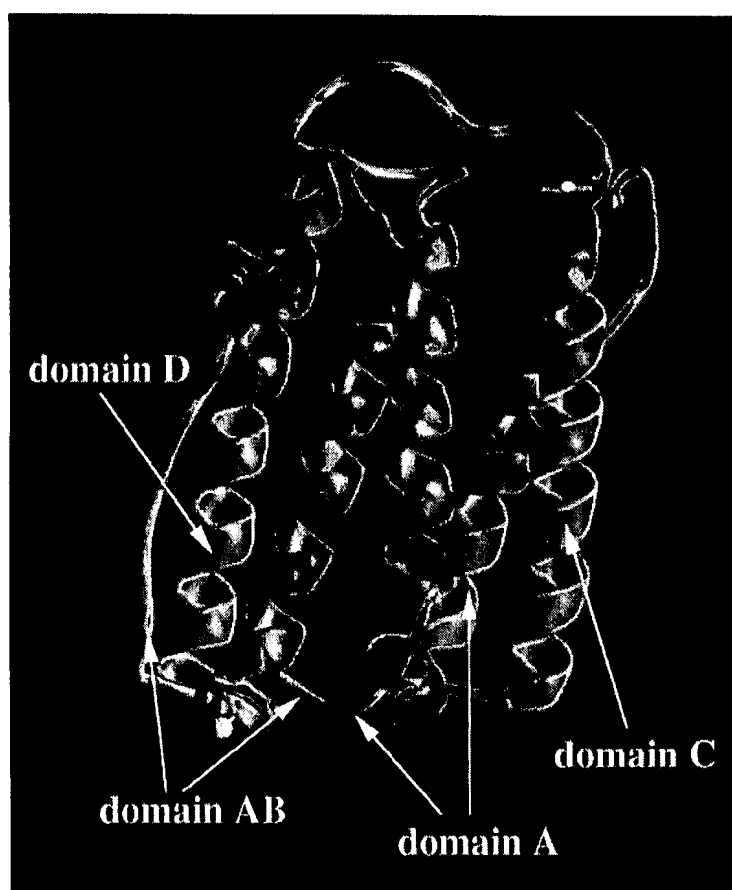


Figure 6. Location of putative receptor binding domains (A, AB, C, and D) of interferon α -2a. Segments that have been implicated are colored in orange. The two disulfide bridges are shown in a ball-and-stick representation with the sulfur atoms in yellow, and the carbon atoms in gray. The Figure was prepared using the program Ribbons 2.0 (Carson, 1991).

receptor molecules. Residues on helix C that were described as major determinants in binding to the receptors are Lys83 and Tyr89. In both the X-ray structure of IFN- β and the NMR solution structure of IFN α -2a they are found on the solvent exposed face of the helix. Both amino acids are oriented such that their participation in receptor binding is supported by the three-dimensional protein structures. Five totally or highly conserved Leu-residues of helix C (80, 81, 88, 92, and 95) are important in its packing against helices A and B, and together they make up the C domain. In analogy with the ligand induced dimerization of IFN- γ and also of growth hormone (GH) and their respective receptors (de Vos *et al.*, 1992), the sequential two-step model would require as a first step the binding of the more promiscuous IFN- α /IFN- β receptor protein to domains AB and D. This view is supported by the fact that especially residues of the D domain are conserved among the various IFN- α - as well as IFN- β -species. The IFN- α R1 receptor molecule would then interact with domains A and C in a second step leading ultimately to the signal transduction event. The domains implicated in receptor binding are highlighted in Figure 6.

Materials and Methods

Sample preparation

Recombinant human interferon α -2a (Roferon[®]) was expressed and purified according to published procedures (Hochuli, 1986). For the NMR sample preparation, the protein solution (≈ 4 mg/ml) was subjected to the following procedures: ultra centrifugation at 300,000 g for one hour; change of pH by dialysis against 50 mM acetic acid (pH 3.5), 0.02% NaN_3 ; concentration to ≈ 1 ml; dialysis against ≈ 1 mM HCl in H_2O , pH 3.4; dialysis against 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ $^2\text{H}_2\text{O}$ (pH 3.4), 0.02% NaN_3 ; adjustment of the protein concentration to ≈ 2 mM; centrifugation by air-fuge at 185,000 g for one hour. The solubility of IFN α -2a was observed to be highest at very low ionic-strength and at an acidic pH of ≈ 3.5 .

Laser light scattering experiments were carried out with the NMR protein sample solution (ALV-5000 laser-scattering system; Langen, Federal Republic of Germany). The distribution of the scattered light intensities was observed to be narrow and unimodal; the hydrodynamic radius was determined to be ≈ 19 Å. These observations are in agreement with fully monomeric protein solution in the NMR sample. CD studies and one-dimensional NMR spectra over the pH range from 3.2 to 7.0 indicate the structural integrity of the protein although the NMR resonance lines are slightly broader at neutral pH.

Uniform ^{15}N -labeling and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeling (both $>98\%$) were performed in ^{15}N and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ labeled minimal media, using $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ and $^{13}\text{C}_6$ -glucose as N- and C-sources. Fractional ^{13}C labeling was achieved using a minimal media containing a mixture of 88% UL- $^{12}\text{C}_6$ - and 12% UL- $^{13}\text{C}_6$ -glucose ($>98\%$ ^{13}C) and $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (99%) following the protocol given by Senn *et al.* (1989). For "reverse labeling" (residue-type selective ^{12}C -residues in otherwise uniformly- ^{13}C labeled protein) autotrophic recombinant *Escherichia coli* was grown aerobically on

minimal medium in a 5 l bioreactor. Normal $^{12}\text{C}_6$ -glucose (1 g/l) was supplied initially to support growth to an optical density of about 1.0 at 550 nm. After exhaustion of this glucose, uniformly labeled ^{13}C -glucose (2 g/l) and normal ^{12}C -amino acids (Phe and Trp, all at 20 mg/ml) were added and IFN- α expression was induced.

NMR experiments

The heteronuclear NMR measurements were performed on differently labeled protein samples: sample 1, 99% ^{15}N labeled, dissolved in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ $^2\text{H}_2\text{O}$; sample 2, 99% ^{13}C labeled, in 100% $^2\text{H}_2\text{O}$; sample 3, 99% ^{15}N , 99% ^{13}C labeled, in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ $^2\text{H}_2\text{O}$; sample 4, UL- ^{12}C -Trp, UL- ^{12}C -Phe, all other amino acids ^{13}C ("reverse labeled"), in 100% $^2\text{H}_2\text{O}$; sample 5, 12% ^{13}C labeled ("fractionally labeled"), in 100% $^2\text{H}_2\text{O}$. All experiments were done on Bruker AMX-500, AMX2-600 or DMX-600 spectrometers at a temperature of 298 K. The pH of the protein solutions was adjusted to 3.5 by adding minute amounts of ^2HCl . The concentration of the samples varied from 2.0 mM to 2.2 mM with their isotopic composition as given above.

$\text{H}/^2\text{H}$ -exchange of amide protons was initiated by passing the H_2O solution of ^{15}N labeled IFN- α over a gel-filtration column which had been washed extensively with $^2\text{H}_2\text{O}$. The first spectrum could be recorded five minutes after the $\text{H}/^2\text{H}$ exchange had been initiated. After that, a series of 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectra (Grzesiek & Bax, 1993a) was recorded and the disappearance of N-H cross-peaks was monitored.

Data processing and spectral assignments

NMR data were transferred to SUN or SGI workstations and processed using the nmrPipe software package (Delaglio *et al.*, 1995). Routinely, the time domain data for ^1H were zero-filled to 512 or 1024 complex data points and a squared sinebell window function shifted by 60° was applied before Fourier-transformation. For the three-dimensional triple resonance experiments the length of the interferograms in the carbon- as well as in the nitrogen-dimension was doubled by linear prediction and zero-filled to the next power of two. Apodization of the data was done by applying a squared cosine-bell window function before FT. All spectra were analyzed using the program PIPP and related software (Garrett *et al.*, 1991).

The sequential assignment of the backbone atoms made use of scalar connectivities as manifested in the HNCA, HN(CO)CA, HNCO, CBCANH, and CBCA(CO)NH spectra which correlate the chemical shifts of C' , C'' - and C^{B} -atoms with those of the N- and H^{N} -atoms for either residue i or $(i-1)$ (Grzesiek & Bax, 1992a,b,c). This procedure allowed for a sequential resonance assignment for almost all residues. Ambiguities in the assignment could be resolved by inspection of the 3D ^{15}N -edited NOESY where sequential NOEs pointed to the amide proton frequency of the adjacent amino acid residues. Additionally, NOE connectivities were used to bridge gaps in the assignment that occur at proline residues.

The chemical shifts of the more peripheral side-chain atoms were taken from HBHA(CO)NH, C-DIP(CO)NH and H-DIP(CO)NH experiments recorded on the double labeled sample in H_2O (Grzesiek & Bax, 1993b; Grzesiek *et al.*, 1993a) and confirmed by the 3D ^{13}C -edited TOCSY spectra recorded in $^2\text{H}_2\text{O}$ (Bax *et al.*, 1990). Additionally,

the 2D constant-time ^{13}C - ^1H -correlation spectra served as fingerprints confirming the correctness of the assignments (Vuister & Bax, 1992). Correlations involving the atoms of the aromatic spin systems were taken from the experiments with the reverse labeled sample (for Phe and Trp) (Bax *et al.*, 1994a; Vuister *et al.*, 1994). Two-dimensional ^1H - ^{13}C correlation measurements optimized for the aromatic region established the unknown assignments.

Stereospecific assignment of the prochiral methyl groups of Val and Leu residues was achieved using the fractionally labeled sample (Neri *et al.*, 1989; Senn *et al.*, 1989). In the 2D CT-HSQC experiment with the constant-time delay set to 29 ms the sign of a cross-peak depends on the number of directly coupled carbon nuclei (-1 for an even number of neighbors, $+1$ for an odd number). Due to the biosynthetic pathway, the pro-R methyl groups (γ^1 and δ^1 for Val and Leu) are always coupled to another ^{13}C nucleus leading to a negative sign of the associated cross-peak (Hiroaki *et al.*, 1996).

Stereospecific assignment for prochiral C^{H}_2 groups was deduced from the combination of HNHB (Archer *et al.*, 1991; Bax *et al.*, 1994b) and HN(CO)HB experiments (Grzesiek *et al.*, 1992; Bax *et al.*, 1994b). Additionally, the "floating chirality" feature of X-PLOR was used in such cases where the program found consistently for all calculated structures the same stereochemical assignment (Nilges, 1995).

NOE values were determined by comparing the intensity of ^{15}N polarization transferred from ^{15}N to $^1\text{H}^{\text{N}}$ in the presence (I_{sat}) and absence (I_{eq}) of ^1H saturation according to the equation:

$$\text{NOE} = 1 + \eta = I_{\text{sat}}/I_{\text{eq}}$$

The measured NOE values were corrected for incomplete ^1H T_1 recovery as described (Grzesiek & Bax, 1993a).

Input to the structure calculations

Distance restraints

NOE data were obtained from several multi-dimensional experiments applied to various samples: sample 1, 3D ^{15}N HSQC-NOESY (Grzesiek & Bax, 1993c); sample 2, 3D ^{13}C NOESY (both constant-time and non-constant time version) and 4D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ NOESY (Ikura *et al.*, 1990; Vuister *et al.*, 1993a); sample 3, 4D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ NOESY (Kay *et al.*, 1990); sample 4, 2D ^{12}C -filtered NOESY and 3D ^{13}C -edited, ^{12}C -filtered NOESY (Vuister *et al.*, 1994). NOE intensities were translated into distances using a r^{-5} dependence (Güntert *et al.*, 1991; Senn & Klaus, 1993). An internal calibration was applied to the different NOESY spectra using common distances within regions of well-defined secondary structures or within the amino acids as reference distances. For example, the distance between H^{N} of residue i and $i+1$ in helical regions is found to be 2.9 Å. For a disulfide bridge the distances were restrained between 1.9 and 2.1 Å between sulfur atoms, and between 2.9 and 3.1 Å for the distance between C^{β} of one cysteine residue and S^{γ} of the other residue. Hydrogen-bond restraints were set to 4.0 Å and 2.0 Å for the upper and lower bounds (from C^{γ} to N) and 2.7 Å and 1.6 Å (from O to H^{N}). Only structurally useful intra-residue NOEs were included in the inter-proton distance restraints as were NOEs between protons separated by more than three bonds.

NOE cross-peaks were assigned to inter-proton distances in several rounds. Initially, only distance restraints

resulting from unambiguously classified signals were incorporated into the structure calculations. The resulting low-resolution conformations were used to resolve ambiguous cross-peaks based on the criterion that the putative NOE assignment should correspond to NMR-observable distances (shorter than 5.0 Å for proton-proton NOEs, shorter than 6.0 Å for proton-methyl group NOEs and shorter than 7.5 Å for methyl-methyl NOEs). These newly assigned restraints were used in the next round of structure calculations to improve the resolution and allowed the unique identification of a more extensive set of cross-peaks.

J-coupling constants

Six experiments were performed for the measurement of the various coupling constants. From the HNHA experiment homonuclear $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constants were extracted from the ratio of the diagonal-peak intensity to cross-peak intensity for a given residue in a 3D spectrum as described (Vuister & Bax, 1993). The combination of the HNHB and HN(CO)HB experiments provided the stereospecific assignment of H^{β} methylene protons and the rotameric state of the C^{α} - C^{β} bond (χ^1 angle). The size of the coupling constant was estimated in a qualitative manner based on the presence or absence of the expected cross peaks in the 3D spectra which is sufficient to classify the conformation of the atoms involved as being "trans" or "gauche". For Thr, Ile and Val, the two-dimensional spin-echo difference CT-HSQC experiments (^{15}N) COSY or (^{13}C) COSY provided an accurate measurement of the three bond coupling constant between the backbone atoms N or C^{γ} and the γ -methyl groups allowing to calculate $^3J_{\text{CN}}$ or $^3J_{\text{CC}}$ (Vuister *et al.*, 1993b; Grzesiek *et al.*, 1993b). The 3D LRCC experiment measures the coupling constants $^3J_{\text{C}\alpha\text{-C}\beta}$ of Leu and Ile residues reflecting the rotameric state of the χ^2 angle (Bax *et al.*, 1992, 1994c). Here, the ratio of the integrated peak-volumes of the correlations of the δ -methyl groups to the long-range coupled α -carbon atom depends on the size of the intervening coupling constant $^3J_{\text{C}\alpha\text{-C}\delta}$.

Dihedral restraints

For those regions of the protein where a helical conformation was evident as judged from the NMR data ($\text{H}/^2\text{H}$ -exchange, HNHA-experiment, secondary structure NOEs), the backbone angles ϕ and ψ were set to match the mean values of -65.3° and -39.4° . Angular restraints for the dihedral angles χ^1 and χ^2 of the side-chains of the amino acids were centered at -67.0° (*gauche* plus), 184.0° (*trans*), 64.0° (*gauche* minus) for χ^1 , and 177.5° (*trans*) for χ^2 where appropriate. Generally, all values were given an allowed deviation of $\pm 25^\circ$. The mean values are chosen to match the stereochemical parameters as they are used in the PROCHECK/PROCHECK-NMR suite of programs (Laskowski *et al.*, 1993, 1996).

Calculation of the three-dimensional structure

The simulated annealing protocol of X-PLOR, version 3.1 (Brünger, 1992) was used to calculate the three-dimensional structure of the protein. The target function to be optimized comprised energy terms that govern the covalent geometry (bond lengths, bond angles, dihedral angles, planarity, chirality), a repulsive term to prevent

atoms from overlapping, and experimentally derived structural restraints. The starting structures were obtained from a template structure with an extended conformation and ideal geometry. In a first phase, the template structure was randomized by assigning arbitrary values to the backbone angles ϕ and ψ of all residues. An all-atom representation of the protein was generated and used to search for those conformations that satisfy best the structural restraints. A "soft" repulsive van der Waals energy term with reduced weights replaced the standard Lennard-Jones energy term for describing the non-bonded interactions among the atoms. A simple two-atom representation of the amino acids was used for computing these interactions, whereas the full-atom model was used with the other energy terms. Five cycles of simulated annealing of a duration of 15 ps each were performed at a temperature of 2000 K. The force constants for the distance restraints and for the repulsive van der Waals term which were initially low were doubled at consecutive rounds while all other weight factors were kept constant. In the second phase, the system was cooled from 2000 to 1000 K and the energy force constants were brought to their final values. The repulsive energy term was now evaluated for all atoms of the molecule, and its force constant was increased in a stepwise manner from a low start value to the final value of 4.0 kcal/(mol Å⁴). Concomitantly, the van der Waals radii of the atoms were reduced from 90% to 78% of their original value. In the third phase, the system was cooled to 50 K, and two energy minimizations of the structure completed the calculation scheme. The first minimization used the same parameters as the annealing protocol, while the second one employed the full van der Waals radii which prevented to a large extent the occurrence of "bad contacts", i.e. a situation where two atoms are too close in space. The final conformations were assessed for their stereochemical quality using the PROCHECK-NMR suite of programs (Laskowski *et al.*, 1996) and visualized using the in-house molecular modelling package MOLOC (Müller *et al.*, 1988; Gerber & Müller, 1995).

Sequence alignments

Protein sequences of IFN- α and IFN- β species were retrieved from the Swiss-Prot databank (version 34, release 10/96). The compilation of IFN- α sequences contains 12 human, eight murine, eight bovine, four equine sequences, and one each from rat, pig, and cat. The IFN- β sequences comprise three bovine sequences, and one each from human, rat, mouse and horse. The ClustalW multiple sequence alignment (Thompson *et al.*, 1994) as implemented in the GCG program package (version 9.0) was used for aligning the sequences. Coordinates have been deposited with the Protein Data Bank under ID code 1itf (r1itfmr for the NMR restraints entry).

Acknowledgments

We thank U. Ettlin and E. Hochuli for providing the clone of Roferon-A, A. Bax and S. Grzesiek are greatly acknowledged for their help in setting up the NMR experiments, F. Delaglio for the program nmPipe, D. Garrett for the program PIPP, A. Ross for assisting in the T_1 and T_2 measurements, C. Broger for help with the sequence alignments, and M. Nilges for his support

regarding the application of XPLOR. We also thank Y. Mitsui and T. Senda for making available the refined full-atom model of their X-ray structure of murine interferon- β .

References

- Archer, S. J., Ikura, M., Torchia, D. A. & Bax, A. (1991). An alternative 3D NMR technique for correlating backbone ¹⁵N with side chain H^β resonance in larger proteins. *J. Magn. Reson.* **95**, 636–641.
- Bax, A., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1990). ¹H-¹H correlation via isotropic mixing of ¹³C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning ¹H and ¹³C spectra of ¹³C-enriched proteins. *J. Magn. Reson.* **88**, 425–431.
- Bax, A., Max, D. & Zax, D. (1992). Measurement of long-range ¹³C-¹³C *J* couplings in a 20 kDa protein-peptide complex. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6923–6925.
- Bax, A., Grzesiek, D., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1994a). Isotope-filtered 2D HOHAHA spectroscopy of a peptide-protein complex using heteronuclear Hartmann-Hahn dephasing. *J. Magn. Reson. ser. A*, **106**, 269–273.
- Bax, A., Vuister, G. W., Grzesiek, S., Delaglio, F., Wang, A. C., Tschudin, R. & Zhu, G. (1994b). Measurement of homo- and heteronuclear *J* couplings from quantitative *J* correlation. *Methods Enzymol.* **239**, 79–105.
- Bax, A., Delaglio, F., Grzesiek, S. & Vuister, G. W. (1994c). Resonance assignment of methionine methyl groups and χ^3 angular information from long-range proton-carbon and carbon-carbon *J* correlation in a calmodulin-peptide complex. *J. Biomol. NMR*, **4**, 787–797.
- Borden, E. C. (1992). Interferons—expanding therapeutic roles. *N. Engl. J. Med.* **326**, 1491–1493.
- Brünger, A. T. (1992). *X-PLOR. A system for X-ray crystallography and NMR*. Yale University Press, New Haven.
- Carson, M. (1991). Ribbons 2.0. *J. Appl. Crystallog.* **24**, 958–961.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. & Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR*, **6**, 277–293.
- de Vos, A. M., Ultsch, M. & Kossiakoff, A. A. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*, **255**, 306–312.
- Evinger, M., Rubinstein, M. & Pestka, S. (1981). Antiproliferative and antiviral activities of human leukocyte interferons. *Arch. Biochim. Biophys.* **210**, 319–329.
- Fish, E. N. (1992). Definition of receptor binding domains in interferon- α . *J. Interferon Res.* **12**, 257–266.
- Garrett, D. S., Powers, R., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1991). A common sense approach to peak picking in two-, three- and four-dimensional spectra using automatic computer analysis of contour diagrams. *J. Magn. Reson.* **95**, 214–220.
- Gerber, P. R. & Müller, K. (1987). Superimposing several sets of atomic coordinates. *Acta Crystallog. sect. A*, **43**, 426–428.
- Gerber, P. R. & Müller, K. (1995). MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **9**, 251–268.

- Grzesiek, S. & Bax, A. (1992a). Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *J. Magn. Reson.* **96**, 432–440.
- Grzesiek, S. & Bax, A. (1992b). An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. *J. Magn. Reson.* **99**, 201–207.
- Grzesiek, S. & Bax, A. (1992c). Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6291–6293.
- Grzesiek, S. & Bax, A. (1993a). The importance of not saturating H₂O in protein NMR. Application to sensitivity enhancement and NOE measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12593–12594.
- Grzesiek, S. & Bax, A. (1993b). Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched proteins. *J. Biomol. NMR*, **3**, 185–204.
- Grzesiek, S. & Bax, A. (1993c). Measurement of amide proton exchange rates and NOEs with water in ¹³C/¹⁵N-enriched calcineurin B. *J. Biomol. NMR*, **3**, 627–638.
- Grzesiek, S., Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M. & Bax, A. (1992). A 3D triple-resonance NMR technique for quantitative measurement of carbonyl-H¹J couplings in isotopically enriched proteins. *J. Magn. Reson.* **96**, 215–221.
- Grzesiek, S., Anglister, J. & Bax, A. (1993a). Correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonances in ¹³C/¹⁵N-enriched proteins by isotropic mixing of ¹³C magnetization. *J. Magn. Reson. ser. B*, **101**, 114–119.
- Grzesiek, S., Vuister, G. W. & Bax, A. (1993b). A simple and sensitive experiment for measurement of J_{CC} couplings between backbone carbonyl and methyl carbons in isotopically enriched proteins. *J. Biomol. NMR*, **3**, 487–493.
- Güntert, P., Braun, W. & Wüthrich, K. (1991). Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA, and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J. Mol. Biol.* **217**, 517–530.
- Hiroaki, H., Klaus, W. & Senn, H. (1996). Determination of the solution structure of the SH3 domain of human p56 Lck tyrosine kinase. *J. Biomol. NMR*, **8**, 105–122.
- Hochuli, E. (1986). Large-scale recovery of interferon α -2a synthesized in bacteria. *Chimia*, **40**, 408–412.
- Ikura, M., Kay, L. E., Tschudin, R. & Bax, A. (1990). Three dimensional NOESY-HMQC spectroscopy of a ¹³C-labeled protein. *J. Magn. Reson.* **86**, 204–209.
- Isaacs, A. & Lindenmann, J. (1957). Virus interference I: the interferon. *Proc. Roy. Soc. ser. B*, **147**, 258–267.
- Kabsch, W. & Sander, Ch. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577–2637.
- Kay, L. E., Clore, G. M., Bax, A. & Gronenborn, A. M. (1990). Four-dimensional heteronuclear triple-resonance NMR spectroscopy of interleukin-1 β in solution. *Science*, **249**, 411–414.
- Laskowski, R. A., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* **231**, 1049–1067.
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR*, **8**, 477–486.
- Lewis, P. N., Momany, F. A. & Scheraga, H. A. (1973). Chain reversals in proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **303**, 211–229.
- Mitsui, Y., Senda, T., Shimazu, T., Matsuda, S. & Utsumi, J. (1993). Structural, functional and evolutionary implications of the three-dimensional crystal structure of murine interferon- β . *Pharmac. Ther.* **58**, 93–132.
- Mott, H. R. & Campbell, I. D. (1995). Four-helix bundle growth factors and their receptors: protein-protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 114–121.
- Müller, K., Ammann, H. J., Doran, D. M., Gerber, P. R., Gubernator, K. & Schrepfer, G. (1988). Complex heterocyclic structures: a challenge for computer-assisted molecular modelling. *Com. Soc. Chim. Belg.* **97**, 655–667.
- Neri, D., Szyperski, T., Otting, G., Senn, H. & Wüthrich, K. (1989). Stereospecific nuclear magnetic resonance assignments of the methyl groups of valine and leucine in the DNA-binding domain of the 434 repressor by biosynthetically directed fractional ¹³C labeling. *Biochemistry*, **28**, 7510–7516.
- Nilges, M. (1995). Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. *J. Mol. Biol.* **245**, 645–660.
- Nilges, M., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1988). Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms. Circumventing problems associated with folding. *FEBS Letters*, **239**, 129–136.
- Novick, D., Cohen, B. & Rubinstein, M. (1994). The human interferon α/β receptor: characterization and molecular cloning. *Cell*, **77**, 391–400.
- Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K. C. & Samuel, C. E. (1987). Interferons and their action. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 727–777.
- Presnell, S. R. & Cohen, F. E. (1989). Topological distribution of four- α -helix bundles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 6592–6596.
- Radhakrishnan, R., Walter, L. J., Hruza, A., Reichert, P., Trotta, P. P., Nagabhushan, T. L. & Walter, M. R. (1996). Zinc mediated dimer of human interferon- α_{2b} revealed by X-ray crystallography. *Structure*, **4**, 1453–1463.
- Rozwarski, D. A., Gronenborn, A. M., Clore, G. M., Bazan, J. F., Bohm, A., Wlodawer, A., Hatada, M. & Karplus, P. A. (1994). Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure*, **2**, 159–173.
- Seng, G. C. & Lengyel, P. (1992). The interferon system. *J. Biol. Chem.* **267**, 5017–5020.
- Senda, T., Shimazu, T., Matsuda, S., Kawano, G., Shimizu, H., Nakamura, K. T. & Mitsui, Y. (1992). Three-dimensional crystal structure of recombinant murine interferon- β . *EMBO J.* **11**, 3193–3201.
- Senda, T., Saitoh, S. & Mitsui, Y. (1995). Refined crystal structure of recombinant murine interferon- β at 2.15 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **253**, 187–207.
- Senn, H. & Klaus, W. (1993). The nuclear magnetic resonance solution structure of flaviridin, an antagonist of the platelet gpIIb-IIIa receptor. *J. Mol. Biol.* **232**, 907–925.
- Senn, H., Werner, B., Messerle, B. A., Weber, C., Traber, R. & Wüthrich, K. (1989). Stereospecific assignment of the methyl ¹H NMR lines of valine and leucine

- in polypeptides by nonrandom ^{13}C labelling. *FEBS Letters*, **249**, 113–118.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673–4680.
- Uzé, G., Lutfalla, G. & Gresser, I. (1990). Genetic transfer of a functional human interferon α receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell*, **60**, 225–234.
- Uzé, G., Di Marco S., Mouchel-Vielh, E., Monneron, D., Bandu, M.-T., Horisberger, M. A., Dorques, A., Lutfalla, G. & Mogensen, K. E. (1994). Domains of interaction between alpha interferon and its receptor components. *J. Mol. Biol.* **243**, 245–257.
- Vuister, G. W. & Bax, A. (1992). Resolution enhancement and spectral editing of uniformly ^{13}C -enriched proteins by homonuclear broadband ^{13}C decoupling. *J. Magn. Reson.* **98**, 428–435.
- Vuister, G. W. & Bax, A. (1993). Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond J ($\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\text{P}}$) coupling constants in ^{15}N -enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7772–7777.
- Vuister, G. W., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Powers, R., Garrett, D. S., Tschudin, R. & Bax, A. (1993a). Increased resolution and improved spectral quality in four-dimensional $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -separated HMQC-NOESY-HMQC spectra using pulsed field gradients. *J. Magn. Reson. ser. B*, **101**, 210–213.
- Vuister, G. W., Wang, A. & Bax, A. (1993b). Measurement of three-bond nitrogen-carbon J couplings in proteins uniformly enriched in ^{15}N and ^{13}C . *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 5334–5335.
- Vuister, G. W., Kim, S.-J., Wu, C. & Bax, A. (1994). 2D and 3D NMR study of phenylalanine residues in proteins by reverse isotopic labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9206–9210.
- Waine, G. J., Tymms, M. J., Brandt, E. R., Cheetham, B. F. & Linnane, A. W. (1992). Structure–function study of the region encompassing residues 26–40 of human interferon- α 4: identification of residues important for antiviral and antiproliferative activities. *J. Interferon Res.* **12**, 43–48.
- Walter, M. R., Windsor, W. T., Nagabhushan, T. L., Lundell, D. J., Lunn, C. A., Zauodny, P. J. & Narula, S. K. (1995). Crystal structure of a complex between interferon- γ and its soluble high-affinity receptor. *Nature*, **376**, 230–235.
- Wells, J. A. (1994). Structural and functional basis for hormone binding and receptor oligomerization. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**, 163–173.

Edited by P. E. Wright

(Received 24 April 1997; received in revised form 3 September 1997; accepted 8 September 1997)