

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

Bogotá D.C. - Colombia
Avda. 22 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

Miembros ACPI – ASIPI – AIPPI

Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

Abogados Consultores – Marcas y Patentes

**SEÑOR
SUPERINTEDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-062159- -00001-0000

Fecha: 2007-09-26 16:47:47 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 81

Ref.: Expediente No.: 07-062.159

Patente de Invención:

UNA MUTEÍNA RECOMBINANTE DEL INTERFERÓN ALFA HUMANO GLICOSILADO, 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.

Solicitante: PROTECH PHARMA S.A.

Domicilio: Santa Fe - Argentina

Atentamente se dirige a usted **JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**, Abogado, mayor y vecino de Bogotá D.C., e identificado como aparece al pie de mi firma, para manifestarle lo siguiente:

Como apoderado de la sociedad PROTECH PHARMA S.A., domiciliada en Santa Fe - Argentina, el pasado 20 de junio de 2007 presenté a su Digno Despacho la solicitud a registro de la Patente de Invención mencionada antes en la referencia.

Debido a lo anteriormente expuesto, me permito adjuntar:

- a) Fotocopia autenticada del Poder debidamente legalizado, el cual me otorga el Señor RUBÉN ROQUE ROMANO, quien en su calidad de Representante Legal y Apoderado de la sociedad PROTECH PHARMA S.A., me faculta para todo trámite de Propiedad Industrial, incluyendo la facultad para solicitar el registro de Patentes.

El citado poder se encuentra legalizado por:

Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

Abogados Consultores – Marcas y Patentes

- La Doctora MONICA G. BARBIER, Escribana Pública Titular del registro No. 614, quien certifica que la firma que antecede y dice RUBÉN ROQUE ROMANO es auténtica, que el firmante es Apoderado (Representante Legal) de la sociedad PROTECH PHARMA S.A., que tiene facultad para otorgar este poder y que dicha compañía existe y está debidamente organizada de conformidad con las Leyes de la República de Argentina.

Dicha legalización cuenta con el Sello correspondiente del Colegio de Escribanos de la Provincia de Santa Fe en la República de Argentina (Legalización No. 112362).

Asimismo, se puede encontrar un sello del Colegio de Escribanos de la Provincia de Santa Fe – República de Argentina, la cual cuenta con el sello correspondiente que se denomina APOSTILLA, cuya legalización corresponde al número 119728.

- El Artículo 65 del Código del Procedimiento Civil, establece que cuando quien otorga el poder fuere una sociedad, si el Cónsul que lo autentica o ante quien se otorga, hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad y que quien lo confiere es su representante, se tendrán por establecidas estas circunstancias.
- Por el Doctor OVIDIO M. LÓPEZ, Legalizador 1º Circunscripción de Santa Fe – República de Argentina, el cual legaliza la firma de la Doctora MONICA G. BARBIER, reconociendo en ella las facultades que posee como Escribana en la República de Argentina.

Dicha legalización cuenta con el correspondiente sello del Colegio de Escribanos de la Provincia de Santa Fe – República de Argentina.

- Por Apostilla, firmado por la Doctora FABIANA ALICIA BORDILE – quien en representación del Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto en la República de Argentina, legaliza la firma del Doctor OVIDIO M. LÓPEZ, y reconoce en él las facultades de Legalizador del Colegio de Escribanos de la Provincia de Santa Fe en la República de Argentina.

- b) Fotocopia autenticada del Documento de Cesión en el cual el Señor RICARDO AGUSTÍN LÓPEZ (Cedente), cede todos los derechos de la Patente de invención mencionada en la referencia a la sociedad PROTECH PHARMA S.A. (Cesionaria).

Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

Abogados Consultores – Marcas y Patentes

Dicho documento se encuentra debidamente firmado por las partes que intervienen en la presente cesión.

El anterior documento cuenta con la siguiente legalización:

- Por la Doctora MÓNICA G. BARBIER, Escribana Pública Titular del registro No. 614, quien legaliza las firmas que corresponden, tanto a la parte Cedente, como a la parte Cesionaria de dicha patente.

Dicha legalización cuenta con el Sello correspondiente del Colegio de Escribanos de la Provincia de Santa Fe en la República de Argentina (Legalización No. 112360).

Asimismo, se puede encontrar un sello del Colegio de Escribanos de la Provincia de Santa Fe – República de Argentina, la cual cuenta con el sello correspondiente que se denomina APOSTILLA, cuya legalización corresponde al número 119728.

- Por el Doctor OVIDIO M. LÓPEZ, Legalizador 1º Circunscripción de Santa Fe – República de Argentina, el cual legaliza la firma de la Doctora MONICA G. BARBIER, reconociendo en ella las facultades que posee como Escribana en la República de Argentina.

Dicha legalización cuenta con el correspondiente sello del Colegio de Escribanos de la Provincia de Santa Fe – República de Argentina.

- Por Apostilla, firmado por la Doctora FABIANA ALICIA BORDILE – quien en representación del Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto en la República de Argentina, legaliza la firma del Doctor OVIDIO M. LÓPEZ, y reconoce en él las facultades de Legalizador del Colegio de Escribanos de la Provincia de Santa Fe en la República de Argentina.

- c) Fotocopia autenticada del Certificado de Depósito (Documento de Prioridad) de la Patente de Invención que se menciona en la referencia, el cual se encuentra debidamente sellado y firmado por el Doctor EDUARDO ARIAS (Comisario). Dicha Patente fue presentada ante el Ministerio de Economía y Producción –Secretaría de Industria, Comercio y de la pequeña y mediana empresa- del Instituto Nacional de la Propiedad Industrial en la República de Argentina (Oficina de Registros de Marcas).

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

Bogotá D.C. - Colombia
Avda. 22 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

Miembros ACPI – ASIPI - AIPPI

Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

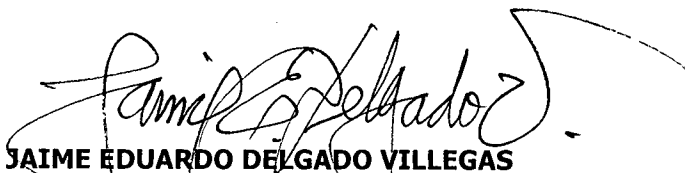
Abogados Consultores – Marcas y Patentes

Este documento corresponde al registro de la Patente de Invención denominada "UNA MUTEÍNA RECOMBINANTE DEL INTERFERÓN ALFA HUMANO GLICOSILADO, 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."

El número correspondiente a la prioridad, o sea, al registro de esta Patente en Argentina, corresponde al número **P060102627**.

Debido a la presentación de la documentación antes mencionada, solicito a su Digno Despacho continuar con el trámite normal de registro de la Patente de Invención que se menciona en la referencia, y la cual pertenece a la sociedad PROTECH PHARMA S.A. de Santa Fe - Argentina.

Atentamente,



JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

C.C. No. 19'270.955 de Bogotá

T.P. No. 43.308 del Consejo Superior de la Judicatura

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

Colegio de Escribanos
de la Prov. de Santa Fe
APOSTILLA

Sello de Legalización

Serie "A" No 119728

Abogados Consultores - Marcas y Patentes

Fecha: 26 JUL 2007

The Undersigned Rubén R. Romano, Citizen of Argentina, residing in Santa Fe, Santa Fe, Argentine Republic, in my position of legal Representative of the company PROTECH PHARMA SA with headquarters in Lisandro de la Torre 3124, Depto 2, Santa Fe, CP 3000, Argentine, which was initially incorporated at Registro Público de Comercio de Santa Fe, Country Argentine, grant ample an sufficient power of attorney to: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS and/or CLEMENCIA DELGADO VILLEGAS, attorneys, adults, residing in Bogotá (Colombia), so that on our behalf and representation, carry out before your office all types of errands an especial procedures for the registration and renewal of all kinds of Product and Service trademarks, deposits of name and commercial logotype, industrial models and drawings, invention patents, utility models, Integrated circuits, using licenses, name of domain, Copyrights, plant varieties, agricultural, veterinary and sanitary registries, capacity certificates, renewal, modification, change of name, change of address, transfer, assignment and expansions, answering sanctionatories and enclose evidence, being empowered to present and withdraw objections, to present appeals, to request testimonies, to receive documents, to pay legal fees, to approve exploitations, to agree on transactions on trademark agreements with third parties of legal entities, to abandon action, to substitute, waiving to rights, to file cancellation actions for not using, for notoriety and/or genericity, to begin concerning proceedings before the customs administration for adopting the frontier steps to the protection of our industrial and intellectual property rights and to substitute the mentioned matters; to do denouncements and establish themselves as victims within the penal processes that arise by violation of our industrial and intellectual property rights and to substitute them; to attend all proceedings in connection to industrial and intellectual property or concerning matters as general attorneys before SUPERINTENDENCE OF INDUSTRY AND COMMERCE, INVIMA, ICA, DIAN or competent authorities in Columbia and to world-wide level, being able to substitute the mentioned matters, and in the event that such procedures shall be transferred unto a judicial field, the legal representatives are authorized to act as plaintiff or defendant before the competent authorities, in all kind of errands like: nullity actions, nullity and re-establishment of right actions, forbidding process for use of trademarks, name and commercial logotype, unlawful competition, without this enunciation is limitative, having an ample power to settle, to submit to arbitration, to waive, to present appeals or appeals and re-establishment of the right, all other necessary special faculties.

For that purpose, I kindly request to gran ample powers to our attorneys, who shall be able to exercise the functions independently or collectively. The present power of attorney revokes and cancels any other previous powers of attorney given by the Company in the territory of the Colombian Republic.

I also approve the actions made by our empowered until today.

Sincerely,

ID Card No. issued in

Please, submit to a public deed by public notary
Notarial Certificate:

The undersigned Notary Public certifies that the preceding signature reading is authentic: that the signer is attorney of PROTECH PHARMA SA and that he is duly empowered to grant this power, and that said Company exists and is duly organized according with the laws of Argentine Republic.

All the foregoing facts are know to the Notary due to his having examined the respective documents to wich he, the Notary, attests.

Granted and signed, at Santa Fe, Argentine Republic on 19th June 2007.

Testado: 19th June 2007. No VALE

Notary Public. 25th July 2007. VALE.-

This Power of Attorney should be authenticated by a public Notary Public and legalized by Apostilla.



Bogotá D.C. - Colombia
Avda. 22 Park Way No. 37 - 31 Of. 202

Tels: (571) 2444096 - 3690624
Fax: (571) 2444064 No. 6207
E-mail: mde@mdelaw.com

DE LA PCIA. DE SANTA FE

Miembros ADEL, ASPI, AIPPI

26 JUL 2007

LEGALIZACION No 12362

Atentamente se dirige a Usted Rubén R. Romano, Ciudadano argentino mayor y vecino de la ciudad de Santa Fe, Santa Fe, República Argentina para manifestarle que en mi condición de Representante legal de la firma PROTECH PHARMA SA domiciliada en Lisandro de la Torre 3124, Santa Fe, CP 3000, Argentina, y constituida inicialmente en el Registro Público de Comercio de la Provincia de Santa Fe, Argentina confiero poder general, amplio y suficiente a los Dres. JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS, y/o CLEMENCIA DELGADO VILLEGAS, Abogados, mayores y vecinos de Bogotá, D.C. (Colombia), para que en nuestro nombre y representación adelanten ante Ustedes toda clase de diligencias y procedimientos especiales para el Registro y Renovación en su Despacho, de toda clase de Marcas de Producto y Servicio, Lemas Comerciales, Depósitos de Nombre y Enseña Comercial, Diseños Industriales y Patentes de Invención, Patentes modelo de Utilidad, Esquemas de Circuitos integrados, licencias de uso, Nombres de dominio, Derechos de Autor, Variedades vegetales, registros agrícolas, veterinarios y sanitarios, certificados de capacidad, renovación, modificación, cambio de nombre, cambio de domicilio, traspaso y ampliación de los mismos, contestación de sancionatorios y presentación de pruebas dentro de los mismos, quedando facultados para presentar y retirar Oposiciones, interponer recursos, solicitar testimonios, recibir documentos, cancelar costos legales, probar explotaciones, aceptar transacciones, llegar a acuerdos marcarios con terceras personas o entidades jurídicas, conciliar, desistir, sustituir, renunciar derechos, presentar acciones de cancelación por no uso, por notoriedad y/o genericidad, iniciar trámites pertinentes ante la Administración aduanera con el objeto de adoptar las medidas de frontera tendientes a la protección de nuestros derechos de Propiedad Industrial o intelectual y sustituir dichos tramites; denunciar y constituirse en víctima dentro de los procesos penales que surjan con ocasión de la violación de cualquiera de nuestros derechos de Propiedad Industrial e Intelectual y sustituir dichos procesos, y atiendan como Apoderados generales todo asunto referente a Propiedad Industrial e intelectual o asunto pertinente, ante la SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, INVIMA, ICA, DIAN o autoridades competentes en Colombia, pudiendo sustituir dichos asuntos, y en caso de que el procedimiento debiera pasar a conocimiento judicial, quedan facultados para actuar en nombre del poderdante ante los Jueces que sean competentes, en toda clase de procesos como pueden ser: acciones de nulidad, acciones de nulidad y restablecimiento del derecho, procesos de prohibición de uso de marca, nombre o enseña, competencia desleal, sin que dicha enunciación sea limitativa, con poder amplio, pudiendo transar, someter a árbitros, sustituir, desistir, interponer recursos y con todas las demás facultades especiales que fueren necesarias.

Con éste objeto, ruego le confieran personería suficiente a nuestros Apoderados quienes podrán obrar en forma conjunta o independiente.

El presente poder revoca y cancela cuantos poderes se hubieren otorgado por esta compañía con anterioridad a esta fecha en el territorio de la República de Colombia.

Ratifico lo actual hasta el momento por nuestros apoderados. Atentamente,

Certificación Notarial:

El infrascrito Notario Público certifica que la firma que antecede y dice es la de **BERNARDO OYUELA COPABAN**, quien es Apoderado de PROTECH PHARMA SA, que tiene facultad para otorgar este poder y que dicha compañía existe y está debidamente organizada de conformidad con las Leyes de la República Argentina.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

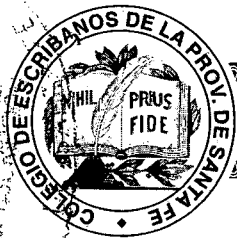
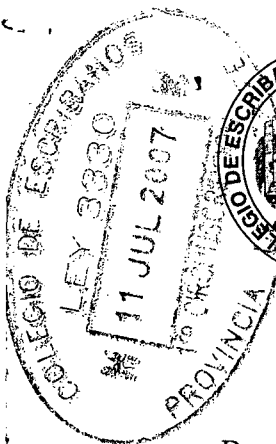
Dado y firmado en Santa Fe, República Argentina, 19 de junio de 2007.

Notario Público.

Testado: 19 de junio de 2007. No Vale.-
Entradas: 25 de julio de 2007. Vale.-

Autenticarlo ante Notario con el lleno de la Certificación Notarial y referendarlo por Apostilla.

FOJA DE CERTIFICACION D 00707573:



CERTIFICACION DE FIRMAS

(Ley 6898 Art. 12 y Decreto 1612/95 Art. 10)

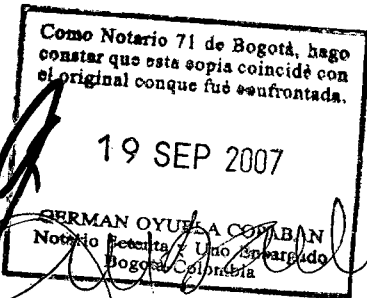
D 00707573

En la ciudad de Santa Fe, a 25 de Julio de 2007

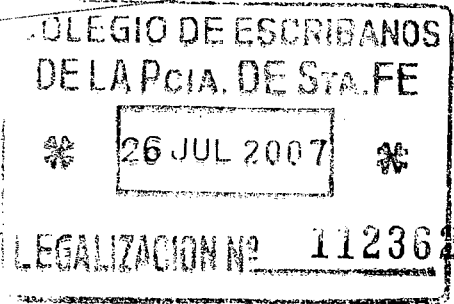
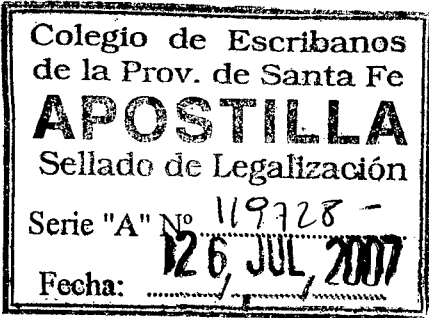
De conformidad con el requerimiento obrante en el Acta número 176, labrada en la fecha, al folio 178 del Registro de Intervenciones N° 614, del que soy TITULAR, en mi carácter de ESCRIBANO PUBLICO, en uso de las atribuciones que me confieren las Leyes y Reglamentaciones vigentes.

CERTIFICO

Que la/s firma/s que obra/n en el documento anexo, cuyo/s folio/s firmo y sello, ha/n sido puesta/s en la fecha y en mi presencia por RUBEN ROQUE ROMANO, Documento Nacional de Identidad N°21.426.965, quien comparece en Nombre y Representación de la Sociedad "PROTECH PHARMA S.A.", CUIT. N°30-70902181-4, domiciliada legalmente en calle Lisandro de la Torre N°3142, Planta Baja, Departamento 2 de ésta Ciudad de Santa Fe, lo que acredita con la siguiente documentación: a) Acta Constitutiva de celebrada por instrumento privado en fecha 26 de Mayo de 2004, inscripto en el Registro Público de Comercio de la Provincia de Santa Fe, bajo el N°718, al F°121 del L°10 de Estatutos de Sociedades Anónimas el 19 de Noviembre de 2004; y b) Carta Poder de fecha 14 de Junio de 2007.-



112362



GRAFICA LATINA S.R.L.

S#F



LEGALIZACION

D.G.R. Res. 857/77
PAGO REPOSICION FISCAL por
DECLARACION JURADA
D.G.R. Res. 39/79
Exp. 105.043 - C - 79



EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA PROVINCIA DE SANTA FE,

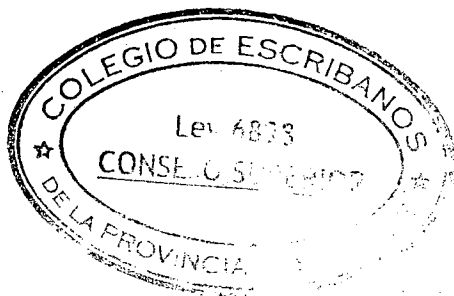
República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la Ley 6898 y Decreto 1612/95, legaliza la firma y el sello del Escribano

don **BARBIER, MONICA GRACIELA**

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el número **00112362** Serie D.

La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.

SANTA FE, 26 de Julio de 2007



Esc. OVIDIO M. LOPEZ
Legalizador 1ª Circunscripción

Como Notario 71 de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con el original conque fué confrontada.

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA COPABAN
Notario Setenta y Uno Ensayado
Bogotá-Colombia

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00119728

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por Ovidio M. Lopez

3. Quien actúa en calidad de Legalizador

4. Lleva el sello / timbre de Colegio de Escribanos de la Provincia de Santa Fe

5. En Santa Fe

6. El día 26 de julio de 2007

7. Por el COLEGIO DE ESCRIBANOS de Santa Fe en representación del

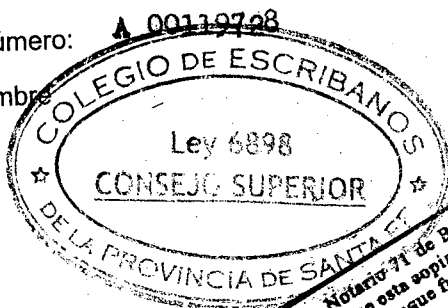
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: A 00119728

9. Sello / Timbre

10. Firma



FABIANA ALICIA BORLLE
VOCAL SUPLENTE

Como Notario 71 de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con el original conque fué enfrontada.

18 SEP 2007

to act as plaintiff or defendant before the competent authorities in all kind of errands like: nullity actions, nullity and revocation of right actions, forbidding process for use of trademarks, commercial logotype, unlawful competition, without this being limitative, having an ample power to settle, to submit to arbitration, to waive, to present appeals or appeals and re-establishment of all other necessary special faculties.

For the above, I kindly request to grant ample powers to our attorneys, to be able to exercise the functions independently or collectively, to have power of attorney revokes and cancels any other previous power of attorney given by the Company in the territory of the Republic.

For the actions made by our empowered until today

issued in

to a public deed by public notary

ificate:

Notary Public certifies that the preceding signature

is authentic: that

of PROTECH PHARMA SA and that he is empowered by power of attorney that said Company exists and is duly organized in the laws of Argentine Republic.

Being facts are known to the Notary due to his having examined the respective documents to which he, the Notary, is attached, signed, at Santa Fe, Argentine Republic on 19th June 2007.

Testado: 19th June 2007. No VALE
25th July 2007. VALE.-

DE INDUSTRIA Y COMERCIO, INVIENDA, ICA, DIANA, autoridades competentes en Colombia, pudiendo sustituir dichos asuntos, y en caso de que el procedimiento debiera pasar a conocimiento de la autoridad, quedan facultados para actuar en nombre del poderante, ante los jueces que sean competentes, en toda clase de procesos que puedan ser: acciones de nulidad, acciones de nulidad y restablecimiento del derecho, procesos de prohibición de uso de marca, nombres o enseña, competencia desleal, sin que dicha enunciación sea limitativa, con poder amplio, pudiendo transar, someter a árbitros, sustituir, desistir, interponer recursos y con todas las demás facultades especiales que fueren necesarias.

Con éste objeto, ruego le confieran personería suficiente a nuestros Apoderados quienes podrán obrar en forma conjunta o independiente. El presente poder revoca y cancela cuantos poderes se hubieren otorgado por la Compañía con anterioridad a esta fecha en el territorio de la República de Colombia.

Ratifico lo actuado hasta el momento por nuestros apoderados. Atentamente,

C.C.

Certificación Notarial:

El infrascrito Notario Público certifica que la firma que antecede y dice

es auténtica: que el firmante es Apoderado de PROTECH PHARMA SA, que tiene facultad para otorgar este poder y que dicha compañía existe y está debidamente organizada de conformidad con las Leyes de la República Argentina.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en Santa Fe, República Argentina, 19 de junio de 2007.

Notario Público.

Testado: 19 de junio de 2007. No Vale.-

Entre líneas: 25 de julio de 2007. Vale.-

of Attorney should be authenticated with the Notary Public and legalized by Apostille.



autenticarlo ante Notario con el lleno de la Certificación Notarial y referendarlo por Apostilla.

FOJA DE CERTIFICACION D 00707573:

ASSIGNMENT BY THIS AGREEMENT	CESIÓN POR EL PRESENTE CONTRATO
Assignor (assignor's name)	Cedente: RICARDO AGUSTÍN LÓPEZ (nombre del cedente)
addressed at (assignor's address)	C.C. No.
	domiciliado en (dirección del cedente)
	Camarones 1664, Capital Federal, CP 1416, Argentina

assign (s) sell (s) and transfer (s) in whole ownership and
dominion to:
Assignee
(assignee's name)

cede (n), vende (n) y transfiere (n) en toda propiedad y
dominio a
Cesionario: PROTECH PHARMA S.A.
(nombre del cesionario)

addressed at
(assignee's address)

Domiciliado en: SANTA FE – ARGENTINA
(dirección del cesionario)
Lisandro de la Torre 3124, 3000 Santa Fe – Argentina.

all the rights, titles and interests on the following
industrial property rights:

todos los derechos, títulos e intereses correspondientes a
los siguientes privilegios de propiedad industrial:

(list of patents, trademarks or applications thereof, to be
assigned)

Patente de Invención: "UNA MUTEÍNA RECOMBINANTE DEL
INTERFERÓN ALFA HUMANO GLICOSILADO, 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 PAR PURIFICAR DICHA
MUTEÍNA, UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE DICHA
MUTEÍNA, EL USO DE DICHA MUTEÍNA PARA ELABORAR UN
MEDICAMENTO".
Expediente No.: 07 – 062.159

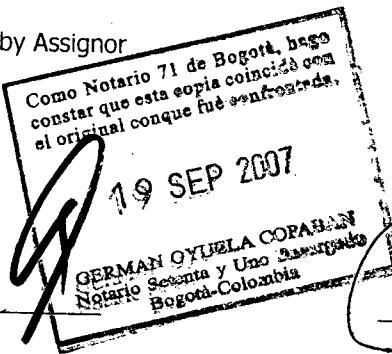
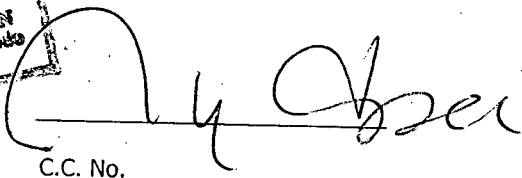
The price of this transfer is the amount of:
(consideration or price of the assignment)

El precio de esta transferencia es la cantidad de:

Freely fixed by the parties and already received by the
assignor.

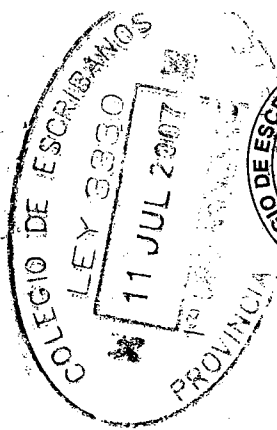
Libremente fijado por las partes y ya recibido por la parte
cedente.

Date and place of execution by Assignor
on the date of:
in the City of:

 C.C. No. _____ Signature of the Assignor (Firma del cedente)		 C.C. No. _____ Signature of the Assignee (Firma del cesionario)
---	---	---

FOJA DE CERTIFICACION D 00707577:





CERTIFICACION DE FIRMAS
(Ley 6898 Art. 12 y Decreto 1612/95 Art. 10)

D 00707577

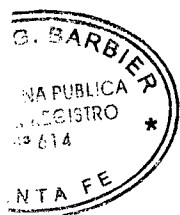
En la ciudad de Santa Fe, a 25 de Julio de 2007

De conformidad con el requerimiento obrante en el Acta número 177, labrada en la fecha, al folio 179 del Registro de Intervenciones N° 614, del que soy **TITULAR**, en mi carácter de **ESCRIBANO PUBLICO**, en uso de las atribuciones que me confieren las Leyes y Reglamentaciones vigentes.

CERTIFICO

Que la/s firma/s que obra/n en el documento anexo, cuyo/s folio/s firmo y sello, ha/n sido puesta/s en la fecha y en mi presencia por **RICARDO AGUSTIN LOPEZ**, Documento Nacional de Identidad N°12.159.274, por una parte; y **CARLOS JOSÉ DUPETIT**, Documento Nacional de Identidad N°18.214.719, y **RUBEN IGNACIO ZURBRIGGEN**, Documento Nacional de Identidad N°16.128.080, por la otra, manifestando los señores Carlos José Dupetit y Rubén Ignacio Zurbriggen que comparecen en Nombre y Representación de la Sociedad "PROTECH PHARMA S.A.", CUIT N°30-70902181-4, domiciliada legalmente en calle Lisandro de la Torre N° 3142, Planta Baja, Departamento 2 de ésta Ciudad de Santa Fe lo que acreditan con el Acta Constitutiva celebrada por instrumento privado en fecha 26 de Mayo de 2004, inscripta en el Registro Público de Comercio de la Provincia de Santa Fe, bajo el N°718, al F°121 del L°10 de Estatutos de Sociedades Anónimas el 19 de Noviembre de 2004. —

112360



Como Notario 71 de Bogota, he
constatado que esta copia coincide con
el original porque fue autógrafo.
19 SEP 2007
GERMAN O'NEALA
Notario Secundo y Uco
Bogota, Colombia



[Handwritten signature]

Colegio de Escribanos
de la Prov. de Santa Fe
APOSTILLA
Sellado de Legalización
Serie "A" N° 119726-
Fecha: 26 JUL 2007

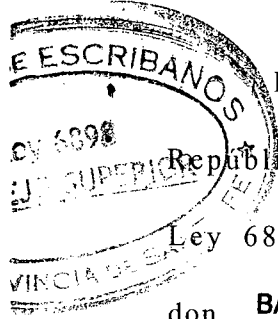
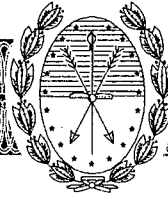
COLEGIO DE ESCRIBANOS
DE LA PCIA. DE STA. FE
26 JUL 2007
LEGALIZACION N° 112360

GRUPA LATINA S.R.L.



LEGALIZACION

D.G.R. Res. 857/77
PAGO REPOSICIÓN FISCAL por
DECLARACIÓN JURADA
D.G.R. Res. 39/79
Exp. 105.043 - C - 79



EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA PROVINCIA DE SANTA FE,

República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la

Ley 6898 y Decreto 1612/95, legaliza la firma y el sello del Escribano

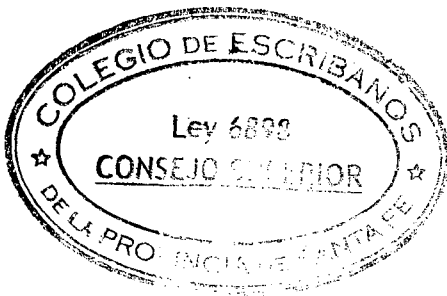
don **BARBIER, MONICA GRACIELA**

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha

bajo el número **00112360** Serie D.

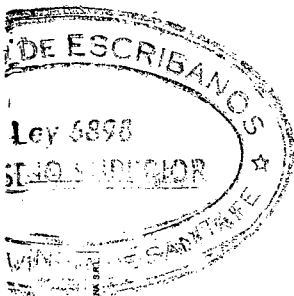
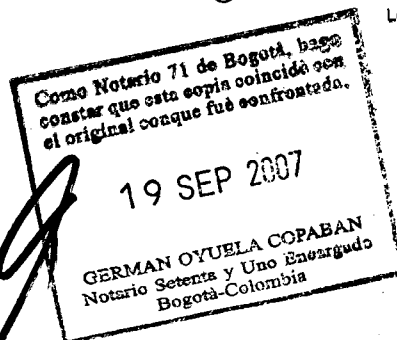
La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.

SANTA FE, **26 de Julio de 2007**



[Handwritten signature]

Esc. OVIDIO M. LOPEZ
Legalizador 1ª Circunscripción



1 2

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00119726

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por **Ovidio M. Lopez**

3. Quien actúa en calidad de **Legalizador**

4. Lleva el sello / timbre de **Colegio de Escribanos de la Provincia de Santa Fe**

5. En **Santa Fe**

6. El día **26 de Julio de 2007**

7. Por **el** COLEGIO DE ESCRIBANOS **de Santa Fe en representación del**

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: **A 00119726**

9. Sello / Timbre

10. Firma

FABIANA ALICIA BORLLE
VOCAL SUPLENTE

Como Notario 71 de Bogotá, hago
constar que esta copia coincide con
el original conque fue confrontada.

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA COPABAN
Notario Setenta y Uno Encomendado
Bogotá-Colombia



13

REPÚBLICA ARGENTINA
PODER EJECUTIVO NACIONAL
MINISTERIO de ECONOMÍA y PRODUCCIÓN
SECRETARÍA de INDUSTRIA, COMERCIO y de la PEQUEÑA y MEDIANA EMPRESA
INSTITUTO NACIONAL de la PROPIEDAD INDUSTRIAL

CERTIFICADO DE
DEPÓSITO

COPIA OFICIAL CONVENIO DE PARIS - LISBOA 1958 -
ACTA N° P 20060102627

LA ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES, CERTIFICA QUE CON FECHA 20 DE JUNIO DE 2006 SE PRESENTÓ A NOMBRE DE PROTECH PHARMA S.A.; CON DOMICILIO LEGAL EN PASAJE MAIPU 3136, SANTA FE, REPUBLICA ARGENTINA (AR).

UNA SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION RELATIVA A: UNA MUTEINA RECOMBINANTE DEL INTERFERON ALFA HUMANO GLICOSILADO, UN GEN QUE CODIFICA PAR ADICHA 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 UNMEDICAMENTO

CUYA DESCRIPCION Y DIBUJOS ADJUNTOS SON COPIA FIEL DE LA DOCUMENTACION DEPOSITADA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

SE CERTIFICA QUE LO ANEXADO A CONTINUACION EN 68 FOJAS ES COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE LA ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES DE LA REPUBLICA ARGENTINA DE LOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PRECEDENTEMENTE IDENTIFICADA.

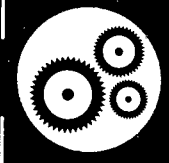
A PEDIDO DEL SOLICITANTE, EXPIDO LA PRESENTE CONSTANCIA DE DEPOSITO EN BUENOS AIRES, REPUBLICA ARGENTINA, A LOS 22 DIAS DEL MES DE MAYO DE 2007.



DR. EDUARDO ARIAS
COMISARIO
ADMINISTRACION NACIONAL DE PATENTES



INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
ARGENTINA



Patentes de Invención
Modelos de Utilidad



Marcas



Modelos y Diseños
Industriales



Transferencia de
Tecnología



Información
Tecnológica

54

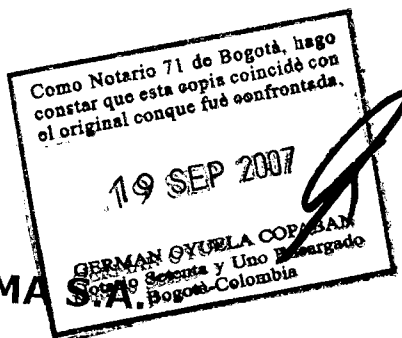
PATENTE DE INVENCION

SOBRE



UNA MUTEÍNA RECOMBINANTE DEL INTERFERÓN ALFA HUMANO GLICOSILADO, UN GEN QUE CODIFICA PARA DICHA MUTEÍNA, UN MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE DICHO GEN, UN MÉTODO PARA OBTENER UNA CÉLULA EUCARIOTA PRODUCTORA DE DICHA MUTEINA, UN MÉTODO PARA PRODUCIR DICHA MUTEINA, UN PROCEDIMIENTO PARA PURIFICAR DICHA MUTEINA, UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE DICHA MUTEINA, EL USO DE DICHA MUTEINA PARA ELABORAR UN MEDICAMENTO

DURACIÓN: 20 AÑOS



SOLICITANTE: PROTECH PHARMA

DOMICILIO: LISANDRO DE LA TORRE 3124 - DPTO. 2

AGENTE: Romano & Grabois-Francia 2800-(3000) Santa Fe-0342-4811009

MEMORIA DESCRIPTIVA



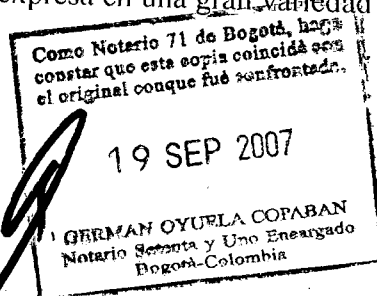
CAMPO DE LA INVENCION

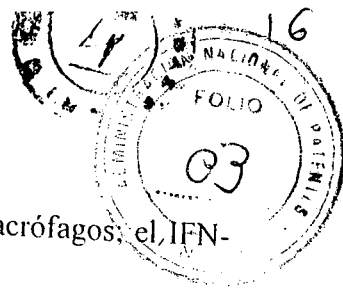
La presente invención pertenece al campo de la biología molecular relacionada con el desarrollo de proteínas recombinantes. En particular está relacionada con muteínas recombinantes del interferón alfa humano con propiedades farmacológicas, químicas y físicas mejoradas; procedimientos para obtener dichas 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



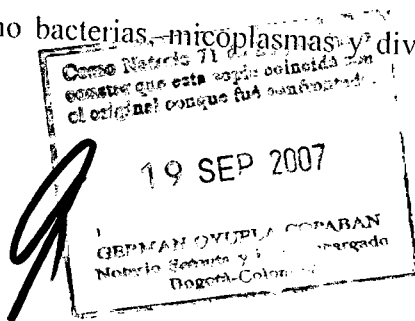


concentración. El IFN-alfa se expresa principalmente en linfocitos B y macrófagos; el IFN-beta en fibroblastos y el IFN-gamma en linfocitos T.

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. 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





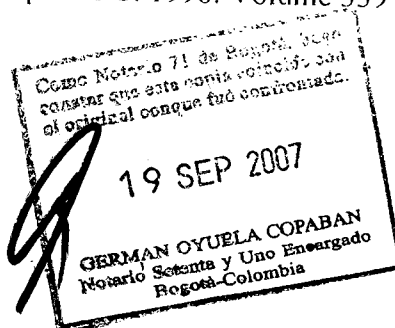
lipopolisacáridos de la membrana de bacterias gram-negativas y la presencia de polímeros sintéticos (Merigan T: Induction of circulating interferón by synthetic anionic plymers of known composition. Nature 1967, 214: 416-417).

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).

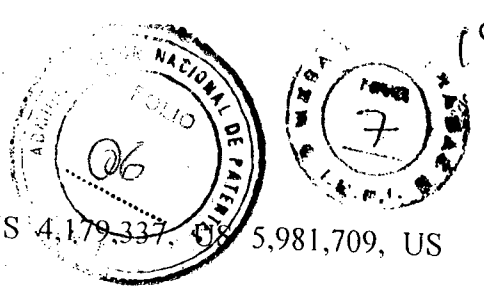




En la actualidad se están desarrollando nuevas estrategias para aumentar la estabilidad *in vivo* de estas proteínas bioactivas mediante reacciones enzimáticas (WO 98/13381, US 6,620,916, US 5,643,564, US 4,184,917), reacciones químicas (WO 96/21468, US 2004/0180054, US 6,524,570, US 4,179,337, US 5,981,709, 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 interferón 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 Bogotá, hago constar que esta copia coincide con el original con que fue confrontada.

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA COPABAN
Notario Setenta y Uno Encomendado
Bogotá-Colombia

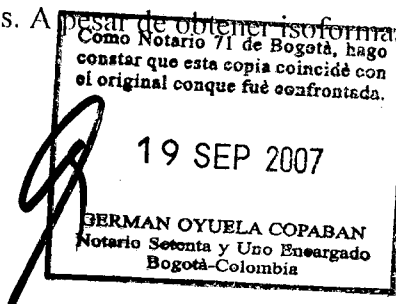


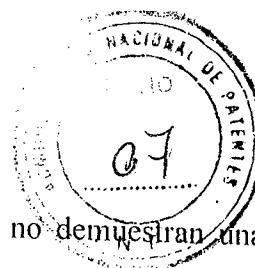
vivo de la proteína. En los documentos de patente US 4,179,337, US 5,981,709, US 20060029573, US 5,738,846, US 6,524,570; los inventores divulgan procesos, composiciones y usos de interferón alfa conjugado con polietilenglicol para aumentar la estabilidad del mismo. Estos métodos implican pasos de purificación 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.

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



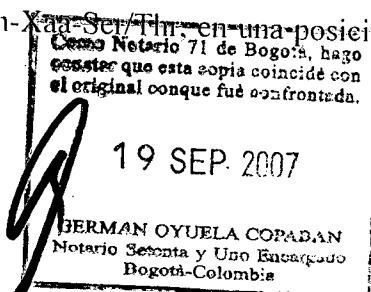


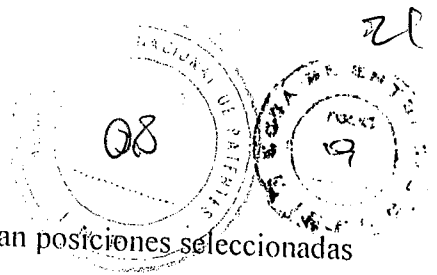
humano tipo I $\alpha 2b$ con nuevos sitios de N-glicosilación, no demuestran una mejora en la estabilidad y/o perfil de liberación en el tiempo, comparable con las isoformas disponibles comercialmente en la actualidad tales como el interferón-pegilado con un Polietilenglicol de 12000 Dalton (PEG 12000). 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.

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. 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



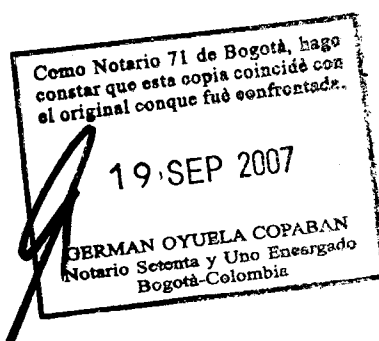


que forma parte de una estructura secundaria tipo alfa hélice, ocupan posiciones seleccionadas del conjunto comprendido por: Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156. Mientras que dichos sitios de N-glicosilación fuera de estructuras 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





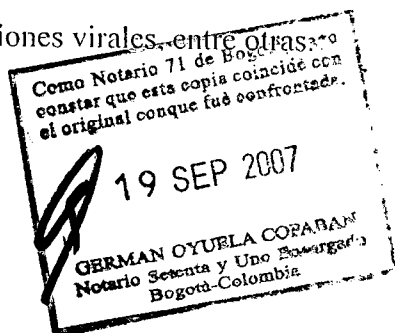
humano de la invención, mediante transformación ó transfección de una línea celular con dicho gen que codifica para dicha muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, inserto en un vector de expresión adecuando, donde, preferentemente la línea celular eucariota es la línea celular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

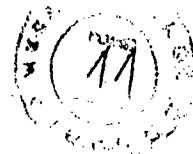
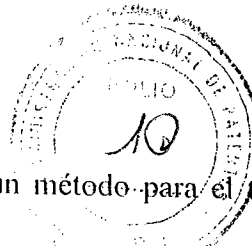
Es otro objeto de la presente invención proveer un método para producir la muteína recombinante del interferón humano de la invención mediante los pasos de: a)- cultivar dicha línea celular eucariota transformada ó transfectada con el vector de expresión que contiene el gen que codifica para la muteína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

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 adecuando 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 LAS FIGURAS

Figura 1: muestra la secuencia nucleotídica y aminoacídica del interferón tipo I alfa 2b natural. La flecha gruesa marca el péptido señal, las flechas delgadas corresponden a los oligonucleótidos sintéticos utilizados para la obtención de un vector de clonado con el gen que codifica para el interferón tipo I alfa 2b natural. Los residuos de aminoácidos y codones encuadrados en marco grueso corresponden a los aminoácidos y nucleótidos que fueron sometidos a mutagénesis sitio dirigida para la obtención de la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención que incluye los sitios de N-glicosilación en las posiciones Pro4, Arg23, Lys70 y Asp77.

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



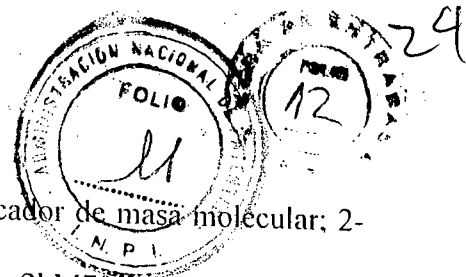


Figura 3: Ensayo de *Western blot*. Calles: 1- Marcador de masa molecular; 2- rhIFN- α 2bM4; 3- rhIFN- α 2bM77; 4- rhIFN- α 2bM23; 5-rhIFN- α 2bM70; 6- rhIFN- α 2b O-glicosilado; 7- rhIFN- α 2b no glicosilado; 8- rhIFN- α 2bM4/23/70/77

Figura 4: N-desglicosilación enzimática de las variantes mutadas de hIFN- α 2b (hIFN- α 2bM23, hIFN- α 2bM47, hIFN- α 2bM70, hIFN- α 2bM95)

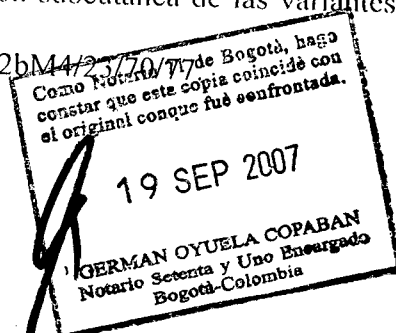
Figura 5: variación porcentual de la N-glicosilación en función del tiempo expresada como porcentaje de la misma con respecto a la cantidad presente al inicio del procedimiento de desglicosilación enzimática

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 inmutafinidad. 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

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.

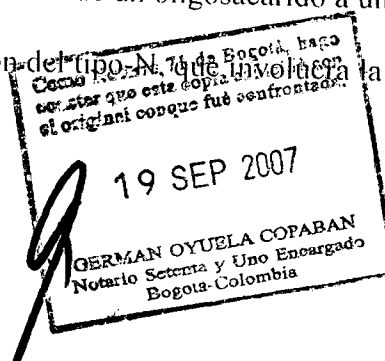
“Sustitución de un aminoácido”, se refiere al cambio de un aminoácido presente en la secuencia primaria del hIFN- α 2b por otro aminoácido.

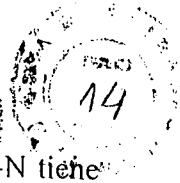
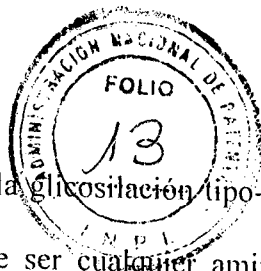
“Muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención”, se refiere a aquellas moléculas recombinantes del interferón alfa humano, preferentemente alfa 2b, con al menos un sitio de glicosilación, preferentemente N-glicosilación, en una posición de su secuencia aminoacídica que forma parte de 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.

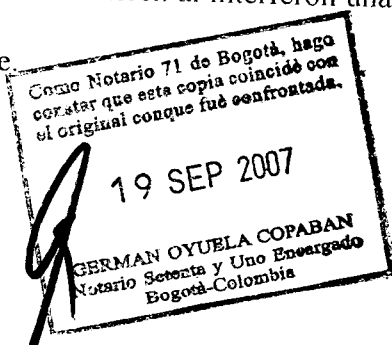
La glicosilación de ciertas proteínas eucariotas tiene lugar en determinadas posiciones del esqueleto polipeptídico, comúnmente existen dos tipos de glicosilación. La glicosilación tipo-O que involucra la unión de un oligosacárido a un grupo -OH de un residuo de Serina o Treonina, y la glicosilación del tipo-N, que involucra la unión de un oligosacárido

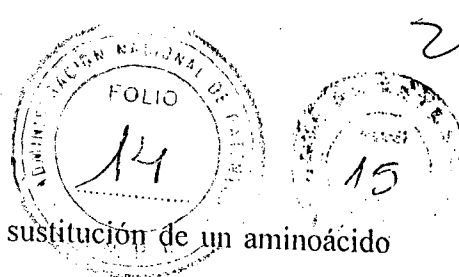




a un grupo -NH de un residuo de Asparagina. Particularmente, la glicosilación tipo-N tiene lugar en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto una Prolina. Todos los oligosacáridos unidos a la proteína mediante unión del tipo-N tienen en común un núcleo pentasacárido 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.



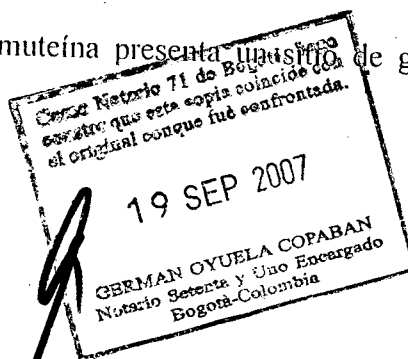


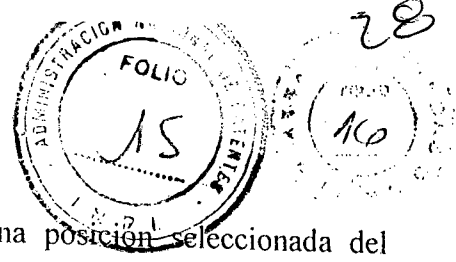
Dichos sitios de N-glicosilación, generados mediante sustitución de un aminoácido que forma parte de una estructura secundaria tipo alfa hélice son seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152,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





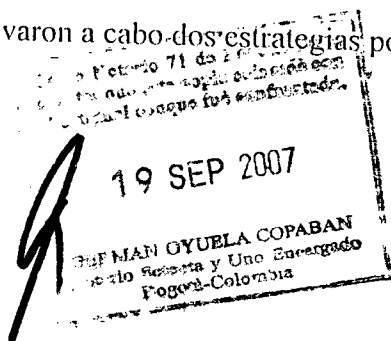
posición Lys70 y además un sitio de N-glicosilación en una posición seleccionada del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Arg23 y Asp77.

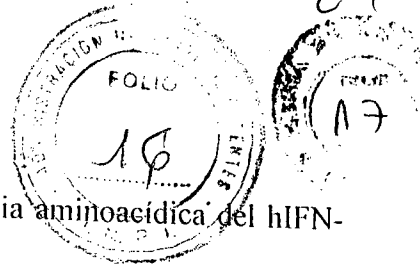
Preferentemente, la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención tiene tres sitios de N-glicosilación seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156, Pro4, 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:





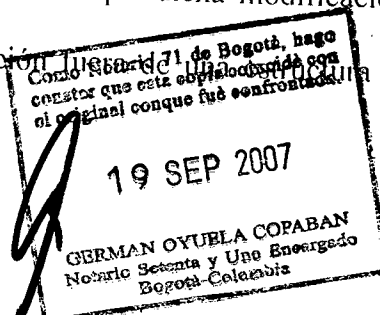
1)- localizar todas las serinas y/o treoninas en la secuencia aminoacídica del hIFN- α 2b y cambiar el aminoácido que ocupa la primera posición de la secuencia consenso por una asparagina.

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 que forma parte de una estructura secundaria alfa hélice,



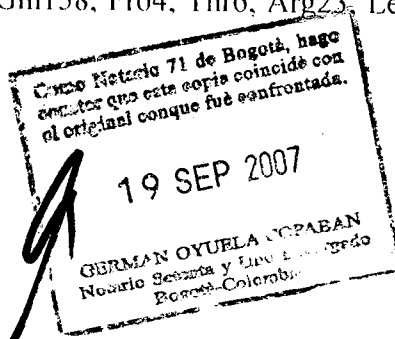


generándose así un sitio de N-glicosilación en una posición fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice. Dichas modificaciones en posiciones fuera de estructuras secundarias tipo alfa hélice se efectúan en posiciones que se seleccionan del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Thr6, Arg23, 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,



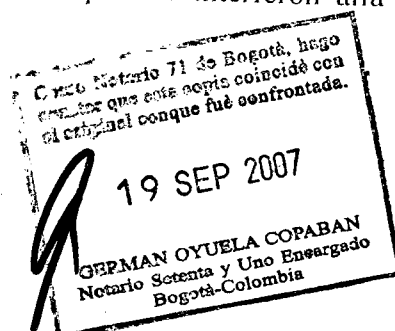
Gly104, Thr106, Lys134, Leu161. Más preferentemente las modificaciones en su secuencia nucleotídica se presentan en el codón que codifica para Lys70 y en dos codones que codifican para los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por Pro4, Arg23 y Asp77.

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.



32
20

b)- Generar las mutaciones necesarias para producir la proteína 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.





21 33

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.

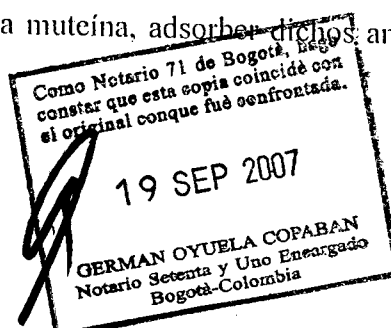
El método para la obtención de una línea celular eucariota derivada productora de la muteína recombinante del interferón alfa humano de la invención, más particularmente una línea celular CHO.K1, transfectada ó transformada con un plásmido de expresión, pCI-neo, el cual presenta dicho gen que codifica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



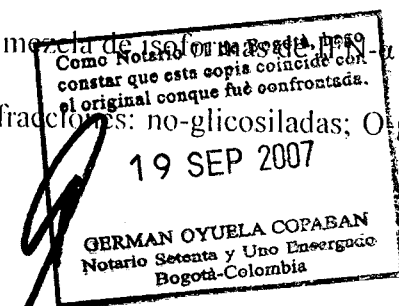
34
22

una columna cromatográfica adecuada y purificar la muteína de la invención por cromatografía de inmunoafinidad.

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 descriptos 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 adecuando 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 diferente masa molecular correspondientes a las siguientes fracciones: no-glicosiladas; O-glicosiladas;

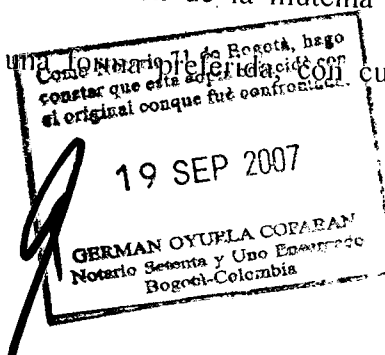


35
23

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-



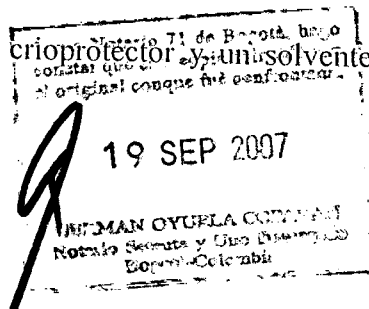
36
24

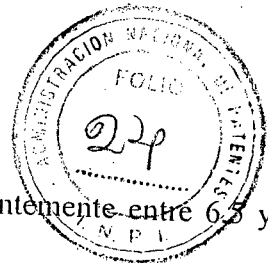
glicosilación (rhIFN- α 2bM4/M23/M70/M77) presenta un perfil de liberación en el tiempo equivalente a la molécula de interferón-PEG 12000 disponible comercialmente, resultando ser un producto con alto grado de N-glicosilación y con un elevado grado de homogeneidad en cuanto al perfil de glicosilación. 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

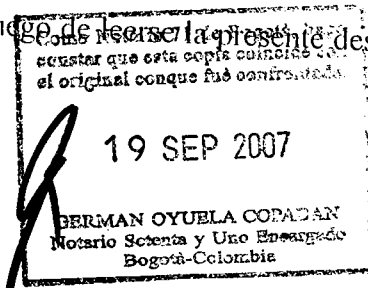


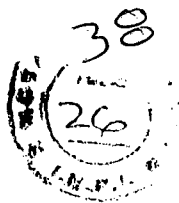
37
25

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- etanediol), entre éstos, más preferentemente el mono-9-octadecenoato poli (oxi-1,2-etanediol), 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 lude 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' <i>EcoRI</i>
IFNalfaR	5' ATAGTCTAGAGTCTTTGAAATGGCAGATCA 3' <i>XbaI</i>

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-α2bwt, 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-α2b. En la Fig. 1 se observa la secuencia nucleotídica

Como Notario 71 de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con el original conque fue confrontada.

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA COPABAN
Notario Setenta y Uno Encargado
Bogotá-Colombia



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. De esta forma y recordando la secuencia consenso buscada (Asn-Xaa-Ser/Thr), se analizaron dos estrategias:

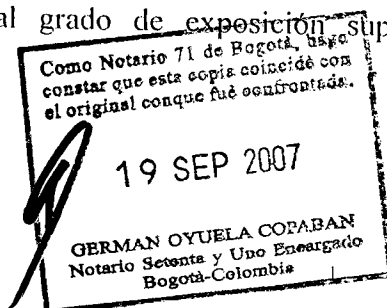
1- Localización de todas las serinas y/o treoninas en la secuencia aminoacídica del hIFN- α 2b natural, tercera posición de la secuencia consenso, y cambio del aminoácido que ocupa la primera posición por asparagina.

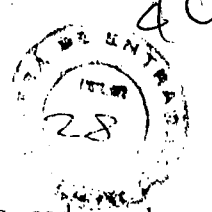
2- Ubicación de todas las asparaginas presentes en la secuencia del hIFN- α 2b natural (primera posición de la secuencia consenso) y mutación del aminoácido en la tercera posición por una serina o treonina.

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

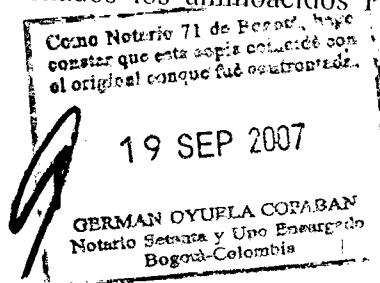
Por otro lado, se analizaron las mutaciones seleccionadas desde el punto de vista de evitar una pérdida de la actividad biológica de la proteína. Este aspecto se estudió teniendo en cuenta dos características:

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,





29

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.

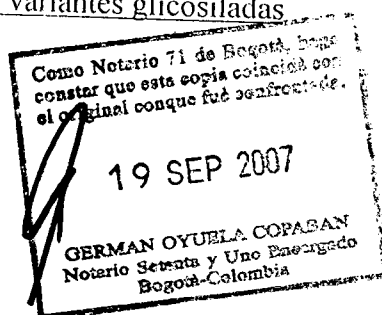
Ejemplo 3: Mutagénesis sitio dirigida y clonado de los genes mutados en vectores de expresión para células eucariotas

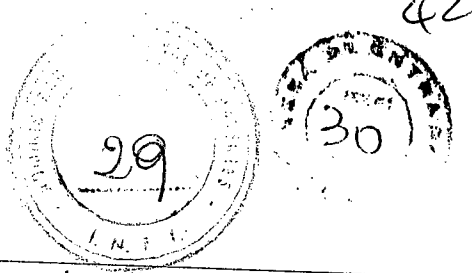
El procedimiento de mutagénesis sitio-dirigida para la introducción de sitios de N-glicosilación en el gen del hIFN- α 2b se realizó mediante técnica de PCR en su variante extensión por solapamiento, la cual consistió básicamente en 2 reacciones de PCR consecutivas. La descripción de la técnica empleada 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



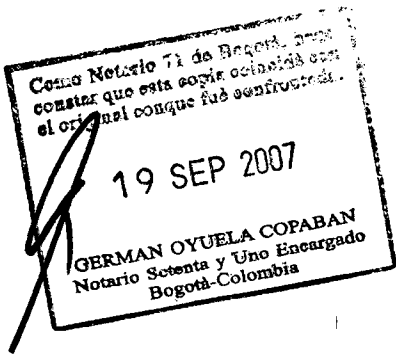


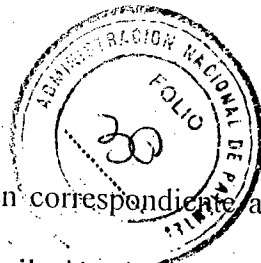
Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica
Mut4a	5' GGGCTGTGATCTGAATCAAACCCACAGCCT 3'
Mut4b	5' AGGCTGTGGGTTTGATTTCAGATCACAGCCC 3'
Mut23a	5' GGCACAGATGAGGAATATCTCTCTTTTCTC 3'
Mut23b	5' GAGAAAAGAGAGATATTCCTCATCTGTGCC 3'
Mut70a	5' CTCTTCAGCACAAATGACTCATCTGCTGCTTGG 3'
Mut70b	5' CCAAGCAGCAGATGAGTCATTTGTGCTGAAGAG 3'
Mut77a	5' CATCTGCTGCTTGGAAATGAGACCCCTCTAGACA 3'
Mut77b	5' TGTCTAGGAGGGTCTCATTCGAAGCAGCAGATG 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)



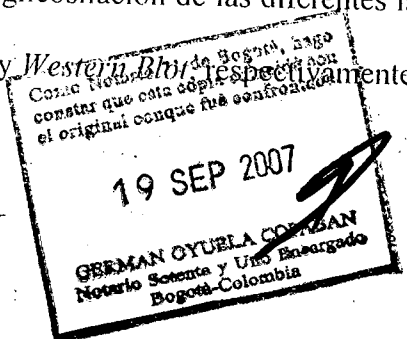


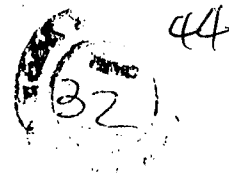
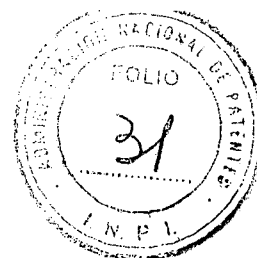
43

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 3.10^5 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 NaHCO₃ 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 µg/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- α 2b glicosilado.

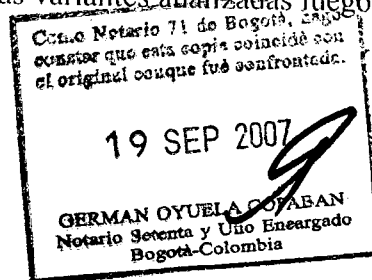
La evaluación de la expresión y grado de glicosilación de las diferentes isoformas se llevó a cabo mediante técnica de ELISA *sandwich* y *Western Blot* respectivamente.





Ejemplo 5: Cuantificación de rhIFN $\alpha 2b$ mediante técnica de ELISA *sandwich*

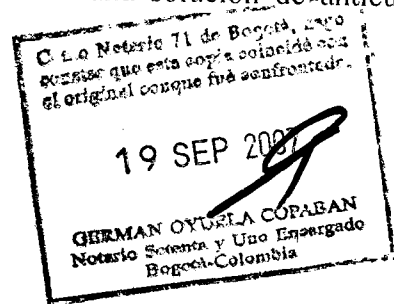
Placas de poliestireno de fondo plano de 96 cavidades fueron sensibilizadas con 100 μ l de una solución de 1 μ g.ml⁻¹ de mAb (100 ng por cavidad) diluido en solución de carbonato/bicarbonato de sodio 50 mM, pH 9,6 (solución de sensibilización). Las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C y durante 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 μ l PBS con el agregado de albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % (P/V). Posteriormente, se adicionaron 100 μ l de diluciones sucesivas al medio de rhIFN- $\alpha 2b$ 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 μ l de una solución de anticuerpos policlonales de conejo anti-rhIFN- $\alpha 2b$ diluidos 1:2.000 con solución diluyente. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se agregaron 100 μ l 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 μ l 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- $\alpha 2b$ recombinante para todas las variantes analizadas luego de 72 horas post-transfección

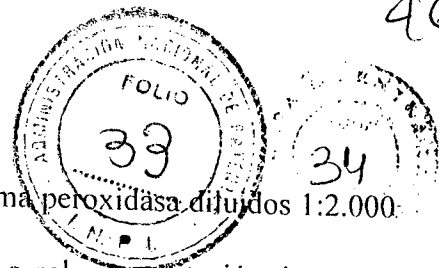




Ejemplo 6: Identificación de las variantes de rhIFN- α 2b mediante técnica de *Western Blot*

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

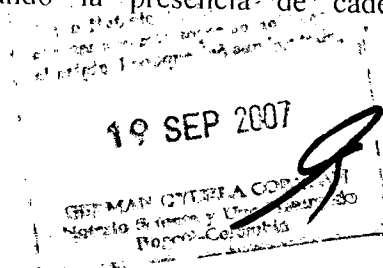


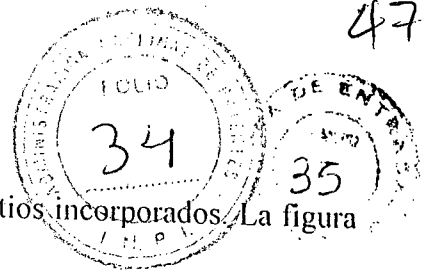


cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa diluidos 1:2.000 en solución diluyente. Todas las incubaciones fueron llevadas a cabo en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió al revelado de la membrana mediante reacción de quimioluminiscencia 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





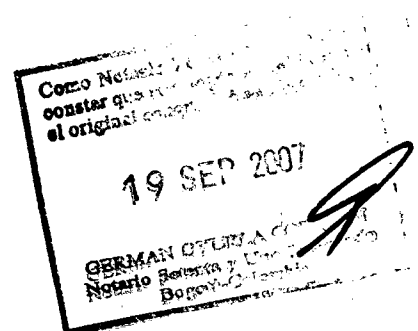
hidrocarbonadas unidas a través de enlace N-glicosídico en los sitios incorporados. La figura 3 ilustra los resultados obtenidos.

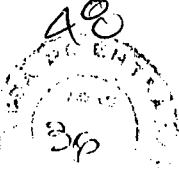
Ejemplo 7: Evaluación de la estabilidad las variantes N-glicosiladas del hIFN- α 2b en las posiciones Arg23, Asn45, Lys70 y Asn93, en presencia de la enzima PNGasa F (N-glicanasa)

Las diferentes moléculas de hIFN- α 2b, individualmente mutadas en las posiciones aminoacídicas Arg23, Leu47, Lys70 y Leu95, de manera de obtener sitios de glicosilación en las posiciones Arg23, Asn45, Lys70 y Asn93, fueron analizadas desde el punto de vista de su estabilidad en presencia de la enzima PNGasa F responsable de la liberación de oligosacáridos unidos por enlace N-glicosídico. 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





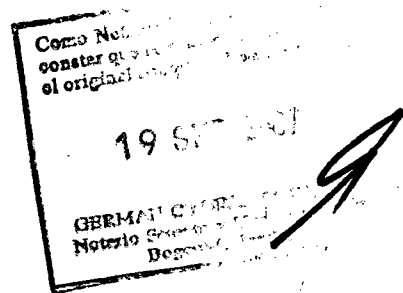
completa eliminación del enlace N-glicosídico luego de 150 minutos de incubación con la enzima, mientras que la mutante IFN- α 2bM47 redujo su grado de N-glicosilación en un 50 % luego de los 30 minutos de tratamiento enzimático. Por otro lado, las mutantes IFN- α 2bM70 y IFN- α 2bM95 conservaron aproximadamente 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 Arg70 y Leu95, en cambio, forman parte de una α -hélice. 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

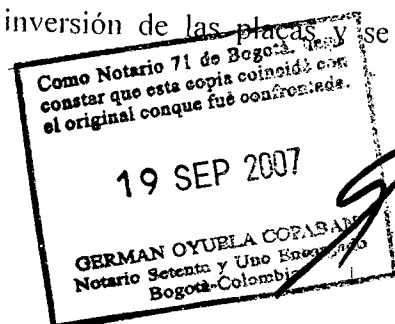
La actividad biológica de las diferentes variantes del hIFN- α 2b fue determinada mediante medición del efecto antiviral de las mismas sobre cultivos de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney, ATCC CCL-22) infectados con el virus de la Estomatitis



49
(37)

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 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ 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 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ 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 CO_2 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 CO_2 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

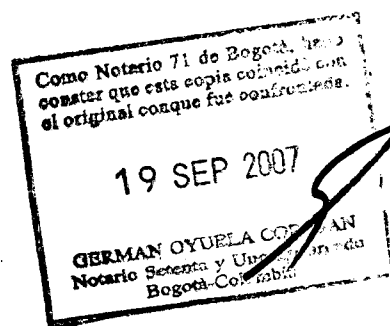


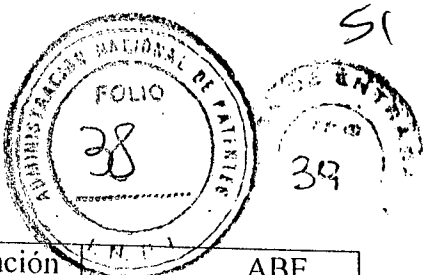


revelado de las mismas empleando 50 μ l de solución de cristal violeta 0.75 % (P/V) en metanol 40 % (V/V). Las placas se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Se eliminó el colorante y las placas fueron lavadas con agua destilada hasta verificar la ausencia de colorante en los lavados. Luego de escurrir las placas, se adicionaron 250 μ l 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 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- α 2b



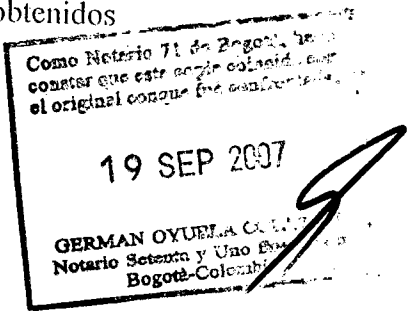


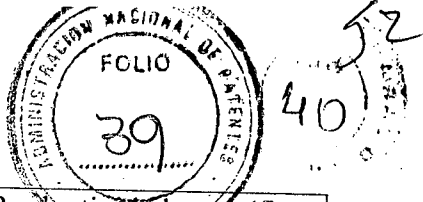
Variante de rhIFN-α2b	Concentración (ng.ml ⁻¹)	ABE (U.ng ⁻¹)
IFN-α2bM4	186	265
IFN-α2bM23	143	287
IFN-α2bM70	221	105
IFN-α2bM77	153	164
IFN-α2bM4/23/70/77	109	26

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 cel ⁻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
	L1A8	19,16
CHO pCI-neo-IFN-α2bM4/23/7077	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

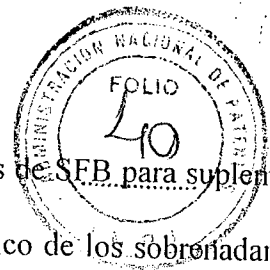
Ejemplo 10: Producción de rhIFN-α2b mutado mediante el cultivo de los clones seleccionados en condiciones de adherencia

En primera instancia, se determinó la productividad específica de rhIFN-α2b durante las diferentes fases del cultivo celular, exhibiendo los clones evaluados, una mayor productividad específica de la citoquina durante la fase estacionaria del cultivo.

Como Notario 71 de Bogotá
constar que esta copia es fiel al original con que fue expedida

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA OCHOA
Notario Setenta y Uno de Bogotá
Bogotá-Colombia

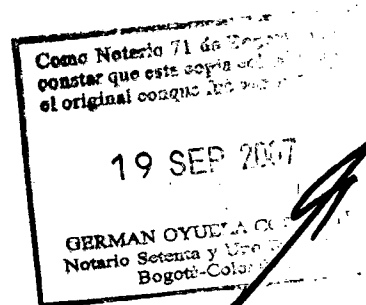


En segundo lugar, se ensayaron diferentes concentraciones de SFB para suplementar el medio de cultivo, con el objeto de disminuir el contenido proteico de los sobrenadantes y facilitar la posterior purificación de la variante del rhIFN- α 2b. Con este fin, los clones se cultivaron empleando medio de 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 2.10^5 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.



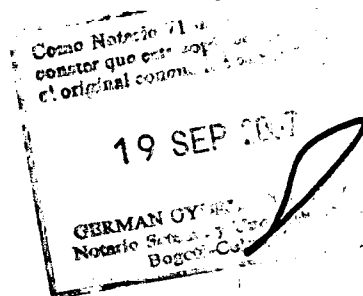
42

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 inmutafinidad, 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- $\alpha 2b$ no glicosilado por ml de gel.

El protocolo de purificación de las muteínas del rhIFN- $\alpha 2b$ 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 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- $\alpha 2b$ fue evaluada empleando tres soluciones diferentes:

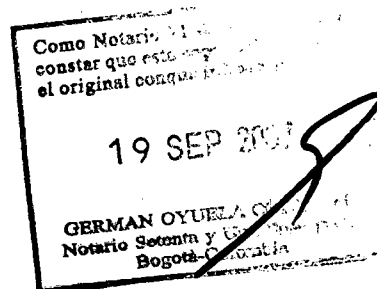
1- solución de NaCl 0,15 M en ácido acético 0,2 M (pH 3,0)

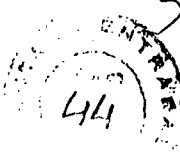
2- solución de glicina 0,1 M (pH 2,5)

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- $\alpha 2b$ 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).



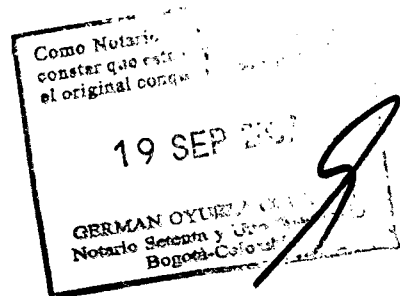


La eficiencia de purificación se estudió mediante la técnica de SDS-PAGE en condiciones reductoras con posterior tinción argéntica y ensayos de *Western blot* (Figura 6). El porcentaje de pureza, estimado por densitometría de bandas, fue del 85 %. Además, los ensayos de *Western blot* demostraron que, 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.

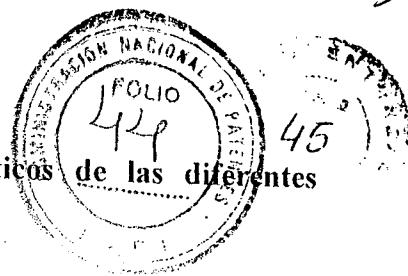
Ejemplo 12- Evaluación de los parámetros farmacocinéticos de las variantes con un único sitio de N-glicosilación denominadas rhIFN- α 2bM23 y rhIFN- α 2bM70 en animales de experimentación empleando la vía de inoculación subcutánea

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 5×10^5 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

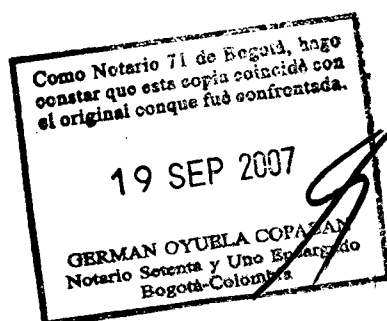


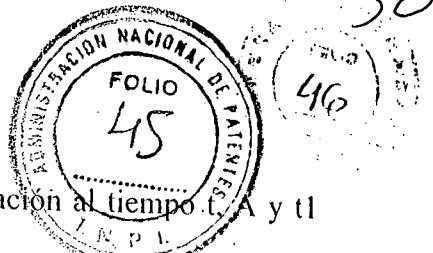
13-a)- Vía de inoculación endovenosa

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 t1) de las moléculas de rhIFN-α2b no-glicosilado e rhIFN-α2bM77 es similar entre sí resultando inferior con respecto al calculado para las variantes rhIFN-α2bM4/23/70/77 y rhIFN-α2b-PEG. Por otro lado, el tiempo de vida media correspondiente a la fase de eliminación fue superior para la variante de rhIFN-α2bM4/23/70/77.

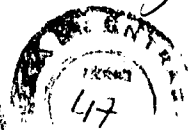
Teniendo en cuenta las variantes no glicosiladas y glicosiladas de IFN, se observó un descenso del *clearance* plasmático a medida que se incrementó el contenido de hidratos de carbono. En el caso particular de la variante rhIFN-α2bM4/23/70/77, se visualizó una reducción en dicho parámetro en una magnitud de 9 veces con respecto a la molécula de rhIFN-α2b no modificada. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el

Como Notario 71 de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con el original conque fué confrontada.

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA CORTESAN
Notario Setenta y Uno, en ejercicio
Bogotá-Colombia

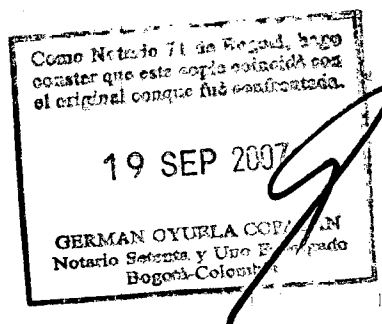
cálculo del *clearance* plasmático correspondiente a las moléculas de rhIFN- α 2b-M4/23/70/77 y rhIFN- α 2b-PEG.



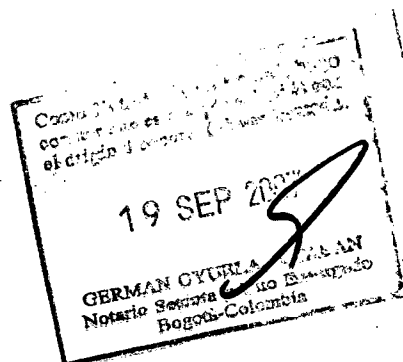
12 b)-Vía de inoculación subcutánea

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.

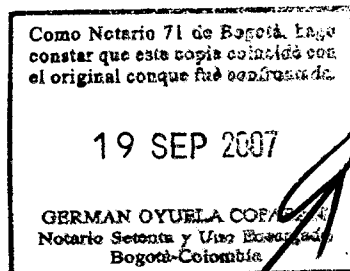


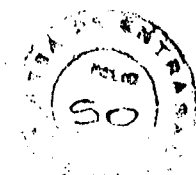
REIVINDICACIONES



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:

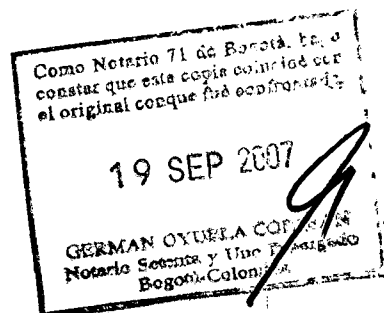
1. Una muteína recombinante del interferón alfa humano con al menos un sitio de glicosilación en una posición de su secuencia aminoacídica caracterizada porque dicha posición forma parte de una estructura secundaria tipo alfa hélice.
2. La muteína recombinante del interferón alfa humano de la reivindicación 1 caracterizada porque dicho sitio de glicosilación es un sitio de N-glicosilación.
3. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 2 caracterizada porque dicho sitio de N-glicosilación se encuentra en una secuencia consenso de glicosilación.
4. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 3 caracterizada porque dicha secuencia consenso es la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr.
5. La muteína recombinante del interferón alfa humano de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque dicho interferón alfa humano es del tipo 2b.
6. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 caracterizada porque dicha posición que forma parte de una estructura secundaria tipo alfa hélice es seleccionada del conjunto de posiciones comprendido por Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156.





62

7. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque además posee al menos un sitio de glicosilación en una posición fuera de una estructura tipo alfa hélice.
8. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 7 caracterizada porque dicho sitio de glicosilación en una posición fuera de una estructura secundaria tipo alfa hélice es seleccionada del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Asn45, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.
9. La muteína recombinante del interferón alfa humano de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque comprende un sitio de N-glicosilación.
10. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 9 caracterizada porque dicho sitio de N-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.
11. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 9 caracterizada porque dicho sitio de N-glicosilación es seleccionado del conjunto comprendido por las posiciones Lys70, Asn93 y Glu113.
12. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 9 caracterizada porque dicho sitio de N-glicosilación es la posición Lys70.
13. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 caracterizada porque comprende dos sitios de N-glicosilación.
14. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 13 caracterizada porque dichos sitios de N-glicosilación son seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71,



63
(51)

Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156, Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Asn45, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.

15. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 13 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.

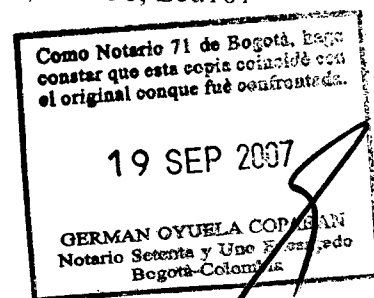
16. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 caracterizada porque comprende tres sitios de N-glicosilación.

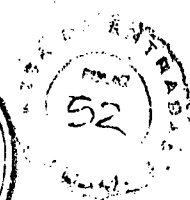
17. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 16 caracterizada porque dichos sitios de N-glicosilación son seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156, Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Asn45, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.

18. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 17 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.

19. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 caracterizada porque comprende cuatro sitios de N-glicosilación.

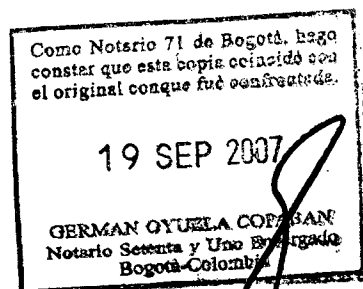
20. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 19 caracterizada porque dichos sitios de N-glicosilación son seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Leu9, Arg12, Asn65, Leu66, Phe67, Lys70, Asp71, Phe84, Asn93, Glu113, Arg125, Met148, Ser150, Ser152, Leu153, Asn156, Pro4, Thr6, Arg23, Leu26, Asn45, Ala50, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.





64

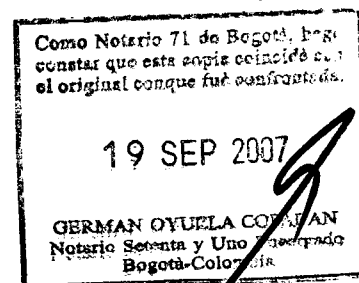
21. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 19 caracterizada porque dichos sitios de N-glicosilación involucran las posiciones Pro4, Arg23, Lys70 y Asp77.
22. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 caracterizada porque comprende cinco sitios de N-glicosilación.
23. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 22 caracterizada porque dichos sitios de N-glicosilación 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.
24. La muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 23 caracterizada porque los sitios de glicosilación son seleccionados del conjunto comprendido por las posiciones Pro4, Arg23, Lys70, Asp77, Asn93 y Glu113.
25. Un gen que codifica para una muteína recombinante del interferón alfa humano caracterizado porque dicho gen comprende al menos una mutación sitio dirigida que genera un sitio de N-glicosilación involucrado en una estructura alfa hélice.
26. El gen de la reivindicación 25 caracterizado porque dicho sitio de N-glicosilación es una secuencia consenso tipo Asn-Xaa-Ser/Thr.
27. El gen de las reivindicaciones 25 y 26 caracterizado porque dicho interferón alfa humano es del tipo 2b.
28. El gen de las reivindicaciones entre 25 y 27 caracterizado porque 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, Gln158.

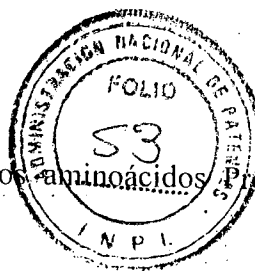




65

29. El gen de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28 caracterizado 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.
30. El gen de la reivindicación 29 caracterizado 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, Ala50, Leu66, Phe67, Asp77, Gly104, Thr106, Lys134, Gln158, Leu161.
31. El gen de acuerdo con las reivindicaciones 25 a 30 caracterizado porque tiene una mutación dirigida.
32. El gen de acuerdo con la reivindicación 31 caracterizado porque dicha mutación 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, Gln158.
33. El gen de las reivindicación 31 caracterizado porque dicha mutación se realiza en el aminoácido de la posición Lys70.
34. El gen de acuerdo con las reivindicaciones 25 a 30 caracterizado porque tiene dos mutaciones sitio dirigida.
35. El gen de acuerdo con la reivindicación 34 caracterizado porque dichas mutaciones se realizan en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos 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.
36. El gen de acuerdo con la reivindicación 34 caracterizado porque dichas mutaciones se realizan en el aminoácido correspondiente a la posición Lys70 y en un





66

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

37. El gen de acuerdo con las reivindicaciones 25 a 30 caracterizado porque tiene tres mutaciones sitio dirigida.

38. El gen de acuerdo con la reivindicación 37 caracterizado porque dichas mutaciones se realizan en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos 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.

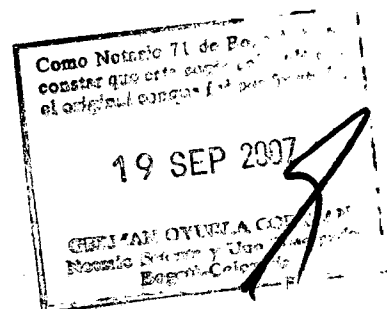
39. El gen de acuerdo con la reivindicación 37 caracterizado porque dichas mutaciones puntuales se realizan en el aminoácido correspondiente a la posición Lys70 y a dos de los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos Pro4, Arg23 y Asp77.

40. El gen de acuerdo con las reivindicaciones 25 a 30 caracterizado porque tiene cuatro mutaciones sitio dirigida.

41. El gen de acuerdo con la reivindicación 40 caracterizado porque dichas mutaciones se realizan en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos 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.

42. El gen de acuerdo con la reivindicación 40 caracterizado porque dichas mutaciones se realizan en los aminoácidos correspondientes a las posiciones Lys70, Pro4, Arg23 y Asp77.

43. El gen de acuerdo con las reivindicaciones 25 a 30 caracterizado porque tiene cinco mutaciones sitio dirigida.





44. El gen de acuerdo con la reivindicación 43 caracterizado porque dichas mutaciones se realizan en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos 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.

45. El gen de acuerdo con la reivindicación 43 caracterizado porque dichas mutaciones se realizan en los aminoácidos seleccionados del conjunto comprendido por los aminoácidos Lys70, Pro4, Arg23, Asp77, Leu95 y Glu113.

46. Un método para producir el gen de las reivindicaciones 25 a 45 que codifica a la muteína del interferón humano de la invención caracterizado porque comprende los pasos:

a)- clonar el gen que codifica para el interferón alfa humano 2b en un vector adecuado para su amplificación,

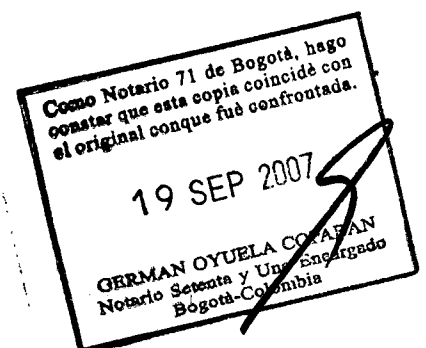
b)- producir el gen que codifica la muteína del interferón alfa humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 mediante la técnica de mutagénesis sitio dirigida,

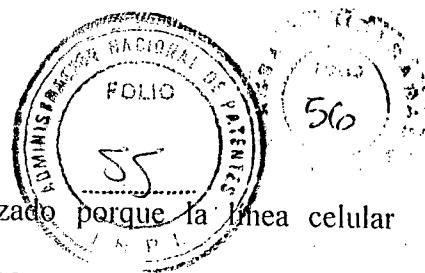
c)- clonar el gen modificado genéticamente obtenido en el paso b, en un vector de expresión eucariota adecuado.

47. Un método para producir una línea celular eucariota productora de la muteína recombinante de interferón alfa humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 24 caracterizado 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 humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 24.





68

48. El método de la reivindicación 47 caracterizado porque la línea celular eucariota comprende a una línea celular derivada de la línea CHO.K1.

49. Un procedimiento para producir la muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 caracterizado 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 24.

b)- aislar la muteína recombinante del interferón alfa humano excretada al medio de cultivo.

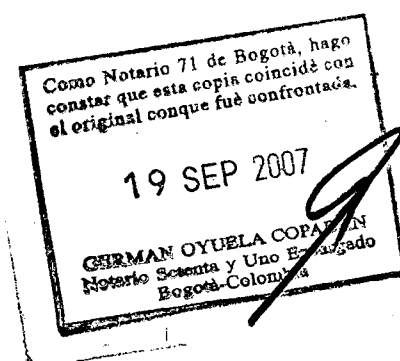
50. Un procedimiento para purificar la muteína del interferón humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 presente en el medio de cultivo de la reivindicación 49 caracterizado porque la purificación de dicha muteína se realiza mediante cromatografía de inmunoafinidad.

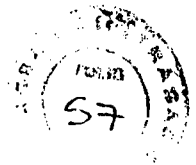
51. Un método para producir el gen de las reivindicaciones 25 a 45 que codifica a la muteína del interferón humano de la invención caracterizado porque comprende los pasos:

a)- clonar el gen que codifica para el interferón alfa humano 2b en un vector adecuado para su amplificación,

b)- producir el gen que codifica la muteína del interferón alfa humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 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.





69

52. Un método para producir la muteína recombinante del interferón humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 caracterizado 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 humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 24.

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 humano de las reivindicaciones 1 a 24.

d)-purificar el polipéptido de la muteína del interferón alfa humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 24.

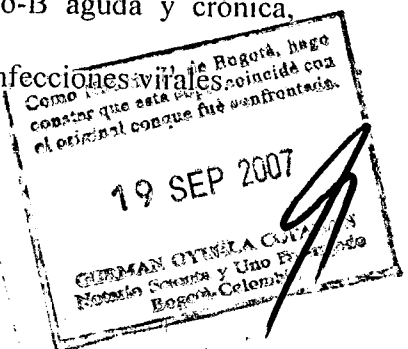
e)-glicosilar "*in vitro*" el polipéptido de la muteína del interferón alfa humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 24.

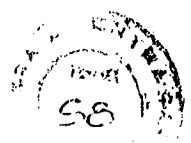
f)-purificar la muteína del interferón alfa humano de las reivindicaciones 1 a 24.

53. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende al menos una muteína recombinante del interferon alfa humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24.

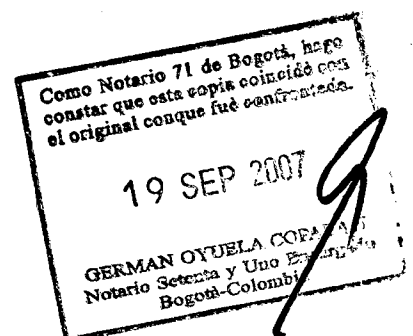
54. La composición de acuerdo con la reivindicación 53 caracterizada porque además contiene excipientes farmacológicamente aceptables.

55. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 53 ó 54 caracterizada porque dicha composición 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.





56. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 53 a 55 caracterizada porque dicha composición es administrada a un mamífero, preferentemente humano, en una dosis de entre 0,1 y 2,0 $\mu\text{g/Kg}$ semanal.
57. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 53 a 56 caracterizada porque es administrada en combinación con ribavirina.
58. 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, caracterizado porque 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 humano de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 24, y en donde dicha composición comprende además excipientes farmacológicamente aceptables.
59. El método de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque la muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 es administrada por una vía seleccionada del grupo comprendido por subcutánea, parenteral, oral, sublingual, intranasal, tópica.
60. El método de acuerdo con las reivindicaciones 58 a 59, caracterizado porque la muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 es administrada en una dosis de entre 0,1 y 2,0 $\mu\text{g/Kg}$ semanal.
61. El uso de la muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 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.

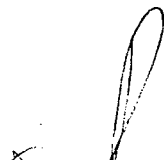




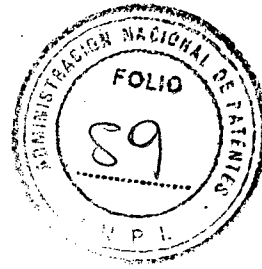
62. El uso de la muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 61 caracterizado porque dicho medicamento es administrado en una dosis de entre 0,1 y 2.0 $\mu\text{g/Kg}$ semanal.

63. El uso de la muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 61 caracterizado porque dicho medicamento es administrado en una dosis de entre 0,5 y 1.0 $\mu\text{g/Kg}$ semanal en combinación con ribavirina.

64. El uso de la muteína recombinante del interferón alfa humano de acuerdo con la reivindicación 61 caracterizado porque dicho medicamento es administrado por una vía seleccionada del grupo comprendido por las vías subcutánea, parenteral, oral, sublingual e intranasal, tópica.


FERNANDO GARCIA

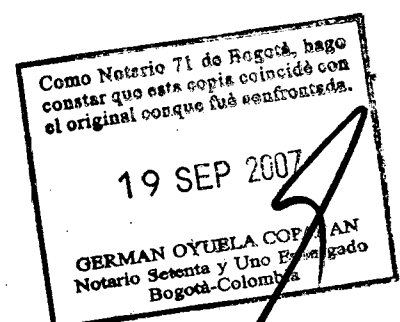




72

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





Péptido señal

IFNalfaf		Met	Ala	Leu	Thr	Phe	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Leu
1	TAACGAATTC	ACATCTACAA	TGGCCTTGAC	CTTTGCTTTA	CTGGTGGCCC							
2	Leu	Leu	Val	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Cys	Ser	Val
51	TCCTGGTGCT	CAGCTGCAAG	TCAAGCTGCT	CTGTGGGCTG	TGATCTCCCT							
2	Gln	Thr	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Arg	Arg	Thr	Leu	Met
101	CAAAACCCACA	GCCTGGGTAG	CAGGAGGACC	TTGATGCTCC	TGGCACAGAT							
2	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Cys	Leu	Lys	Asp
151	GAGGAGATC	TCTCTTTTCT	CCTGCTTGAA	GGACAGACAT	GACTTTGGAT							
2	Phe	Pro	Gln	Glu	Glu	Phe	Gly	Asn	Gln	Phe	Gln	Lys
201	TTCCCCAGGA	GGAGTTTGGC	AACCAATTCC	AAAAGGCTGA	AACCATCCCT							
2	Val	Leu	His	Glu	Met	Ile	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Leu
251	GTCTCCATG	AGATGATCCA	GCAGATCTTC	AATCTCTTCA	GCACAAAGCA							
2	Asp	Ser	Ser	Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Thr	Leu	Leu	Asp
301	CTCATCTGCT	GCTTGGGATG	AGACCCTCCT	AGACAAATTC	TACACTGAAC							
2	Leu	Tyr	Gln	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	Ala	Cys	Val
351	TCTACCAGCA	GCTGAATGAC	CTGGAAGCCT	GTGTGATACA	GGGGGTGGGG							
2	Val	Thr	Glu	Thr	Pro	Leu	Met	Lys	Glu	Asp	Ser	Ile
401	GTGACAGAGA	CTCCCCTGAT	GAAGGAGGAC	TCCATTCTGG	CTGTGAGGAA							
2	Lys	Tyr	Phe	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Tyr	Leu	Lys	Glu
451	ATACTTCCAA	AGAATCACTC	TCTATCTGAA	AGAGAAGAAA	TACAGCCCTT							
2	Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val	Arg	Ala	Glu	Ile	Met	Arg
501	GTGCCTGGGA	GTTTGTGAGA	GCAGAAATCA	TGAGATCTTT	TTCTTTGTCA							
2	Thr	Asn	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Arg	Ser	Lys	Glu	...
551	ACAAACTTGC	AAGAAAGTTT	AACAAGTAAG	GAATGAAAAC	TGGTTCAACA							
601	TGGAAATGAT	TTTCATTGAT	TCGTATGCCA	GCTCACCTTT	TTATGATCTG							
651	CCATTTCAAA	GACTCTAGAC	TAT									
IFNalfar												

Como Notario 71 de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con el original conque fue confrontada.

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA COPABAN
Notario Setenta y Uno Encargado
Bogotá-Colombia

Figura 1

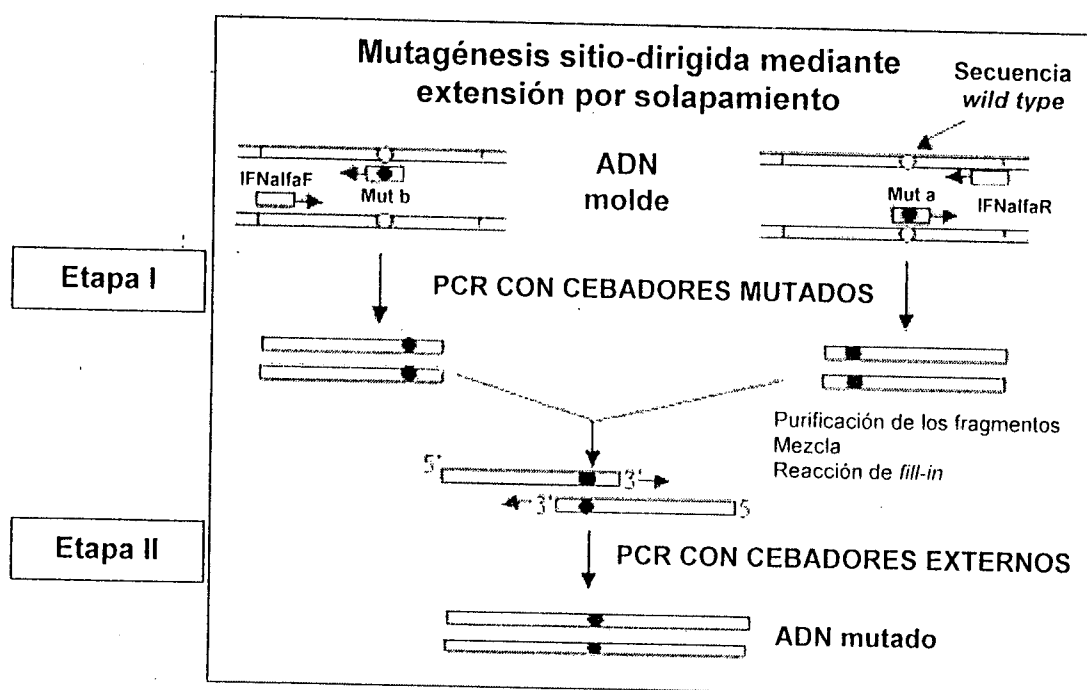
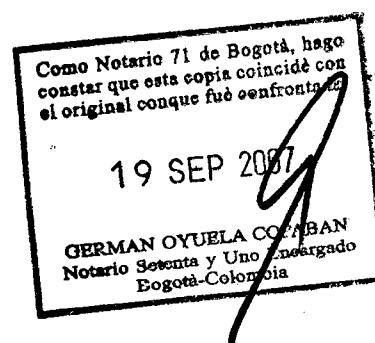


Figura 2





75

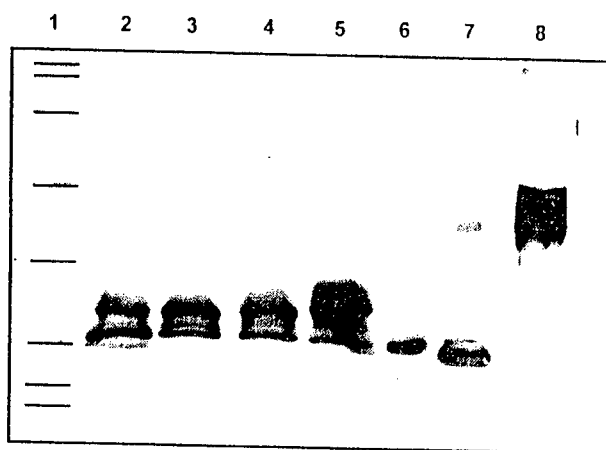
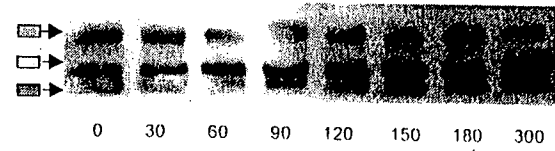
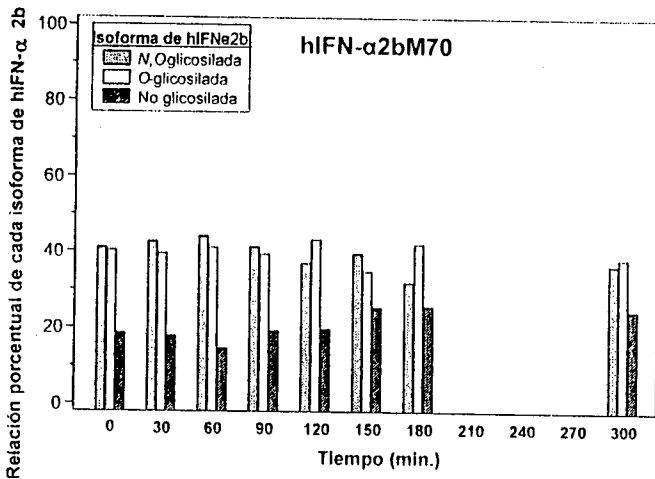
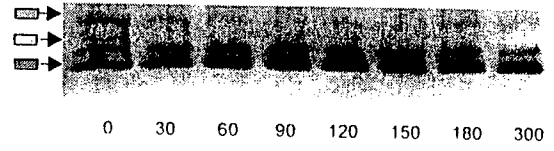
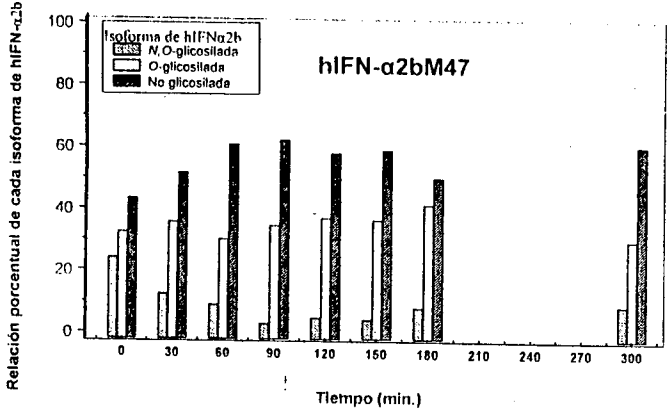
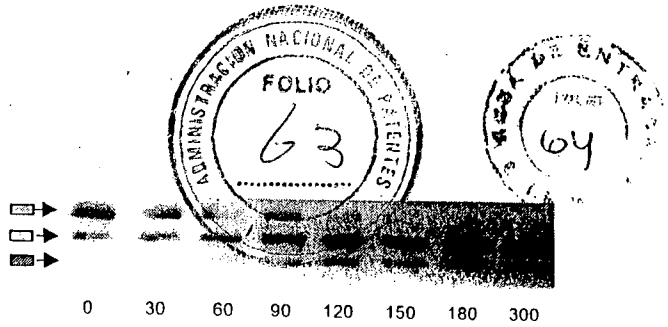
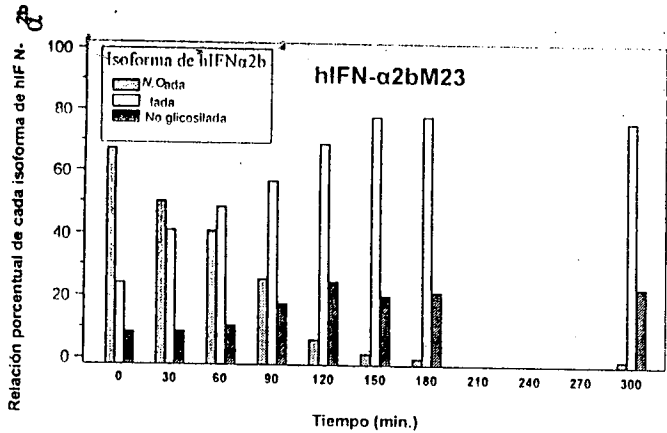


Figura 3

Como Notario 71 de Bogotá, hago
constar que esta copia coincide con
el original conque fue confrontada.

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA CORTES
Notario Setenta y Uno Encomendado
Bogotá-Colombia



Como Notario 71 de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con el original con que fué confrontada.

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA COTASAN
Notario Setenta y Uno Encargado
Bogotá-Colombia

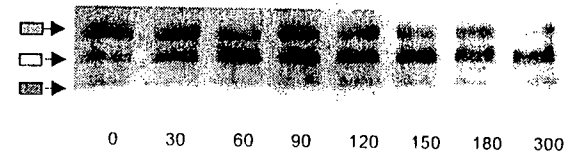
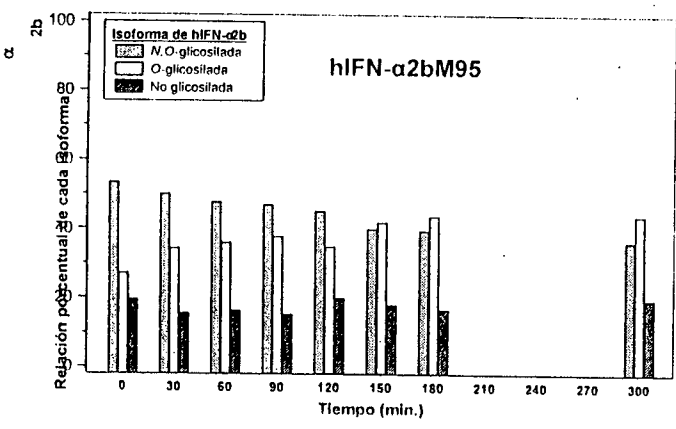
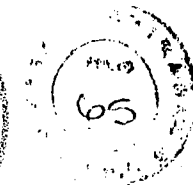
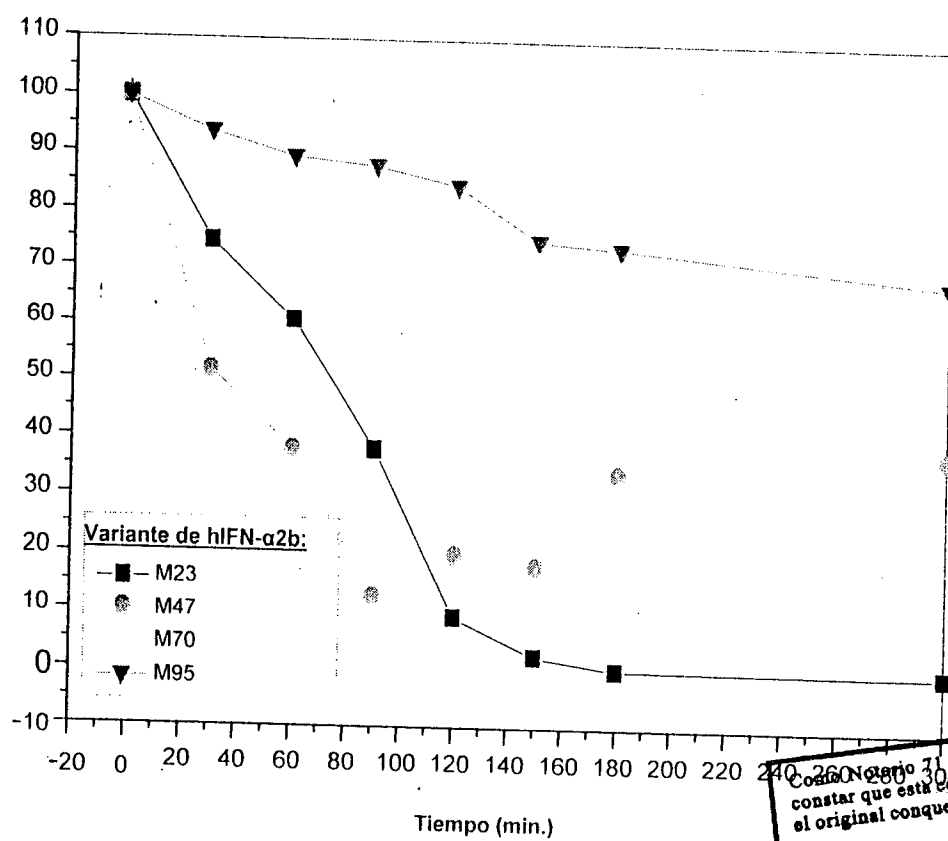


Figura 4



Variación porcentual de N-glicosilación con respecto a la cantidad inicial (%)



Como Notario 71 de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con el original con que fue confrontada.

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA CORDOBA
Notario Setenta y Uno Ennegado
Bogotá-Colombia

Figura 5

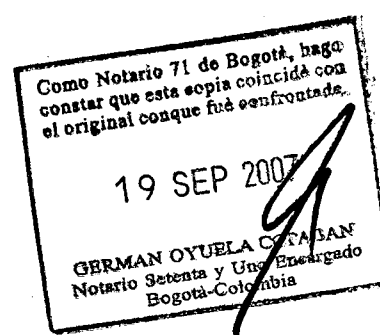
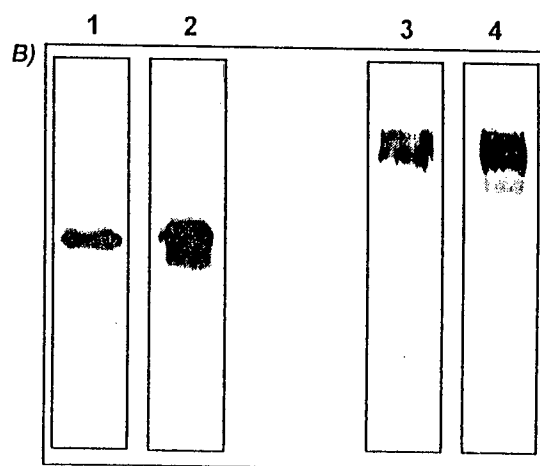
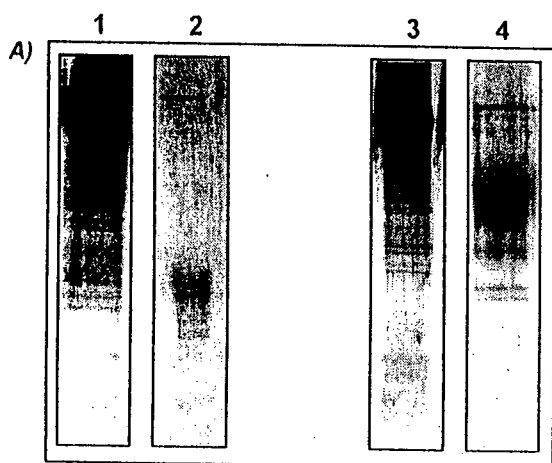


Figura 6 (A y B)

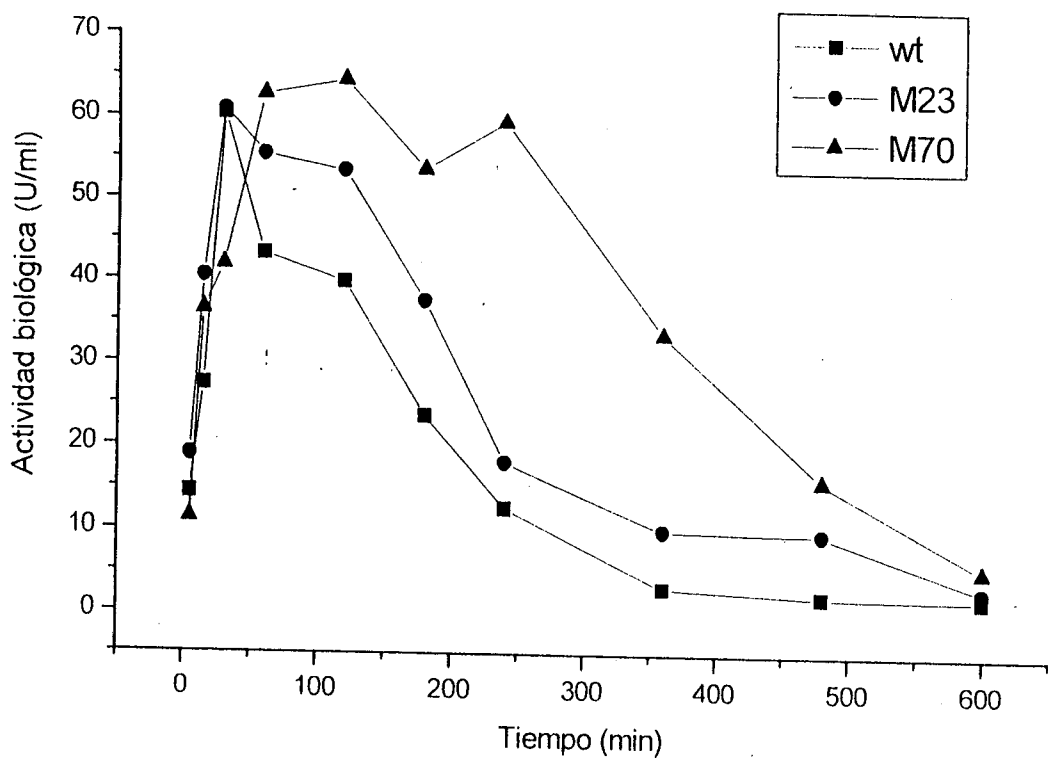
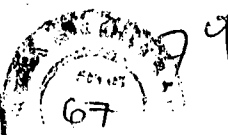


Figura 7

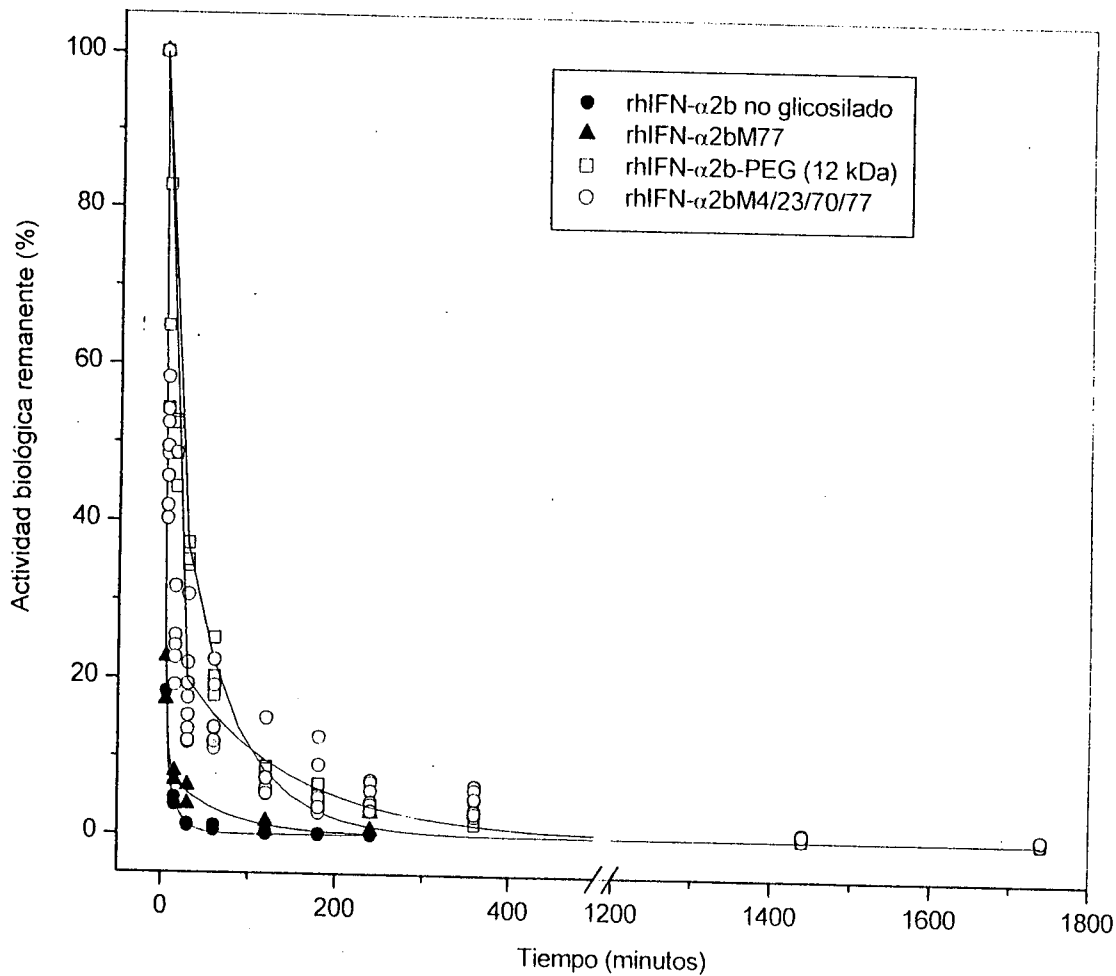
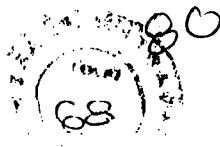
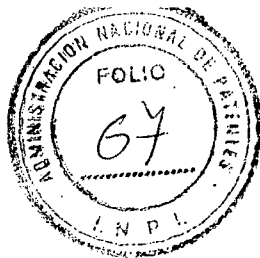


Figura 8

Como Notario 71 de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con el original conque fue confrontada.

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA COF. 1234567890
Notario Setenta y Uno Bogotá
Bogotá-Colombia



81
(69)

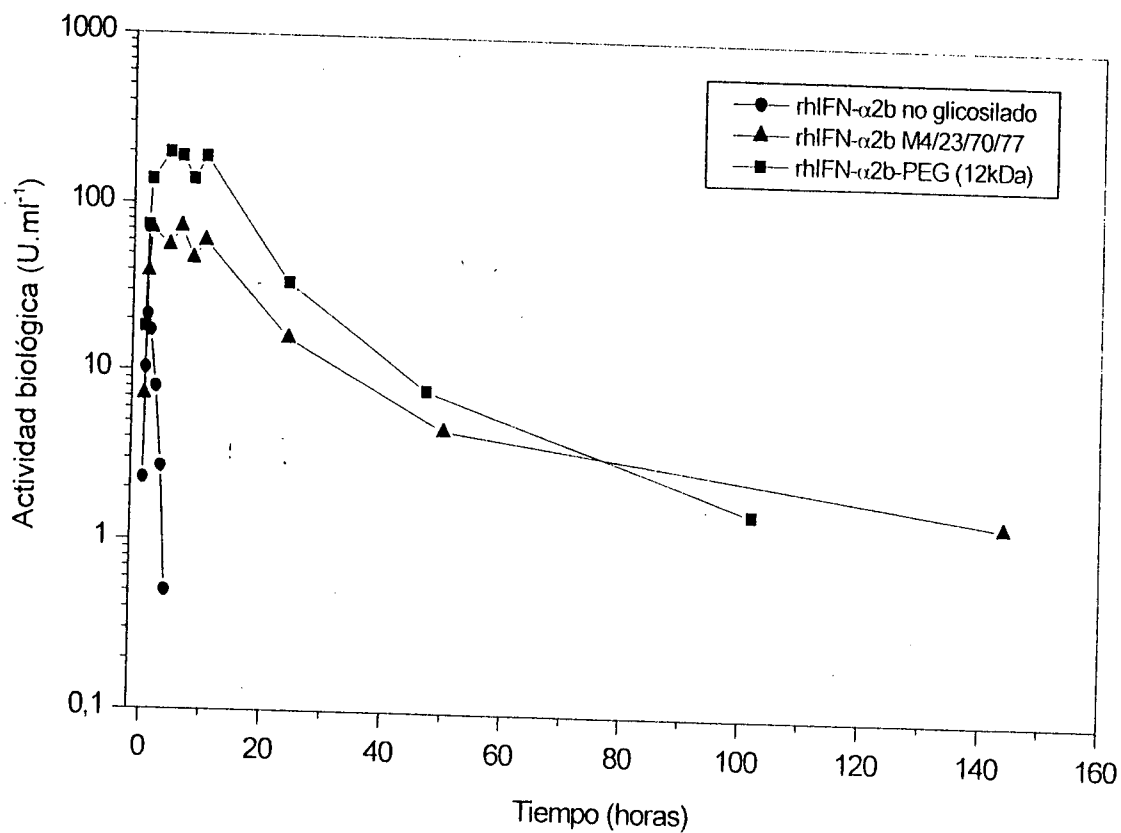


Figura 9

Como Notario 71 de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con el original con que fue confrontada.

19 SEP 2007

GERMAN OYUELA OCHOA
Notario Setenta y Uno (71) de Bogotá.
Bogotá-Colombia