



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 300 280**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/20 (2006.01)

C07K 14/555 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00982416 .0**

(86) Fecha de presentación : **04.12.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1240327**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **18.09.2002**

(54) Título: **Moléculas de tipo interferón y usos de las mismas.**

(30) Prioridad: **08.12.1999 US 169720 P**
28.11.2000 US 724860 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

(73) Titular/es: **Amgen Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

(72) Inventor/es: **Welcher, Andrew;**
Wen, Duanzhi y
Kelly, Michael

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Moléculas de tipo interferón y usos de las mismas.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos de tipo interferón (IFN-L) y a moléculas de ácido nucleico que los codifican. La invención también se refiere a agentes de unión selectiva, vectores, células hospedadoras y métodos para producir polipéptidos IFN-L. La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas y al uso de los
10 polipéptidos para preparar un medicamento para el diagnóstico, tratamiento, alivio y/o prevención de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con polipéptidos IFN-L.

Antecedentes de la invención

Los avances técnicos en la identificación clonación, expresión y manipulación de moléculas de ácido nucleico y el desciframiento del genoma humano han acelerado enormemente el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. Actualmente, las técnicas de secuenciación rápida de ácidos nucleicos pueden generar información de secuencias a velocidades sin precedentes y, acopladas con el análisis por ordenador, permiten el ensamblaje de secuencias solapan-
20 tes en genomas parciales y completos y la identificación de regiones codificantes de polipéptidos. Una comparación de una secuencia de aminoácidos predicha contra una recopilación de una base de datos de secuencias de aminoácidos conocidas nos permite determinar el grado de homología con secuencias identificadas anteriormente y/o marcas es-
25 tructurales. La clonación y la expresión de una región codificante de un polipéptido de una molécula de ácido nucleico proporcionan un producto polipeptídico para análisis estructurales y funcionales. La manipulación de moléculas de ácido nucleico y de los polipéptidos codificados puede conferir propiedades ventajosas a un producto para su uso como agente terapéutico.

A pesar de los significativos avances técnicos en investigación genómica durante la pasada década, el potencial para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos basados en el genoma humano está todavía muy desaprovechado. Aún no se han identificado muchos genes que codifican agentes terapéuticos polipeptídicos potencialmente beneficiosos o los
30 que codifican polipéptidos que pueden actuar como "dianas" para moléculas terapéuticas.

En la técnica anterior, se han descrito varias secuencias que son similares a la secuencias de la presente solicitud:

En la entrada de la base de datos EMBL Database con N° de acceso AA998549, se describe un clon de ADNc
35 cuya secuencia de nucleótidos tiene una identidad del 98,9%, en el segmento de nucleótidos 21-394 y en orientación inversa, con la secuencia de la SEC ID N°: 1 de la presente solicitud, en el segmento de nucleótidos 540-913.

En la Solicitud de Patente internacional WO 00/05371, se describe una secuencia de ácido nucleico cuya secuencia tiene una identidad del 99,2%, en el segmento de nucleótidos 1-659, con la SEC ID N°: 4 de la presente solicitud, en
40 el segmento de nucleótidos 541-1199. El documento WO 00/005371 describe además una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de la SEC ID N°: 5 de la presente solicitud.

Además, en la entrada de la base de datos NCBI Database con N° de acceso AI155872, se describe un clon de ADNc murino cuya secuencia de nucleótidos tiene una identidad del 86,5% en su longitud completa con la secuencia
45 de la SEC ID N°: 1 de la presente solicitud, en el segmento de nucleótidos 462-808.

Además, en la entrada de la base de datos NCBI Database con N° de acceso AI179042, se describe un clon de ADNc de rata cuya secuencia de nucleótidos tiene una identidad del 98,4%, en el segmento de nucleótidos 26-294 y en orientación inversa, con la secuencia de la SEC ID N°: 1 de la presente solicitud, en el segmento de nucleótidos
50 599-913.

Por consiguiente, es un objeto de la invención identificar nuevos polipéptidos y moléculas de ácidos nucleicos que los codifiquen, que tengan un beneficio diagnóstico o terapéutico.

55 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a nuevas moléculas de ácido nucleico de IFN-L y a los polipéptidos codificados.

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una molécula de ácido nucleico
60 aislada que comprende:

- (a) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1;
- (b) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 4;
- (c) la secuencia de nucleótidos de los restos 53 a 628 de la SEC ID N°: 1;
- (d) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2;

ES 2 300 280 T3

(e) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a), (c) o (d) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a), (c) o (d); o

5 (f) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a) - (e),

en la que la secuencia de nucleótidos de (e) - (f) no es la secuencia

10 tttttttt ttttttgac tgttggttt ttttggttt atttttttg ctagtaacgt caatgccata atccataagt tgttttttg acaagttgac atttctgcta gctttccac
tgaaatttt cttttgcta acataagact tccttgact gtactgcctt gaacctgac ctgaaaagt ctgcgtccg aagtgtgtag cagcagactc gcaa
tagcct tagaatcaag cgttctggg gacatttgag cagtcacaac ttctatctaa gttctgctt gaagctggat gattctcaat tcatgttgag tagttgttaa
aatatactga aacatcttct tatttcacc acgacaatct tccaggcaca gaaactgtat ttct;

15 y en la que la secuencia de nucleótidos de (e) a (f) no es la secuencia

agattatatt cactcathtt agtgactgtt gttttttt gttttttt ttttctagt aacgtcaatg ccataatcca taagtgttt tttgacaag ttgacattt tgc
tagcttt tccactgaaa tttttcttt gcttaacata agacttctt tgactgtact gcctgaacc ctgacctga aaagtcttc gtccgaagtg ttagcagca
tactgcaat agccttagaa tcaagcgtt tggggacat ttgagcagtc acaacttcta tctaagttct tgcttgaagc tggatgattc tcaattcatg ttgag
20 tactt tgtaaacc.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende:

25 (a) una región de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 que comprende un fragmento de al menos 75 nucleótidos que codifica un polipéptido de 25 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2;

30 (b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos de (a) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de (a) y en la que la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que, al exponerse a células de mamíferos, provoca un aumento de la fosforilación en tirosina de proteínas celulares; o

(c) una secuencia de nucleótidos complementaria a (a) o (b);

en la que la secuencia de nucleótidos de (a) a (c) no es la secuencia

35 tttttttt ttttttgac tgttggttt ttttggttt atttttttg ctagtaacgt caatgccata atccataagt tgttttttg acaagttgac atttctgcta gctttccac
tgaaatttt cttttgcta acataagact tccttgact gtactgcctt gaacctgac ctgaaaagt ctgcgtccg aagtgtgtag cagcagactc gcaa
tagcct tagaatcaag cgttctggg gacatttgag cagtcacaac ttctatctaa gttctgctt gaagctggat gattctcaat tcatgttgag tagttgttaa
aatatactga aacatcttct tatttcacc acgacaatct tccaggcaca gaaactgtat ttct.

40 La presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2.

45 La invención también proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3, que comprende además opcionalmente una metionina amino-terminal.

La invención proporciona además un polipéptido IFN-L aislado codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende:

50 (a) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1;

(b) la secuencia de nucleótidos de los restos 53 a 628 de la SEC ID N°: 1;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2;

55 (d) una región de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 que comprende un fragmento de al menos 75 nucleótidos que codifica un polipéptido de 25 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2; o

60 (e) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a) - (d) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a) - (d);

en la que la secuencia de nucleótidos de (d) - (e) no es la secuencia

65 tttttttt ttttttgac tgttggttt ttttggttt atttttttg ctagtaacgt caatgccata atccataagt tgttttttg acaagttgac atttctgcta gctttccac
tgaaatttt cttttgcta acataagact tccttgact gtactgcctt gaacctgac ctgaaaagt ctgcgtccg aagtgtgtag cagcagactc gcaa
tagcct tagaatcaag cgttctggg gacatttgag cagtcacaac ttctatctaa gttctgctt gaagctggat gattctcaat tcatgttgag tagttgttaa
aatatactga aacatcttct tatttcacc acgacaatct tccaggcaca gaaactgtat ttct;

y en la que secuencia de nucleótidos de (d) - (e) no es la secuencia

agattatatt cactcatttt agtgactgtt gtttttttt gtttttttt ttgtgtagt aacgtcaatg ccataatcca taagtgttt ttgtgacaag ttgacatttt tgc
tagcttt tccactgaaa tttttctttt gcttaacata agacttcctt tgactgtact gccttgaacc ctgacctga aaagtcttgc gtccgaagtg ttagcagca
5 tactcgcaat agccttagaa tcaagcggtc ttggggacat ttgagcagtc acaacttcta tctaagttct tgcttgaagc tggatgattc tcaattcatg ttgag
tactt tgtaaacc.

También se proporcionan polipéptidos de fusión que comprenden secuencias de aminoácidos de IFN-L.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende las moléculas de ácido nucleico
10 aisladas que se muestran en este documento, células hospedadoras recombinantes que comprenden las moléculas de
ácido nucleico recombinante que se muestran en este documento y un método para producir un polipéptido IFN-L que
comprende cultivar las células hospedadoras y, opcionalmente, aislar el polipéptido producido de este modo.

También se incluye en la invención un animal transgénico no humano que comprende una molécula de ácido
15 nucleico que codifica un polipéptido IFN-L. Las moléculas de ácido nucleico de IFN-L se introducen en el animal
de tal modo que permitan la expresión y niveles aumentados de un polipéptido IFN-L, que puede incluir niveles
circulantes aumentados. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico de IFN-L se introducen en el animal de tal
modo que impidan la expresión del polipéptido IFN-L endógeno (es decir, se genera un animal transgénico que posee
20 un gen del polipéptido IFN-L *knock out*). El animal transgénico no humano es preferiblemente un mamífero y, más
preferiblemente, un roedor, tal como una rata o un ratón.

También se proporcionan derivados de los polipéptidos IFN-L de la presente invención.

Además, se proporcionan anticuerpos capaces de unirse específicamente a los polipéptidos IFN-L de la invención.
25 Dichos anticuerpos pueden ser agonistas o antagonistas.

También se incluyen en la invención composiciones farmacéuticas que comprenden los nucleótidos, polipéptidos
o agentes de unión selectiva de la invención y uno o más agentes de formulación farmacéuticamente aceptables. Las
30 composiciones farmacéuticas se usan para proporcionar cantidades terapéuticamente eficaces de los nucleótidos o
polipéptidos de la presente invención. La invención también se refiere a métodos para usar los polipéptidos, moléculas
de ácido nucleico y agentes de unión selectiva.

Los polipéptidos IFN-L y las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden usarse para preparar un
35 medicamento para tratar, prevenir, aliviar y/o detectar enfermedades y trastornos, incluyendo los que se enumeran en
este documento.

La presente invención también describe un método para analizar moléculas de ensayo para identificar una molécula
de ensayo que se una a un polipéptido IFN-L. El método comprende poner en contacto un polipéptido IFN-L con
40 una molécula de ensayo para determinar el grado de unión de la molécula de ensayo con el polipéptido. El método
comprende además determinar si dichas moléculas de ensayo son agonistas o antagonistas de un polipéptido IFN-
L. La presente invención describe además un método para evaluar el impacto de moléculas sobre la expresión del
polipéptido IFN-L o sobre la actividad del polipéptido IFN-L.

También se describen en la invención métodos para regular la expresión y modular (es decir, aumentando o dismi-
nuyendo) los niveles de un polipéptido IFN-L. Un método comprende administrar a un animal una molécula de ácido
45 nucleico que codifica un polipéptido IFN-L. En otro método, puede administrarse una molécula de ácido nucleico que
comprende elementos que regulan o modulan la expresión de un polipéptido IFN-L. Los ejemplos de estos métodos
incluyen terapia génica, terapia celular y terapia antisentido, como se describen adicionalmente en este documento.

Además, se describe que los polipéptidos IFN-L pueden usarse para identificar receptores de los mismos ("recep-
tores de polipéptidos IFN-L"). Se han usado mucho diversas formas de "clonación y expresión" para clonar receptores
para ligandos proteicos. Véanse, por ejemplo, Simonsen y Lodish, 1994, *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 437-41 y Tartaglia
50 *et al.*, 1995, *Cell* 83: 1263-71. El aislamiento de un receptor de polipéptido IFN-L es útil para identificar o desarrollar
nuevos agonistas y antagonistas de la ruta de señalización del polipéptido IFN-L. Dichos agonistas y antagonistas
55 incluyen receptores de polipéptido IFN-L solubles, agentes de unión selectiva anti-receptores de polipéptido IFN-L
(tales como anticuerpos y derivados de los mismos), pequeñas moléculas y oligonucleótidos antisentido, pudiendo
usarse cualquiera de ellos para el tratamiento de una o más enfermedades o trastornos, incluyendo los que se describen
en este documento.

60 Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-1B ilustran la secuencia de nucleótidos del gen de IFN-L de rata (SEC ID N°: 1) y la secuencia de
aminoácidos deducida del polipéptido IFN-L de rata (SEC ID N°: 2). Se señala el péptido señal predicho (*subrayado*);

65 las Figuras 2A-2B ilustran la secuencia de nucleótidos del gen de IFN-L humano (SEC ID N°: 4) y la secuencia de
aminoácidos deducida del polipéptido IFN-L humano (SEC ID N°: 5). Se señala el péptido señal predicho (*subrayado*);

la Figura 3 ilustra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido IFN-L humano (huIFN-L; SEC ID N°: 5), del IFN- β humano (huIFN- β ; SEC ID N°: 7), del polipéptido IFN-L de rata (raIFN-L; SEC ID N°: 2) y las posiciones de aminoácidos que comparten cierta similitud (consenso);

la Figura 4 ilustra la secuencia de nucleótidos del inserto *Nde* I-*Bam* HI de pAMG21 (SEC ID N°: 8) de la cepa n° 3729 de Amgen y la secuencia de aminoácidos predicha (SEC ID N°: 9) codificada por este inserto;

la Figura 5 ilustra la secuencia de nucleótidos del inserto *Nde* I-*Bam* HI de pAMG21 (SEC ID N°: 10) de la cepa n° 3858 de Amgen y la secuencia de aminoácidos predicha (SEC ID N°: 11) codificada por este inserto;

la Figura 6 ilustra la secuencia de nucleótidos del inserto *Xba* I-*Bam* HI de pAMG21 (SEC ID N°: 12) de la cepa n° 4047 de Amgen y la secuencia de aminoácidos predicha (SEC ID N°: 13) codificada por este inserto;

la Figura 7 ilustra la secuencia de nucleótidos del inserto *Xba* I-*Bam* HI de pAMG21 (SEC ID N°: 14) de la cepa n° 3969 y la secuencia de aminoácidos predicha (SEC ID N°: 15) codificada por este inserto;

la Figura 8 ilustra la secuencia de nucleótidos del inserto *Nde* I-*Bam* HI de pAMG21 (SEC ID N°: 16) de la cepa n° 4182 de Amgen y la secuencia de aminoácidos predicha (SEC ID N°: 17) codificada por este inserto.

Descripción detallada de la invención

Los títulos de sección que se usan en este documento tienen únicamente fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del contenido del tema que se describe. Toda la bibliografía que se cita en esta solicitud se incorpora expresamente como referencia en este documento.

Definiciones

Las expresiones “gen de IFN-L” o “molécula de ácido nucleico de IFN-L” o “polinucleótido IFN-L” se refieren a una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1 o en la SEC ID N°: 4, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2 y moléculas de ácido nucleico como se definen en este documento.

La expresión “variante alélica del polipéptido IFN-L” se refiere a una de varias formas alternativas posibles de origen natural de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo o de una población de organismos.

La expresión “variante de corte y empalme del polipéptido IFN-L” se refiere a una molécula de ácido nucleico, habitualmente ARN, que se genera por procesamiento alternativo de secuencias de intrones en un transcrito de ARN de la secuencia de aminoácidos del polipéptido IFN-L que se muestra en la SEC ID N°: 2.

La expresión “molécula de ácido nucleico aislada” se refiere a una molécula de ácido nucleico de la invención que (1) se ha separado de al menos aproximadamente el 50% de las proteínas, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con los que se encuentra naturalmente cuando el ácido nucleico total se aísla a partir de las células de partida, (2) no está unida a todo ni a una porción de un polinucleótido con el que la “molécula de ácido nucleico aislada” está unida en la naturaleza, (3) está unida operativamente a un polinucleótido con el que no está unida en la naturaleza o (4) no existe en la naturaleza como parte de una secuencia polinucleotídica más grande. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención está sustancialmente libre de cualquier otra molécula de ácido nucleico contaminantes u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso en la producción de polipéptidos o con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o en investigación.

La expresión “secuencia de ácido nucleico” o “molécula de ácido de nucleico” se refiere a una secuencia de ADN o ARN. El término incluye moléculas formadas a partir de cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN tales como, pero sin limitación, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinil-citosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil)-uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-iso-penteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiamino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonil-metiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopeneniladenina, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido N-uracilo-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

El término “vector” se usa para referirse a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido o virus) que se usa para transferir información codificante a una célula hospedadora.

La expresión “vector de expresión” se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula hospedadora y que contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan la expresión de secuencias de ácido nucleico heterólogas insertadas. La expresión incluye, pero sin limitación, procesos tales como la transcripción, la traducción y el corte y empalme de ARN si existen intrones.

La expresión “unida operativamente” se usa en este documento para referirse a una disposición de las secuencias flanqueantes en la que las secuencias flanqueantes así descritas están configuradas o ensambladas de tal modo que realicen su función habitual. Por lo tanto, una secuencia flanqueante unida operativamente a una secuencia codificante puede ser capaz de producir la replicación, transcripción y/o traducción de la secuencia codificante. Por ejemplo, una secuencia codificante está unida operativamente a un promotor cuando el promotor es capaz de dirigir la transcripción de esa secuencia codificante. Una secuencia flanqueante no necesita estar contigua a la secuencia codificante, siempre que funcione correctamente. Por lo tanto, por ejemplo, pueden existir secuencias intermedias no traducidas aunque transcritas entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora puede considerarse aún “unida operativamente” a la secuencia codificante.

La expresión “célula hospedadora” se usa para referirse a una célula que se ha transformado o que es capaz de transformarse con una secuencia de ácido nucleico y después expresar un gen de interés seleccionado. La expresión incluye la progenie de la célula parental, independientemente de que la progenie sea o no idéntica en morfología o en composición genética a la de la parental original, siempre que esté presente el gen seleccionado.

La expresión “polipéptido IFN-L” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y a polipéptidos relacionados. Los polipéptidos relacionados incluyen fragmentos de polipéptidos IFN-L y derivados de polipéptidos IFN-L que posean al menos una actividad del polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2. Los polipéptidos IFN-L pueden ser polipéptidos maduros, como se definen en este documento, y pueden o no tener un resto de metionina amino-terminal dependiendo del método por el que se preparen.

La expresión “fragmento del polipéptido IFN-L” se refiere a un polipéptido que comprende un truncamiento en el extremo amino-terminal (con o sin una secuencia líder) y/o un truncamiento en el extremo carboxilo-terminal del polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2. La expresión “fragmento del polipéptido IFN-L” también se refiere a truncamientos amino-terminales y/o carboxilo-terminales de ortólogos de polipéptidos IFN-L, derivados de polipéptidos IFN-L o variantes de polipéptidos IFN-L o a truncamientos amino-terminales y/o carboxilo-terminales de los polipéptidos codificados por las variantes alélicas del polipéptido IFN-L o por las variantes de corte y empalme del polipéptido IFN-L. Los fragmentos del polipéptido IFN-L pueden ser el resultado de un corte y empalme de ARN alternativo o de una actividad proteasa *in vivo*. También se contemplan en la presente invención formas de un polipéptido IFN-L unidas a membrana. En realizaciones preferidas, los truncamientos y/o delecciones comprenden aproximadamente 10 aminoácidos, o aproximadamente 20 aminoácidos, o aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 75 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos o más de aproximadamente 100 aminoácidos. Los fragmentos de polipéptido producidos de este modo comprenderán aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, o aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 75 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos, o aproximadamente 150 aminoácidos o aproximadamente 200 aminoácidos. Dichos fragmentos de polipéptidos IFN-L pueden comprender, opcionalmente, un resto de metionina amino-terminal. Se entenderá que dichos fragmentos pueden usarse, por ejemplo, para generar anticuerpos contra polipéptidos IFN-L.

La expresión “ortólogo del polipéptido IFN-L” se refiere a un polipéptido de otra especie que se corresponde con la secuencia de aminoácidos del polipéptido IFN-L que se muestra en la SEC ID N°: 2. Por ejemplo, los polipéptidos IFN-L de ratón y humano se consideran ortólogos entre sí.

La expresión “variantes del polipéptido IFN-L” se refiere a polipéptidos IFN-L que comprenden secuencias de aminoácidos que tienen una o más sustituciones, delecciones (tales como delecciones internas y/o fragmentos del polipéptido IFN-L) y/o adiciones (tales como adiciones internas y/o polipéptidos de fusión IFN-L) en la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido IFN-L que se muestra en la SEC ID N°: 2 (con o sin una secuencia líder). Las variantes pueden ser de origen natural (por ejemplo, variantes alélicas del polipéptido IFN-L, ortólogos del polipéptido IFN-L y variantes de corte y empalme del polipéptido IFN-L) o construirse artificialmente. Dichas variantes del polipéptido IFN-L pueden prepararse a partir de las moléculas de ácido nucleico correspondientes que tienen una secuencia de ADN que varía conforme a la secuencia de ADN que se muestra en la SEC ID N°: 1 o en la SEC ID N°: 4. En realizaciones preferidas, las variantes tienen de 1 a 3, o de 1 a 5 o de 1 a 10, o de 1 a 15, o de 1 a 20, o de 1 a 25, o de 1 a 50, o de 1 a 75, o de 1 a 100, o más de 100 sustituciones, inserciones, adiciones, y/o delecciones de aminoácidos, en las que las sustituciones pueden ser conservativas o no conservativas o cualquier combinación de las mismas.

La expresión “derivados del polipéptido IFN-L” se refiere al polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2, a fragmentos del polipéptido IFN-L, a ortólogos del polipéptido IFN-L o a variantes del polipéptido IFN-L, como se han definido en este documento, que se han modificado químicamente. La expresión “derivados del polipéptido IFN-L” también se refiere a los polipéptidos codificados por variantes alélicas del polipéptido IFN-L o variantes de corte y empalme del polipéptido IFN-L, como se han definido en este documento, que se han modificado químicamente.

La expresión “polipéptido IFN-L maduro” se refiere a un polipéptido IFN-L que carece de una secuencia líder. Un polipéptido IFN-L maduro también puede incluir otras modificaciones tales como el procesamiento proteolítico del extremo amino-terminal (con o sin una secuencia líder) y/o del extremo carboxilo-terminal, la escisión de un polipéptido más pequeño a partir de un precursor más grande, la glicosilación ligada a N y/o ligada a O y similares. Se representan polipéptidos IFN-L maduros ejemplares mediante las secuencias de aminoácidos de la SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6.

ES 2 300 280 T3

La expresión “polipéptido de fusión IFN-L” se refiere a una fusión de uno o más aminoácidos (tal como un péptido o proteína heteróloga) en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal del polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2, fragmentos del polipéptido IFN-L, ortólogos del polipéptido IFN-L, variantes del polipéptido IFN-L o derivados de IFN-L, como se han definido en este documento. La expresión “polipéptido de fusión IFN-L” también se refiere a una fusión de uno o más aminoácidos en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal del polipéptido codificado por las variantes alélicas del polipéptido IFN-L o las variantes de corte y empalme del polipéptido IFN-L, como se han definido en este documento.

La expresión “polipéptidos IFN-L biológicamente activos” se refiere a polipéptidos IFN-L que tienen al menos una actividad característica del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2. Además, un polipéptido IFN-L puede ser activo como inmunógeno; es decir, el polipéptido IFN-L contiene al menos un epítipo contra el que pueden generarse anticuerpos.

La expresión “polipéptido aislado” se refiere a un polipéptido de la presente invención que (1) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de los polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con los que se encuentra naturalmente cuando se aísla a partir de la célula de partida, (2) no está unido (por interacción covalente o no covalente) a todo ni a una porción de un polipéptido con el que el “polipéptido aislado” está unido en la naturaleza (3) está unido operativamente (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está unido en la naturaleza o (4) no existe en la naturaleza. Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido contaminante u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o en investigación.

El término “identidad”, como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas polipeptídicas o dos o más moléculas de ácido nucleico, determinada por comparación de las secuencias. En la técnica, la “identidad” también se refiere al grado de parentesco entre secuencias de moléculas de ácido nucleico o polipéptidos, como puede ser el caso, determinada por el emparejamiento entre hebras de dos o más nucleótidos o dos o más secuencias de aminoácidos. La “identidad” mide el porcentaje de emparejamientos idénticos entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineamiento con huecos (si existen) dirigido por un modelo matemático o programa informático en particular (es decir, “algoritmos”).

El término “similitud” es un concepto relacionado pero, al contrario que la “identidad”, la “similitud” se refiere a una medida del parentesco que incluye tanto emparejamientos idénticos como emparejamientos de sustituciones conservativas. Si dos secuencias polipeptídicas tienen, por ejemplo, 10/20 aminoácidos idénticos y los restantes son todos sustituciones no conservativas, entonces el porcentaje de identidad y de similitud serán ambos del 50%. Si en el mismo ejemplo existen cinco posiciones más en las que hay sustituciones conservativas, entonces el porcentaje de identidad continúa siendo del 50%, pero el porcentaje de similitud sería del 75% (15/20). Por lo tanto, en casos en los que existen sustituciones conservativas, el porcentaje de similitud entre dos polipéptidos será superior al porcentaje de identidad entre esos dos polipéptidos.

Las expresiones “de origen natural” o “nativo”, cuando se usan en relación a materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células hospedadoras y similares, se refieren a materiales que se encuentran en la naturaleza y no están manipulados por el hombre. De manera similar, las expresiones “de origen no natural” o “no nativo”, como se usan en este documento, se refieren a un material que no se encuentra en la naturaleza o que se ha modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre.

Las expresiones “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” se refieren cada una a la cantidad de un polipéptido IFN-L o de una molécula de ácido nucleico de IFN-L que se usa para mantener un nivel observable de una o más actividades biológicas de los polipéptidos IFN-L, como se expone en este documento.

Las expresiones “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “vehículo fisiológicamente aceptable”, como se usan en este documento, se refieren a uno o más materiales de formulación adecuados para llevar a cabo o mejorar la administración del polipéptido IFN-L, de la molécula de ácido nucleico de IFN-L o del agente de unión selectiva a IFN-L como una composición farmacéutica.

El término “antígeno” se refiere a una molécula o a una porción de una molécula capaz de unirse por un agente de unión selectiva, tal como un anticuerpo y, adicionalmente, capaz de usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.

La expresión “agente de unión selectiva” se refiere a una molécula o moléculas que tienen especificidad por un polipéptido IFN-L. Como se usan en este documento, los términos “específico” y “especificidad” se refieren a la capacidad de los agentes de unión selectiva de unirse a polipéptidos IFN-L humanos y no unirse a polipéptidos humanos que no sean IFN-L. Se entenderá, sin embargo, que los agentes de unión selectiva también pueden unirse a ortólogos del polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5, es decir, a versiones interespecie del mismo, tales como polipéptidos IFN-L de ratón y rata.

El término “transducción” se usa para referirse a la transferencia de genes de una bacteria a otra, habitualmente por un fago. La “transducción” también se refiere a la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucariotas por retrovirus.

El término “transfección” se usa para referirse a la captación de ADN extraño o exógeno por una célula y se dice que una célula se ha “transformado” cuando se ha introducido el ADN exógeno dentro de la membrana celular. Se conocen bien en la técnica, y se describen en este documento, varias técnicas de transfección. Véanse, por ejemplo, Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52: 456; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); y Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13: 197. Dichas técnicas pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno en células hospedadoras adecuadas.

El término “transformación”, como se usa en este documento, se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula y se dice que una célula se ha transformado cuando se ha modificado para que contenga un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula está transformada cuando está genéticamente modificada respecto a su estado nativo. Después de la transfección o transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándose físicamente en un cromosoma de la célula, puede mantenerse de forma transitoria como un elemento episomal sin que se replique o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado de forma estable cuando el ADN se replica con la división de la célula.

Parentesco de las moléculas de ácido nucleico y/o polipéptidos

Se entiende que las moléculas de ácido nucleico relacionadas incluyen variantes alélicas o de corte y empalme de la molécula de ácido nucleico de la SEC ID N°: 1 o de la SEC ID N°: 4, e incluyen secuencias que son complementarias a cualquiera de las secuencias de nucleótidos anteriores. Las moléculas de ácido nucleico relacionadas también incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende o consiste esencialmente en una sustitución, modificación, adición y/o delección de uno o más restos aminoacídicos, en comparación con el polipéptido de la SEC ID N°: 2 o de la SEC ID N°: 5. Dichos polipéptidos IFN-L relacionados pueden comprender, por ejemplo, una adición y/o una delección de uno o más sitios de glicosilación ligados a N o ligados a O o una adición y/o una delección de uno o más restos de cisteína.

Las moléculas de ácido nucleico relacionadas también incluyen fragmentos de moléculas de ácido nucleico de IFN-L que codifican un polipéptido de al menos aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, o aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 75 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos, o aproximadamente 150 aminoácidos, o aproximadamente 200 aminoácidos o más de 200 restos aminoacídicos del polipéptido IFN-L de la SEC ID N°: 2 o de la SEC ID N°: 5.

Además, las moléculas de ácido nucleico de IFN-L relacionadas también incluyen las moléculas que comprenden secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones moderada o altamente rigurosas, como se definen en este documento, con la secuencia complementaria completa de la molécula de ácido nucleico de IFN-L de la SEC ID N°: 1 o de la SEC ID N°: 4, o de una molécula que codifica un polipéptido, comprendiendo el polipéptido la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5, o de un fragmento de ácido nucleico, como se ha definido en este documento, o de un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se define en este documento. Pueden prepararse sondas de hibridación usando las secuencias de IFN-L que se proporciona en este documento para explorar genotecas de ADNc, ADN genómico o sintético para determinar secuencias relacionadas. Las regiones del ADN y/o de la secuencia de aminoácidos del polipéptido IFN-L que presentan una identidad significativa con secuencias conocidas se determinan fácilmente usando algoritmos de alineamiento de secuencias, como se describen en este documento, y esas regiones pueden usarse para diseñar sondas para la exploración.

La expresión “condiciones altamente rigurosas” se refiere a las condiciones que están diseñadas para permitir la hibridación de cadenas de ADN cuyas secuencias son muy complementarias y para evitar la hibridación de ADN significativamente erróneamente emparejados. La rigurosidad de hibridación se determina principalmente por la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturizantes tales como formamida. Son ejemplos de “condiciones altamente rigurosas” para hibridación y lavado cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M a 65-68°C o cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M y formamida al 50% a 42°C. Véanse Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* Cap. 4 (IRL Press Limited).

También pueden usarse condiciones más rigurosas (tales como una temperatura superior, una fuerza iónica menor y mayor concentración de formamida u otro agente desnaturizante); sin embargo, afectarán al índice de hibridación. Pueden incluirse otros agentes en los tampones de hibridación y de lavado con el fin de reducir la hibridación inespecífica y/o de fondo. Son ejemplos albúmina de suero bovino al 0,1%, polivinil-pirrolidona al 0,1%, pirofosfato sódico al 0,1%, dodecilsulfato sódico (NaDodSO₄ o SDS) al 0,1%, ficoll, solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (u otro ADN no complementario) y sulfato de dextrano, aunque también pueden usarse otros agentes adecuados. La concentración y tipos de estos aditivos pueden variarse sin afectar sustancialmente a la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los experimentos de hibridación se realizan habitualmente a un pH de 6,8-7,4; sin embargo, en condiciones de fuerza iónica típicas, el índice de hibridación es prácticamente independiente del pH. Véase Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* Cap. 4 (IRL Press Limited).

Los factores que afectan a la estabilidad del dúplex de ADN incluyen la composición de bases, la longitud y el grado de emparejamiento erróneo de bases. Las condiciones de hibridación pueden ajustarse por un especialista en la técnica para adaptar estas variables y permitir que ADN de diferentes parentescos entre secuencias formen híbridos.

ES 2 300 280 T3

La temperatura de fusión de un dúplex de ADN perfectamente emparejado puede estimarse mediante la siguiente ecuación:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 16,6 (\log[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ G} + \text{C}) - 600/N - 0,72(\% \text{ formamida})$$

en la que N es la longitud del dúplex formado, $[\text{Na}^+]$ es la concentración molar del ión sodio en la solución de hibridación o de lavado y % G + C es el porcentaje de bases de (guanina + citosina) en el híbrido. Para híbridos no perfectamente emparejados, la temperatura de fusión se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de emparejamiento erróneo.

La expresión “condiciones moderadamente rigurosas” se refiere a condiciones en las que puede formarse un dúplex de ADN con un grado mayor de emparejamiento erróneo de pares de bases que el que podría producirse en “condiciones altamente rigurosas”. Son ejemplos de “condiciones moderadamente rigurosas” típicas cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M a 50-65°C o cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M y formamida al 20% a 37-50°C. A modo de ejemplo, “condiciones moderadamente rigurosas” de 50°C en ión sodio 0,015 M permitirán aproximadamente un emparejamiento erróneo del 21%.

Se entenderá por los especialistas en la técnica que no existe una distinción absoluta entre “condiciones altamente rigurosas” y “condiciones moderadamente rigurosas”. Por ejemplo, a ión sodio 0,015 M (sin formamida), la temperatura de fusión de un ADN largo perfectamente emparejado es de aproximadamente 71°C. Con un lavado 65°C (a la misma fuerza iónica), esto permitiría aproximadamente un 6% de emparejamiento erróneo. Para capturar secuencias relacionadas más distantes, un especialista en la técnica puede simplemente disminuir la temperatura o aumentar la fuerza iónica.

Una buena estimación de la temperatura de fusión en NaCl* 1 M para sondas oligonucleotídicas de hasta aproximadamente 20 nt se proporciona mediante:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C por par de bases A} - \text{T} + 4^{\circ}\text{C por par de bases G} - \text{C}$$

* La concentración de ión sodio en sal de citrato sódico 6X (SSC) es 1 M. Véase Suggs *et al.*, *Developmental Biology Using Purified Genes* 683 (Brown y Fox, eds., 1981).

Las condiciones de lavado de alta rigurosidad para oligonucleótidos son habitualmente a una temperatura de 0-5°C por debajo de la T_m del oligonucleótido en SSC 6X y SDS al 0,1%.

En otra realización, las moléculas de ácido nucleico relacionadas comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos una identidad de aproximadamente el 70% con la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1 o en la SEC ID N°: 4, o que comprende o consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 70% con el polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5. En realizaciones preferidas, las secuencias de nucleótidos tienen una identidad de aproximadamente el 75 por ciento, o de aproximadamente el 80 por ciento, o de aproximadamente el 85 por ciento, o de aproximadamente el 90 por ciento, o de aproximadamente el 95, 96, 97, 98 ó 99 por ciento con la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1 o en la SEC ID N°: 4, o con las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una identidad de aproximadamente el 75 por ciento, o de aproximadamente el 80 por ciento, o de aproximadamente el 85 por ciento, o de aproximadamente el 90 por ciento, o de aproximadamente el 95, 96, 97, 98 ó 99 por ciento con la secuencia polipeptídica que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5. Las moléculas de ácido nucleico relacionadas codifican polipéptidos que poseen al menos una actividad del polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5.

Las diferencias en la secuencia de ácido nucleico pueden dar como resultado modificaciones conservativas y/o no conservativas de la secuencia de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 o de la SEC ID N°: 5.

Las modificaciones conservativas de la secuencia aminoácidos de la SEC ID N°: 2 o de la SEC ID N°: 5 (y las modificaciones correspondientes en los nucleótidos codificantes) producirán un polipéptido que tenga características funcionales y químicas similares a las de los polipéptidos IFN-L. Por el contrario, pueden realizarse modificaciones sustanciales de las características funcionales y/o químicas de los polipéptidos IFN-L mediante la selección de sustituciones en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 o de la SEC ID N°: 5 que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal molecular en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) de la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana o (c) del volumen de la cadena lateral.

Por ejemplo, una “sustitución de aminoácidos conservativa” puede implicar una sustitución de un resto aminoácido nativo con un resto no nativo de tal modo que se produzca un escaso o ningún efecto sobre la polaridad o la carga del resto aminoácido en esa posición. Además, cualquier resto nativo en el polipéptido también puede sustituirse con alanina, como se ha descrito anteriormente para la “mutagénesis mediante alanina”.

ES 2 300 280 T3

Las sustituciones de aminoácidos conservativas también incluyen restos aminoacídicos de origen no natural que se incorporan típicamente mediante la síntesis química de péptidos más que por la síntesis en sistemas biológicos. Éstos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos aminoacídicos.

Los restos de origen natural pueden dividirse en clases en base a propiedades comunes de las cadenas laterales:

1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu e Ile;

2) hidrófilos neutros: Cys, Ser y Thr;

3) ácidos: Asp y Glu;

4) básicos: Asn, Gln, His, Lys y Arg;

5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly y Pro; y

6) aromáticos: Trp, Tyr y Phe.

Por ejemplo, las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Dichos restos sustituidos pueden introducirse en regiones del polipéptido IFN-L humano que son homólogas con polipéptidos IFN-L no humanos o en las regiones no homólogas de la molécula.

Cuando se realizan dichos cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en base a sus características de hidrofobia y de carga. Los índices hidropáticos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Por lo general, se entiende en la técnica la importancia del índice hidropático del aminoácido para conferir una función biológica interactiva a una proteína (Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.* 157: 105-31). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituir a otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y aún conservar una actividad biológica similar. Al realizar cambios en base al índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están entre ± 2 , se prefieren particularmente los que están entre ± 1 y se prefieren aún más particularmente los que están entre $\pm 0,5$.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente en base a la hidrofilia, particularmente cuando se pretende usar la proteína o péptido biológica y funcionalmente equivalente en realización inmunológicas, como es el presente caso. Una mayor hidrofilia media local de una proteína, determinada por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a estos restos aminoacídicos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); y triptófano (-3,4). Cuando se realizan cambios en base a valores de hidrofilia similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están dentro de ± 2 , se prefiere particularmente los que están entre ± 1 y se prefieren aún más particularmente los que están entre $\pm 0,5$. También se pueden identificar epítomos a partir de secuencias de aminoácidos primarias en base a la hidrofilia. Estas regiones también se denominan como "regiones del núcleo epitópico".

Las sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservativas o no conservativas) pueden determinarse por los especialistas en la técnica en el momento en que se deseen dichas sustituciones. Por ejemplo, pueden usarse sustituciones de aminoácidos para identificar restos importantes del polipéptido IFN-L o para aumentar o disminuir la afinidad de los polipéptidos IFN-L que se describen en este documento. En la Tabla I se exponen sustituciones de aminoácidos ejemplares.

TABLA I

Sustituciones de aminoácidos

Restos Originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lis, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4-diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, norleucina	Leu

Un especialista en la técnica será capaz de determinar variantes adecuadas del polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5 usando técnicas bien conocidas. Para identificar zonas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin sacrificar la actividad biológica, un especialista en la técnica puede dirigirse a zonas que no se piense que son importantes para la actividad. Por ejemplo, cuando se conocen polipéptidos similares con actividades similares de la misma especie de otra especie, un especialista en la técnica puede comparar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IFN-L con dichos polipéptidos similares. Con dicha comparación, se pueden identificar restos y porciones de las moléculas que estén conservadas entre polipéptidos similares. Se entenderá que cambios en zonas de la molécula de IFN-L que no están conservadas respecto a dichos polipéptidos similares será menos probable que afecten desfavorablemente a la actividad biológica y/o la estructura de un polipéptido IFN-L. Un especialista en la técnica también sabrá que, aun en regiones relativamente conservadas, se pueden sustituir los restos de origen natural por aminoácidos químicamente similares conservando la actividad (sustituciones de restos aminoacídicos conservativas). Por lo tanto, incluso zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservativas sin sacrificar la actividad biológica o sin afectar desfavorablemente a la estructura del polipéptido.

Además, un especialista en la técnica puede revisar estudios de estructura-función para identificar restos en polipéptidos similares que sean importantes para la actividad o la estructura. A la vista de dicha comparación, se puede predecir la importancia de restos aminoacídicos en un polipéptido IFN-L que se corresponden con restos amino-

códicos que son importantes para la actividad o estructura en polipéptidos similares. Un especialista en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos restos aminoácidos importantes predichos de polipéptidos IFN-L.

5 Un especialista en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con la estructura en polipéptidos similares. En vista de dicha información, un especialista en la técnica puede predecir el alineamiento de restos aminoácidos del polipéptido IFN-L con respecto a su estructura tridimensional. Un especialista en la técnica puede elegir no realizar cambios radicales en restos aminoácidos que se ha predicho que están en la superficie de la proteína, ya que dichos restos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un especialista en la técnica puede generar variantes de ensayo que contengan una sustitución de un solo aminoácido en cada resto aminoácido. Las variantes pueden explorarse usando ensayos de actividad conocidos por los especialistas en la técnica. Dichas variantes podrían usarse para recopilar información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un resto aminoácido en particular da como resultado una actividad suprimida, indeseablemente reducida o inadecuada, se evitarían las variantes con dicho cambio. En otras palabras, basándose en la información recopilada de dichos experimentos de rutina, un especialista en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deben evitarse sustituciones adicionales, ya sean en solitario o en combinación con otras mutaciones.

20 Varias publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véanse, Moulton, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 422-27; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13: 222-45; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113: 211-22; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47: 45-48; Chou *et al.*, 1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47: 251-276; y Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26: 367-84. Además, actualmente están disponibles programas informáticos para facilitar la predicción de la estructura secundaria. Un método para predecir la estructura secundaria se basa en el modelado por homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia superior al 30%, o una similitud superior al 40%, tienen con frecuencia topologías estructurales similares. El reciente crecimiento de la base de datos estructurales de proteínas (PDB) ha proporcionado una predictibilidad mejorada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de plegamientos dentro de la estructura de un polipéptido o proteína. Véase Holm, *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res.* 27: 244-47. Se ha sugerido que existe un número limitado de plegamientos en un polipéptido o proteína dada y que, una vez que se han resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural se volverá notablemente más precisa (Brenner *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 369-76).

35 Los métodos adicionales para la predicción de la estructura secundaria incluyen el “enhebrado” (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 377-87; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4: 15-19), el “análisis del perfil” (Bowie *et al.*, 1991, *Science*, 253: 164-70; Gribskov *et al.*, 1990, *Methods Enzymol.* 183: 146-59; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 4355-58) y la “conexión evolutiva” (Véanse Holm *et al.*, anteriormente, y Brenner *et al.*, anteriormente).

Las variantes del polipéptido IFN-L descritas incluyen variantes de glicosilación en las que se ha alterado el número y/o el tipo de sitios de glicosilación en comparación con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5. En una realización, las variantes del polipéptido IFN-L comprenden un mayor o un menor número de sitios de glicosilación ligados a N que la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5. Un sitio de glicosilación ligado a N está caracterizado por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que el resto aminoácido denominado X puede ser cualquier resto aminoácido excepto prolina. La sustitución de restos aminoácidos para generar esta secuencia proporciona un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena de hidratos de carbono ligada a N. Como alternativa, las sustituciones que eliminen esta secuencia eliminarán una cadena de hidratos de carbono ligada a N existente. También se describe una reorganización de las cadenas de hidratos de carbono ligadas a N en la que se eliminan uno o más sitios de glicosilación ligados a N (típicamente, los que son de origen natural) y se generan uno o más nuevos sitios ligados a N. Las variantes de IFN-L adicionales incluyen variantes de cisteína, en las que se delecionan o sustituyen uno o más restos de cisteína con otros aminoácidos (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5. Las variantes de cisteína son útiles cuando los polipéptidos IFN-L tienen que volver a plegarse en una conformación biológicamente activa, tal como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína tienen, generalmente, menos restos de cisteína que la proteína nativa y, típicamente, tienen un número par para minimizar las interacciones que resultan de cisteínas desemparejadas.

55 Además, las moléculas de ácido nucleico relacionadas comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, como se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5, con al menos una inserción de un aminoácido y en la que el polipéptido tienen una actividad del polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5, o una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, como se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5, con al menos una delección de un aminoácido y en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5. Las moléculas de ácido nucleico relacionadas también comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, como se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5, en la que el polipéptido tiene un truncamiento carboxilo-terminal y/o amino-terminal y en la que además el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5. Las moléculas de ácido nucleico relacionadas también comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, como se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5, con al menos una modificación seleccionada del grupo constituido por sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamientos carboxilo-terminales y truncamientos amino-terminales y en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5.

Además, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 o de la SEC ID N°: 5 u otro polipéptido IFN-L, puede fusionarse con un polipéptido homólogo para formar un homodímero o con un polipéptido heterólogo para formar un heterodímero. Los péptidos y polipéptidos heterólogos incluyen, pero sin limitación: un epítipo para permitir la detección y/o el aislamiento y un polipéptido de fusión IFN-L; una proteína receptora transmembrana o una porción de la misma, tal como un dominio extracelular o un dominio transmembrana e intracelular; un ligando o una porción del mismo que se una a una proteína receptora transmembrana; una enzima o una porción de la misma que sea catalíticamente activa; un polipéptido o péptido que promueva la oligomerización, tal como un dominio de cremallera de leucina; un polipéptido o péptido que aumente la estabilidad, tal como una región constante de inmunoglobulina; y un polipéptido que tenga una actividad terapéutica diferente de la del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5 u otro polipéptido IFN-L.

Pueden realizarse fusiones en el extremo amino-terminal o en el extremo carboxilo-terminal del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2 o en la SEC ID N°: 5 u otro polipéptido IFN-L. Las fusiones pueden ser directas, sin ninguna molécula enlazadora o adaptadora, o pueden ser mediante una molécula enlazadora o adaptadora. Una molécula enlazadora o adaptadora puede tener uno o más restos aminoácídicos, típicamente, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 restos aminoácídicos. Una molécula enlazadora o adaptadora también puede diseñarse con un sitio de escisión para una endonucleasa de restricción de ADN o para una proteasa para permitir la separación de los restos fusionados. Se entenderá que una vez construidos, los polipéptidos de fusión pueden derivatizarse de acuerdo con los métodos que se describen en este documento.

En una realización de la invención, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 u otro polipéptido IFN-L se fusiona con uno o más dominios de una región Fc de IgG humana. Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes, un dominio variable conocido como "Fab", que se une a un antígeno, y un dominio constante conocido como "Fc", que está implicado en funciones efectoras tales como la activación del complemento y el ataque mediante células fagocíticas. Una Fc tiene una larga vida media en suero, mientras que una Fab tiene una vida media más corta. Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337: 525-31. Cuando se construyen junto con una proteína terapéutica, un dominio Fc puede proporcionar una vida media más larga o incorporar funciones como la unión a un receptor de Fc, la unión a proteína A, la fijación del complemento y, quizá, incluso la transferencia placentaria. Ídem. La Tabla II resume el uso de ciertas fusiones con Fc conocidas en la técnica.

TABLA II

Fusión de Fc con proteínas terapéuticas

Forma de Fc	Compañero de fusión	Implicaciones terapéuticas	Bibliografía
IgG1	Extremo N-terminal de CD30-L	Enfermedad de Hodgkin; linfoma anaplástico; leucemia de células T	Patente de EE.UU. N° 5.480.981
Fcy2a murina	IL-10	antiinflamatoria; rechazo de trasplantes	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154: 5590-600
IgG1	Receptor de TNF	choque séptico	Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334: 1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> , 1996, <i>J. Immunol.</i> 156: 2221-30

5	IgG, IgA, IgM o IgE (excluyendo el primer dominio)	Receptor de TNF	inflamación, trastornos autoinmunes	Patente de EE.UU. N° 5.808.029
10	IgG1	Receptor de CD4	SIDA	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
15	IgG1, IgG3	Extremo N-terminal de IL-2	anticancerosa, antiviral	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1: 95-105
20	IgG1	Extremo C-terminal de OPG	artrosis; densidad ósea	Documento WO 97/23614
25	IgG1	Extremo N-terminal de leptina	anti-obesidad	Documento PCT/US 97/23183, presentado el 11 de diciembre de 1997
30	IgC γ 1 humana	CTLA-4	trastornos autoinmunes	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> 174: 561-69
35				

En un ejemplo, una región bisagra, CH2 y CH3 de IgG humana puede fusionarse en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal de los polipéptidos IFN-L usando métodos conocidos por los especialistas en la técnica. En otro ejemplo, una región bisagra, CH2 y CH3 de IgG humana puede fusionarse en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal de un fragmento del polipéptido IFN-L (por ejemplo, la porción extracelular predicha del polipéptido IFN-L).

El polipéptido de fusión IFN-L resultante puede purificarse mediante el uso de una columna de afinidad de proteína A. Se ha descubierto que los péptidos y proteínas fusionados con una región Fc presentan una vida media sustancialmente más larga *in vivo* que los equivalentes no fusionados. Además, una fusión con una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc de origen natural o puede modificarse para mejorar ciertas cualidades, tales como las cualidades terapéuticas, el tiempo de circulación o una agregación reducida.

La identidad y la similitud de moléculas de ácido nucleico y polipéptidos relacionados se calculan fácilmente por métodos conocidos. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, los que se describen en *Computational Molecular Biology* (A. M. Lesk, ed., Oxford University Press 1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (D. W. Smith, ed., Academic Press 1993); *Computer Analysis of Sequence Data* (Parte I, A. M. Griffin y H. G. Griffin, eds., Humana Press 1994); G. von Heinle, *Sequence Analysis in Molecular Biology* (Academic Press 1987); *Sequence Analysis Primer* (M. Gribskov y J. Devereux, eds., M. Stockton Press 1991); y Carrillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073.

Se diseñan métodos preferidos para determinar la identidad y/o la similitud para dar el mayor emparejamiento posible entre las secuencias que se analizan. Se describen métodos para determinar la identidad y la similitud en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Res.* 12: 387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10). El programa BLASTX está disponible públicamente del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (Altschul *et al.*, *BLAST Manual* (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschul *et al.*, 1990, anteriormente). También puede usarse el bien conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

ES 2 300 280 T3

Ciertos programas de alineamiento para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado el emparejamiento de sólo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy elevada aunque no exista una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, en una realización preferida, el método de alineamiento seleccionado (programa GAP) dará como

Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), dos polipéptidos para los que hay que determinar el porcentaje de identidad de secuencia se alinean para un emparejamiento óptimo de sus respectivos aminoácidos (el “espacio de alineamiento”, determinado por el algoritmo). Se usan junto con el algoritmo una penalización por apertura de huecos (que se calcula como 3X la diagonal media; la “diagonal media” es la media de la diagonal de la matriz de comparación que se usa; la “diagonal” es la puntuación o número que se asigna a cada emparejamiento de aminoácidos perfecto por la matriz de comparación en particular) y una penalización por extensión de huecos (que es habitualmente 0,1X la penalización por apertura de huecos), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62. El algoritmo también usa una matriz de comparación convencional (véanse, Dayhoff *et al.*, 5 *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Supl. 3 1978) (matriz de comparación PAM250); Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89: 10915-19 (matriz de comparación BLOSUM 62).

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias polipeptídicas incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-53;

Matriz de comparación: BLOSUM 62 (Henikoff *et al.*, anteriormente);

Penalización por huecos: 12

Penalización por longitud de huecos: 4

Umbral de similitud: 0

El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de polipéptidos (junto con ninguna penalización para huecos terminales) usando el algoritmo GAP.

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de moléculas de ácido nucleico incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, anteriormente;

Matriz de comparación: emparejamientos = +10, emparejamientos erróneos = 0

Penalización por huecos: 50

Penalización por longitud de huecos: 3

El programa GAP también es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de moléculas de ácido nucleico.

Pueden usarse otros algoritmos ejemplares, penalizaciones por apertura de huecos, penalizaciones por extensión de huecos, matrices de comparación y umbrales de similitud, incluyendo los que se describen en el manual del programa Wisconsin Package, versión 9, septiembre de 1997. Las selecciones en particular a realizar serán evidentes para los especialistas en la técnica y dependerán de la comparación específica a realizar, tal como ADN contra ADN, proteína contra proteína, proteína contra ADN; y, además, de si la comparación es entre parejas de secuencias dadas (en cuyo caso se prefieren generalmente GAP o BestFit) o entre una secuencia y una gran base de datos de secuencias (en cuyo caso se prefieren FASTA o BLASTA).

Moléculas de ácido nucleico

Las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IFN-L pueden obtenerse fácilmente de una diversidad de formas que incluyen, sin limitación, síntesis química, exploración de una genoteca genómica o de ADNc, exploración de una genoteca de expresión y/o amplificación por PCR de ADNc.

Los métodos de ADN recombinante que se usan en este documento son generalmente los que se describen en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) y/o *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. y Wiley and Sons, 1994). La invención proporciona moléculas de ácido nucleico, como se describen en este documento, y métodos para obtener dichas moléculas.

5 Cuando se ha identificado un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IFN-L de una especie, puede usarse todo o una porción de ese gen como sonda para identificar genes ortólogos o relacionados de la misma especie. Las sondas o cebadores pueden usarse para explorar genotecas de ADNc de diversas fuentes de tejido que se piensa que expresan el polipéptido IFN-L. Además, puede usarse una parte o toda una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia que se muestra en la SEC ID N°: 1 o en la SEC ID N°: 4 para explorar una genoteca genómica para identificar y aislar un gen que codifique la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IFN-L. Típicamente, se emplearán condiciones de rigurosidad moderada o alta para la exploración para minimizar el número de falsos positivos que se obtienen en la exploración.

10 También pueden identificarse moléculas de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos de polipéptidos IFN-L mediante la clonación y expresión, que emplea la detección de clones positivos en base a una propiedad de la proteína expresada. Típicamente, las genotecas de ácidos nucleicos se exploran mediante la unión de un anticuerpo u otro compañero de unión (por ejemplo, receptor o ligando) con proteínas clonadas que se expresan y se presentan en la superficie de una célula hospedadora. El anticuerpo o compañero de unión se modifica con un marcador detectable para identificar las células que expresan el clon deseado.

Pueden seguirse las técnicas de expresión recombinante, llevadas a cabo de acuerdo con las descripciones que se exponen a continuación, para producir estos polinucleótidos y para expresar los polipéptidos codificados. Por ejemplo, mediante la inserción de una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IFN-L en un vector apropiado, un especialista en la técnica puede producir fácilmente grandes cantidades de la secuencia de nucleótidos deseada. Después, las secuencias pueden usarse para generar sondas de detección o cebadores de amplificación. Como alternativa, puede insertarse un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IFN-L en un vector de expresión. Mediante la introducción del vector de expresión en un hospedador apropiado, el polipéptido IFN-L codificado puede producirse en grandes cantidades.

25 Otro método para obtener una secuencia de ácido nucleico adecuada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este método, se prepara el ADNc a partir del ARN poli(A)+ o ARN total usando la enzima transcriptasa inversa. Después, se añaden dos cebadores, típicamente complementarios a dos regiones distintas del ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IFN-L, al ADNc junto una polimerasa tal como polimerasa *Taq* y la polimerasa amplifica la región de ADNc entre los dos cebadores.

Otro medio para preparar una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IFN-L es la síntesis química usando métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica, tales como los que se describen en Engels *et al.*, 1989, *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28: 716-34. Estos métodos incluyen, entre otros, los métodos del fosfotriéster, de la fosforamidita y del H-fosfonato para la síntesis de ácidos nucleicos. Un método preferido para dicha síntesis química es la síntesis sobre soportes de polímero usando química de fosforamidita convencional. Típicamente, el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IFN-L tendrá varios cientos de nucleótidos de longitud. Pueden sintetizarse ácidos nucleicos más largos de aproximadamente 100 nucleótidos como varios fragmentos usando estos métodos. Después, los fragmentos pueden ligarse para juntos formar la secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen de IFN-L. Habitualmente, el fragmento de ADN que codifica el extremo amino-terminal del polipéptido tendrá un ATG, que codifica un resto de metionina. Esta metionina puede o no estar presente en la forma madura del polipéptido IFN-L, dependiendo de si el polipéptido producido en la célula hospedadora está diseñado para secretarse por esa célula. También pueden usarse otros métodos conocidos por los especialistas.

45 En algunas realizaciones, las variantes de ácido nucleico contienen codones que se han alterado para una expresión óptima de un polipéptido IFN-L en una célula hospedadora dada. Las alteraciones de codones en particular dependerán del polipéptido IFN-L y de la célula hospedadora seleccionada para la expresión. Dicha “optimización de codones” puede realizarse por una diversidad de métodos, por ejemplo, mediante la selección de codones que se prefieren para su uso en genes altamente expresados en una célula hospedadora dada. Pueden usarse algoritmos informáticos que incorporan tablas de frecuencia de codones, tales como “Eco_high.Cod” para preferencia de codones de genes bacterianos altamente expresados, y se proporcionan en el University of Wisconsin Package Versión 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI). Otras tablas de frecuencia de codones útiles incluyen “Celegans_high.cod”, “Celegans_low.cod”, “Drosophila_high.cod”, “Human_high.cod”, “Maize_high.cod” y “Yeast_high.cod”.

55 En algunos casos, puede ser deseable preparar moléculas de ácido nucleico que codifiquen variantes de polipéptidos IFN-L. Pueden producirse moléculas de ácido nucleico que codifiquen variantes usando mutagénesis dirigida, amplificación por PCR u otros métodos apropiados en los que el cebador o cebadores tengan las mutaciones puntuales deseadas (véanse, Sambrook *et al.*, anteriormente, y Ausubel *et al.*, anteriormente, para descripciones de las técnicas de mutagénesis). También puede usarse la síntesis química, mediante el uso de métodos que se describen en Engels *et al.*, anteriormente, para preparar dichas variantes. También pueden usarse otros métodos conocidos por los especialistas.

65 Vectores y células hospedadoras

Una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IFN-L se inserta en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligamiento convencionales. Típicamente, el vector se selecciona para que sea funcional en la célula hospedadora en particular que se emplea (es decir, el vector es compatible con

la maquinaria de la célula hospedadora de tal modo que pueda producirse la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IFN-L puede amplificarse o expresarse en células hospedadoras procariotas, de levaduras, de insectos (sistemas de baculovirus) y/o eucariotas. La selección de la célula hospedadora dependerá de si el polipéptido IFN-L debe modificarse postraducionalmente (por ejemplo, glicosilarse y/o fosforilarse). Si es así, son preferibles células hospedadoras de levaduras, insectos o mamíferos. Para una revisión sobre vectores de expresión, véase *Meth. Enz.*, vol. 185 (D. V. Goeddel, ed., Academic Press 1990).

Típicamente, los vectores de expresión que se usan en cualquiera de las células hospedadoras contendrán secuencias para el mantenimiento de plásmidos y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Dichas secuencias, denominadas en conjunto como “secuencias flanqueantes” incluirán típicamente en ciertas realizaciones una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio donante y aceptor de corte y empalme, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción del polipéptido, un sitio de unión a ribosomas, una secuencia de poliadenilación, una región polienlazadora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar y un elemento marcador de selección. Cada una de estas secuencias se describe a continuación.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia codificante de una “etiqueta”, es decir, una molécula oligonucleotídica localizada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante del polipéptido IFN-L; la secuencia oligonucleotídica codifica poliHis (tal como hexaHis) u otra “etiqueta”, tal como FLAG, HA (hemaglutinina de virus influenza) o *myc*, para las que existen anticuerpos disponibles en el mercado. Esta etiqueta se fusiona típicamente con el polipéptido tras la expresión del polipéptido y puede servir como medio para la purificación por afinidad del polipéptido IFN-L a partir de la célula hospedadora. La purificación por afinidad puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante una cromatografía en columna usando anticuerpos contra la etiqueta como matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede eliminarse posteriormente del polipéptido IFN-L purificado por diversos medios tales como el uso de ciertas peptidasas para la escisión.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heterólogas (es decir, de una especie distinta a la especie o cepa de la célula hospedadora), híbridas (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente) o sintéticas, o las secuencias flanqueantes pueden ser secuencias nativas que funcionan normalmente para regular la expresión del polipéptido IFN-L. Así, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado o cualquier planta, con tal de que la secuencia flanqueante sea funcional en, y pueda activarse por, la maquinaria de la célula hospedadora.

Pueden obtenerse secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta invención por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Típicamente, las secuencias flanqueantes útiles en este documento -distintas de las secuencias flanqueantes del gen IFN-L- se habrán identificado previamente mediante mapeo y/o digestión con endonucleasas de restricción y, por lo tanto, pueden aislarse de la fuente de tejido apropiada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, puede conocerse la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante. En este caso, la secuencia flanqueante puede sintetizarse usando los métodos que se describen en este documento para la síntesis o clonación de ácidos nucleicos.

Cuando se conoce toda o sólo una porción de la secuencia flanqueante, ésta puede obtenerse mediante el uso de PCR y/o mediante exploración de una genoteca genómica con un oligonucleótido y/o fragmento de secuencia flanqueante adecuado de la misma o de otra especie. Cuando no se conoce la secuencia flanqueante, puede aislarse un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante a partir de un fragmento más largo de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede llevarse a cabo mediante la digestión con endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado, seguida del aislamiento usando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA) u otros métodos conocidos por los especialistas. La selección de enzimas adecuadas para lograr este fin será fácilmente evidente para un especialista en la técnica.

Un origen de replicación es, típicamente, una parte de esos vectores de expresión procariotas que se adquieren en el mercado y el origen contribuye a la amplificación del vector en una célula hospedadora. La amplificación del vector hasta cierto número de copias puede ser, en algunos casos, importante para la expresión óptima de un polipéptido IFN-L. Si el vector de elección no contiene un sitio de origen de replicación, puede sintetizarse uno químicamente basándose en una secuencia conocida y ligarse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas y diversos orígenes (por ejemplo, de SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o papilomavirus, tales como HPV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. Generalmente, no se necesita el componente de origen de replicación para los vectores de expresión de mamíferos (por ejemplo, el origen de SV40 se usa frecuentemente sólo porque contiene el promotor temprano).

Una secuencia de terminación de la transcripción se localiza típicamente 3' al extremo de una región codificante de un polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Habitualmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia poli-T. Aunque la secuencia

se clona fácilmente a partir de una genoteca o incluso se adquiere en el mercado como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos como los que se describen en este documento.

Un elemento génico marcador de selección codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula hospedadora que se cultiva en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células hospedadoras procariotas; (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de los medios complejos. Los marcadores de selección preferidos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. También puede usarse un gen de resistencia a neomicina para la selección en células hospedadoras procariotas y eucariotas.

Pueden usarse otros genes de selección para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es el proceso por el que los genes que más se demandan para la producción de una proteína crítica para el crecimiento se repiten en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores de selección adecuados para células de mamíferos incluyen la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la timidina quinasa. Las células de mamífero transformantes se colocan en condiciones de presión de selección en las que sólo las transformantes están excepcionalmente adaptadas para sobrevivir en virtud del gen de selección presente en el vector. La presión de selección se impone mediante el cultivo de las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se cambia sucesivamente, conduciendo de este modo a la amplificación tanto del gen de selección como del ADN que codifica un polipéptido IFN-L. Como resultado, se sintetizan cantidades aumentadas de polipéptido IFN-L a partir del ADN amplificado.

Habitualmente es necesario un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). Típicamente, el elemento se localiza en posición 3' al promotor y 5' a la secuencia codificante de un polipéptido IFN-L a expresar. La secuencia de Shine-Dalgarno es variada, pero típicamente es una polipurina (es decir, que tiene un contenido elevado de A-G). Se han identificado muchas secuencias de Shine-Dalgarno, cada una de las cuales puede sintetizarse fácilmente, usando métodos que se describen en este documento, y usarse en un vector procariota.

Puede usarse una secuencia líder o de señal para dirigir un polipéptido IFN-L hacia el exterior de la célula hospedadora. Típicamente, una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de señal está colocada en la región codificante de una molécula de ácido nucleico de IFN-L o directamente en el extremo 5' de una región codificante de un polipéptido IFN-L. Se han identificado muchas secuencias de señal y puede usarse cualquiera de ellas que sea funcional en la célula hospedadora seleccionada junto con una molécula de ácido nucleico de IFN-L. Por lo tanto, una secuencia de señal puede ser homóloga (de origen natural) o heteróloga a la molécula de ácido nucleico de IFN-L. Además, una secuencia de señal puede sintetizarse químicamente usando métodos que se describen en este documento. En la mayoría de los casos, la secreción de un polipéptido IFN-L a partir de la célula hospedadora a través de la presencia de un péptido señal dará como resultado la eliminación del péptido señal del polipéptido IFN-L secretado. La secuencia de señal puede ser un componente del vector o puede ser una parte de una molécula de ácido nucleico de IFN-L que se inserta en el vector.

Dentro del alcance de esta invención se incluye el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de señal nativa del polipéptido IFN-L unida a una región codificante del polipéptido IFN-L o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de señal heteróloga unida a una región codificante del polipéptido IFN-L. La secuencia de señal heteróloga seleccionada debería ser una que se reconozca y se procese, es decir, se escinda, por una peptidasa de señal por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan la secuencia de señal nativa del polipéptido IFN-L, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de la fosfatasa alcalina, la penicilinasasa o la enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levaduras, la secuencia de señal nativa del polipéptido IFN-L puede sustituirse por los líderes de la invertasa, del factor alfa o de la fosfatasa ácida de levaduras. En la expresión de células de mamíferos, la secuencia de señal nativa es adecuada, aunque pueden ser adecuadas otras secuencias de señal de mamíferos.

En algunos casos, tales como en los que se desea la glicosilación en un sistema de expresión de célula hospedadora eucariota, se pueden manipular las diversas presecuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de la peptidasa de un péptido señal en particular o añadir presecuencias que también pueden afectar a la glicosilación. El producto proteico final puede tener, en la posición -1 (con respecto al primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos inherentes a la expresión que pueden no haberse eliminado totalmente. Por ejemplo, el producto proteico final puede tener uno o dos restos aminoacídicos que se encuentran en el sitio de escisión de la peptidasa, unidos al extremo amino-terminal. Como alternativa, el uso de algunos sitios de escisión enzimática puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido IFN-L deseado si la enzima corta en dicha zona dentro del polipéptido maduro.

En muchos casos, la transcripción de una molécula de ácido nucleico se aumenta por la presencia de uno o más intrones en el vector; esto es particularmente cierto cuando se produce un polipéptido en células hospedadoras eucariotas, especialmente en células hospedadoras de mamíferos. Los intrones que se usan pueden ser de origen natural

dentro del gen de IFN-L, especialmente cuando el gen que se usa es una secuencia genómica de longitud completa o un fragmento de la misma. Cuando el intrón no es de origen natural dentro del gen (como para la mayoría de los ADNc), el intrón puede obtenerse de otra fuente. Generalmente, la posición del intrón con respecto a las secuencias flanqueantes y al gen de IFN-L es importante, ya que el intrón debe transcribirse para que sea eficaz. Por lo tanto, cuando se transcribe una molécula de ADNc de IFN-L, la posición preferida para el intrón es 3' al sitio de inicio de la transcripción y 5' a la secuencia de terminación de la transcripción poli-A. Preferiblemente, el intrón o intrones se localizarán a un lado o al otro (es decir, 5' o 3') del ADNc, de tal modo que no interrumpan la secuencia codificante. Puede usarse cualquier intrón de cualquier fuente, incluyendo organismos virales, procariotas y eucariotas (plantas o animales) para la práctica de esta invención, con tal de que sea compatible con la célula hospedadora en la que se inserta. También se incluyen en este documento intrones sintéticos. Opcionalmente, puede usarse más de un intrón en el vector.

Típicamente, los vectores de expresión y clonación de la presente invención contendrán un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y que está unido operativamente a la molécula que codifica el polipéptido IFN-L. Los promotores son secuencias que no transcriben que se localizan cadena arriba (es decir, 5') al codón de inicio de un gen estructural (generalmente, dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles aumentados de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tal como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Los promotores constitutivos, por otro lado, inician una producción continua del producto génico; es decir, hay escaso o ningún control sobre la expresión génica. Se conocen un gran número de promotores, que son reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. Un promotor adecuado se une operativamente al ADN que codifica el polipéptido IFN-L mediante la eliminación del promotor del ADN fuente por digestión con enzimas de restricción y la inserción de la secuencia promotora deseada en el vector. La secuencia promotora nativa de IFN-L puede usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de una molécula de ácido nucleico de IFN-L. Sin embargo, se prefiere un promotor heterólogo si permite una mayor transcripción y mayores rendimientos de la proteína expresada en comparación con el promotor nativo y si es compatible con el sistema de célula hospedadora que se ha seleccionado para usar.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de la beta-lactamasa y la lactosa; de la fosfatasa alcalina; un sistema promotor del triptófano (trp); y promotores híbridos tales como el promotor tac. También son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias se han publicado, permitiendo de este modo que un especialista en la técnica pueda ligarlos con la secuencia de ADN deseada, usando enlazadores o adaptadores cuando sea necesario para suministrar cualquier sitio de restricción útil.

También se conocen bien en la técnica promotores adecuados para su uso con hospedadores de levaduras. Se usan ventajosamente potenciadores de levaduras con promotores de levaduras. Se conocen bien promotores adecuados para su uso con células hospedadoras de mamíferos e incluyen, pero sin limitación, los que se obtienen de los genomas de virus tales como virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y, más preferiblemente, virus del simio 40 (SV40). Otros promotores de mamíferos adecuados incluyen promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de la actina.

Los promotores adicionales que pueden ser de interés para controlar la expresión génica de IFN-L incluyen, pero sin limitación: la región promotora temprana de SV40 (Berneis y Chambon, 1981, *Nature* 290: 304-10); el promotor de CMV; el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22: 787-97); el promotor de la timidina quinasa de herpes (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1444-45); las secuencias reguladoras del gen de la metalotionina (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296: 39-42); de vectores de expresión procariotas, tales como el promotor de la beta-lactamasa (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 3727-31); o el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 21-25). También son de interés las siguientes regiones de control de la transcripción en animales, que presentan especificidad de tejido y que se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de la elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38: 639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7: 425-515); la región de control del gen de la insulina, que es activa en células pancreáticas beta (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-22); la región de control del gen de la inmunoglobulina, que es activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38: 647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318: 533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 1436-44); la región de control del virus del tumor mamario del ratón, que es activa en células testiculares, mamas, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45: 485-95); la región de control del gen de la albúmina, que es activa en hígado (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1: 268-76); la región de control del gen de la alfa-fetoproteína, que es activa en hígado (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235: 53-58); la región de control del gen de la alfa 1-antitripsina, que es activa en el hígado (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1: 161-71); la región de control del gen de la beta-globina, que es activa en células mieloides (Mogam *et al.*, 1985, *Nature* 315: 338-40; Kollias, *et al.*, 1986, *Cell* 46: 89-94); la región de control del gen de la proteína básica de mielina, que es activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48: 703-12); la región de control del gen de la cadena ligera-2 de la miosina, que es activa en músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314: 283-86); y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropinas, que es activa en el hipotálamo (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234: 1372-78).

Puede insertarse una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción de un ADN que codifica un polipéptido IFN-L de la presente invención por eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente de aproximadamente 10-300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y de la posición. Se han localizado en posición 5' y 3' a la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamíferos (por ejemplo, de la globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina). Sin embargo, típicamente, se usará un potenciador de un virus. Son elementos potenciadores ejemplares para la activación de promotores eucariotas el potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del poliovirus y potenciadores de adenovirus. Aunque un potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' a una molécula de ácido nucleico de IFN-L, típicamente se localiza en un sitio en posición 5' al promotor.

Pueden construirse vectores de expresión de la invención a partir de un vector de partida, tal como un vector disponible en el mercado. Dichos vectores pueden contener o no todas las secuencias flanqueantes deseadas. Aunque no estén ya presentes en el vector una o más de las secuencias flanqueantes que se describen en este documento, pueden obtenerse individualmente y ligarse en el vector. Un especialista en la técnica conoce bien métodos que se usan para obtener cada una de las secuencias flanqueantes.

Los vectores preferidos para la práctica de esta invención son los que son compatibles con células hospedadoras bacterianas, de insectos y de mamíferos. Dichos vectores incluyen, entre otros, pCRII, pCR3 y pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alfa (Publicación PCT N° WO 90/14363) y pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Los vectores adecuados adicionales incluyen, pero sin limitación, cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero se entenderá que el sistema de vector debe ser compatible con la célula hospedadora seleccionada. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, plásmidos tales como derivados del plásmido Bluescript® (un fagémido basado en ColE1 de elevado número de copias, Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA), plásmidos de clonación por PCR diseñados para clonar productos de PCR amplificados con Taq (por ejemplo, TOPO™ TA Cloning® Kit, derivados del plásmido PCR2.1®, Invitrogen, Carlsbad, CA) y vectores de mamíferos, levaduras o virus tales como un sistema de expresión de baculovirus (derivados del plásmido pBacPAK, Clontech, Palo Alto, CA).

Después de que se haya construido el vector y se haya insertado una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido IFN-L en el sitio apropiado del vector, el vector final puede insertarse en una célula hospedadora adecuada para la amplificación y/o expresión del polipéptido. La transformación de un vector de expresión para un polipéptido IFN-L en una célula hospedadora seleccionada puede llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos que incluyen métodos tales como transfección, infección, cloruro cálcico, electroporación, microinyección, lipofección, método dextrano-DEAE u otras técnicas conocidas. El método seleccionado estará en parte en función del tipo de célula hospedadora a usar. Estos métodos y otros métodos adecuados se conocen bien por los especialistas y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, anteriormente.

Las células hospedadoras pueden ser células hospedadoras procariotas (tales como *E. coli*) o células hospedadoras eucariotas (tales como células de levaduras, insectos o vertebrados). La célula hospedadora, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, sintetiza un polipéptido IFN-L que puede recogerse posteriormente del medio de cultivo (si la célula hospedadora lo secreta al medio) o directamente a partir de la célula hospedadora que lo produce (si no se secreta). La selección de una célula hospedadora apropiada dependerá de diversos factores, tales como los niveles de expresión deseados, las modificaciones del polipéptido que son deseables o necesarias para su actividad (tales como glicosilación o fosforilación) y la facilidad para plegarse en una molécula biológicamente activa.

Se conocen en la técnica varias células hospedadoras adecuadas y muchas están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, células de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células CHO DHFR(-) (Urlaub *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 4216-20), células embrionarias de riñón humano (HEK) 293 o 293T o células 3T3. La selección de células hospedadoras de mamífero adecuadas y los métodos para la transformación, cultivo, amplificación, selección, producción de producto y purificación, se conocen en la técnica. Otras líneas celulares de mamíferos adecuadas son las líneas celulares de mono COS-1 y COS-7 y la línea celular CV-1. Las células hospedadoras de mamíferos ejemplares adicionales incluyen líneas celulares de primates y líneas celulares de roedores, incluyendo líneas celulares transformadas. También son adecuadas células diploides normales, cepas celulares procedentes de cultivos *in vitro* de tejidos primarios, así como explantes primarios. Las células candidatas pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección o pueden contener un gen de selección que actúe de forma dominante. Otras líneas celulares de mamíferos adecuadas incluyen, pero sin limitación, células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 procedentes de ratones Swiss, Balb-c o NIH y líneas celulares de hámster BHK o HaK. Cada una de estas líneas celulares se conoce y está disponible para los especialistas en la técnica de la expresión de proteínas.

Las células bacterianas son útiles de una forma similar como células hospedadoras adecuadas para la presente invención. Por ejemplo, las diversas cepas de *E. coli* (por ejemplo, HB101, DH5α, DH10 y MC1061) se conocen bien como células hospedadoras en el campo de la biotecnología. También pueden emplearse en este método diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, otros *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* y similares.

También están disponibles muchas cepas de células de levaduras conocidas por los especialistas en la técnica como células hospedadoras para la expresión de los polipéptidos de la presente invención. Las células de levaduras preferidas incluyen, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Además, cuando se desee, puede utilizarse sistemas de células de insecto en los métodos de la presente invención. Dichos sistemas se describen en, por ejemplo, Kitts *et al.*, 1993, *Biotechniques*, 14: 810-17; Lucklow, 1993, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 564-72; y Lucklow *et al.*, 1993, *J Virol.*, 67: 4566-79. Las células de insecto preferidas son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen).

También se pueden usar animales transgénicos para expresar polipéptidos IFN-L glicosilados. Por ejemplo, se puede usar un animal transgénico que produzca leche (una vaca o cabra, por ejemplo) y obtener el presente polipéptido glicosilado en la leche del animal. También se pueden usar plantas para producir polipéptidos IFN-L, sin embargo, en general, la glicosilación que se produce en plantas es diferente de la que se produce en células de mamíferos y puede dar como resultado un producto glicosilado que no sea adecuado para uso terapéutico en humanos.

Producción de polipéptidos

Las células hospedadoras que comprenden un vector de expresión del polipéptido IFN-L pueden cultivarse usando medios convencionales bien conocidos por los especialistas. Los medios contendrán habitualmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células. Los medios adecuados para el cultivo de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, caldo de Luria (LB) y/o caldo Terrific (TB). Los medios adecuados para el cultivo de células eucariotas incluyen medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), Medio Mínimo Esencial (MEM) y/o medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEN), pudiendo todos suplementarse con suero y/o factores de crecimiento cuando sea necesario para la línea celular en particular que se cultive. Un medio adecuado para cultivos de insectos es el medio de Grace suplementado con Yeastolate, hidrolizado de lactoalbúmina y/o suero fetal de ternero, cuando sea necesario.

Típicamente, se añade un antibiótico u otro compuesto útil para el cultivo selectivo de células transfectadas o transformadas como suplemento en los medios. El compuesto a usar estará determinado por el elemento marcador de selección presente en el plásmido con el que se transformó la célula hospedadora. Por ejemplo, cuando el elemento marcador de selección es la resistencia a kanamicina, el compuesto que se añade al medio de cultivo será kanamicina. Otros compuestos para el cultivo selectivo incluyen ampicilina, tetraciclina y neomicina.

La cantidad de un polipéptido IFN-L producida por una célula hospedadora puede evaluarse usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitación, análisis por transferencia de Western, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel no desnaturizante, separación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), inmunoprecipitación y/o ensayos de actividad tales como ensayos de unión al ADN mediante cambios en la movilidad electroforética.

Si un polipéptido IFN-L se ha diseñado para secretarse a partir de las células hospedadoras, la mayoría del polipéptido se encontrará en el medio de cultivo celular. Sin embargo, si el polipéptido IFN-L no se secreta a partir de las células hospedadoras, estará presente en el citoplasma y/o el núcleo (para células hospedadoras eucariotas) o en el citosol (para células hospedadoras bacterianas gram-negativas).

Para un polipéptido IFN-L localizado en el citoplasma y/o núcleo de la célula hospedadora (para células hospedadoras eucariotas) o en el citosol (para células hospedadoras bacterianas), el material intracelular (incluyendo cuerpos de inclusión o bacterias gram-negativas) puede extraerse de la célula hospedadora usando cualquier técnica convencional conocida por el especialista. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden lisarse para liberar el contenido del periplasma o citoplasma mediante prensa francesa, homogeneización y/o sonicación seguida de centrifugación.

Si un polipéptido IFN-L ha formado cuerpos de inclusión en el citosol, los cuerpos de inclusión pueden unirse con frecuencia a la membrana celular interna y/o externa y, de este modo, se encontrará principalmente en el material del sedimento después de la centrifugación. Después, el material del sedimento puede tratarse a pH extremos o con un agente caotrópico, tal como un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea o derivados de urea en presencia de un agente reductor tal como ditiotreitól a pH alcalino o tris carboxietil fosfina a pH ácido para liberar, romper y solubilizar los cuerpos de inclusión. Después, el polipéptido IFN-L solubilizado puede analizarse usando electroforesis en gel, inmunoprecipitación o similares. Si se desea aislar el polipéptido IFN-L el aislamiento puede llevarse a cabo usando métodos convencionales como los que se describen en este documento y en Marston *et al.*, 1990, *Meth. Enz.*, 182: 264-75.

En algunos casos, un polipéptido IFN-L puede no ser biológicamente activo después del aislamiento. Pueden usarse diversos métodos para "volver a plegar" o convertir el polipéptido en su estructura terciaria y generar puentes disulfuro para restaurar su actividad biológica. Dichos métodos incluyen la exposición del polipéptido solubilizado a un pH habitualmente por encima de 7 y en presencia de una concentración en particular de un caótropro. La selección del caótropro es muy similar a las selecciones que se usan para la solubilización de cuerpos de inclusión pero, habitualmente, el caótropro se usa a una concentración menor y no es necesariamente el mismo que los caótropros que se usan para la solubilización. En la mayoría de los casos, la solución de replegamiento/oxidación también contendrá un agente reductor o el agente reductor más su forma oxidada en una proporción específica para generar un potencial redox en

particular que permita que se produzca una redistribución de disulfuros en la formación de los puentes cisteína de la proteína. Algunos de los pares redox comúnmente usados incluyen cisteína/cistamina, glutatión (GSH)/ditiobis GSH, cloruro de cobre, ditioneitol (DTT)/ditiano DTT y 2-2-mercaptoetanol (bME)/ditio-b(ME). En muchos casos, puede usarse o puede ser necesario un codisolvente para aumentar la eficacia del repliegamiento y los reactivos más comunes que se usan para este fin incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, arginina y similares.

Si no se forman cuerpos de inclusión en un grado significativo tras la expresión de un polipéptido IFN-L, entonces el polipéptido se encontrará principalmente en el sobrenadante después de la centrifugación del homogeneizado celular. El polipéptido puede aislarse adicionalmente del sobrenadante usando métodos tales como los que se describen en este documento.

La purificación de un polipéptido IFN-L a partir de una solución puede llevarse a cabo usando una diversidad de técnicas. Si el polipéptido se ha sintetizado de tal modo que contiene una etiqueta tal como hexahistidina (polipéptido IFN-L/hexaHis) u otro péptido pequeño tal como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) o *myc* (Invitrogen, Carlsbad, CA) en su extremo carboxilo-terminal o amino-terminal, puede purificarse en un proceso de una sola etapa haciendo pasar la solución a través de una columna de afinidad en la que la matriz de la columna tenga una alta afinidad por la etiqueta.

Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad al níquel. Por lo tanto, puede usarse una columna de afinidad de níquel (tal como las columnas de níquel de Qiagen®) para la purificación del polipéptido IFN-L/poliHis. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* § 10.11.8 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. y Wiley and Sons 1993).

Además, los polipéptidos IFN-L pueden purificarse mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que sea capaz de reconocer y unirse específicamente a un polipéptido IFN-L.

Otros procedimientos adecuados para la purificación incluyen, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de tamiz molecular, HPLC, electroforesis (incluyendo electroforesis en gel nativo) seguida de elución del gel y concentración isoelectrica preparativa (maquina/técnica "Isoprime", Hoefer Scientific, San Francisco, CA). En algunos casos, pueden combinarse dos o más técnicas de purificación para conseguir una pureza aumentada.

También pueden prepararse polipéptidos IFN-L por métodos de síntesis química (tales como la síntesis de péptidos en fase sólida) usando técnicas conocidas en la técnica tales como las que se describen en Merrifield *et al.*, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Houghten *et al.*, 1985, *Proc Natl Acad Sci. USA* 82: 5132; y Stewart y Young, *Solid Phase Peptides Synthesis* (Pierce Chemical Co. 1984). Dichos polipéptidos pueden sintetizarse con o sin una metionina en el extremo amino-terminal. Los polipéptidos IFN-L sintetizados químicamente pueden oxidarse usando métodos que se describen en esta bibliografía para formar puentes disulfuro. Se espera que los polipéptidos IFN-L sintetizados químicamente tengan una actividad biológica comparable a la de los polipéptidos IFN-L correspondientes producidos de forma recombinante o purificados a partir de fuentes naturales y que, por lo tanto, puedan usarse indistintamente con un polipéptido IFN-L recombinante o natural.

Otro medio de obtener un polipéptido IFN-L es mediante purificación a partir de muestras biológicas tales como tejidos y/o fluidos fuente en los que el polipéptido IFN-L se encuentra naturalmente. Dicha purificación puede realizarse usando métodos para purificación de proteínas que se describen en este documento. La presencia del polipéptido IFN-L durante la purificación puede controlarse, por ejemplo, usando un anticuerpo preparado contra polipéptido IFN-L producido de forma recombinante o fragmentos peptídicos del mismo.

Se conocen en la técnica varios métodos adicionales para producir ácidos nucleicos y polipéptidos y los métodos pueden usarse para producir polipéptidos que tengan especificidad por un polipéptido IFN-L. Véase, por ejemplo, Roberts *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 12297-303, que describe la producción de proteínas de fusión entre un ARNm y su péptido codificado. Véase también, Roberts, 1999, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 268-73. Además, la Patente de Estados Unidos N° 5.824.469 describe métodos para obtener oligonucleótidos capaces de realizar una función biológica específica. El procedimiento implica la generación de un conjunto heterogéneo de oligonucleótidos, teniendo cada uno una secuencia 5' aleatorizada, una secuencia central preseleccionada y una secuencia 3' aleatorizada. El conjunto heterogéneo resultante se introduce en una población de células que no presenten la función biológica deseada. Después, se exploran subpoblaciones de las células para determinar las que presentan una función biológica predeterminada. A partir de esa subpoblación, se aíslan los oligonucleótidos capaces de realizar la función biológica deseada.

Las Patentes de Estados Unidos N° 5.763.192; 5.814.476; 5.723.323; y 5.817.483 describen procesos para producir péptidos o polipéptidos. Esto se realiza mediante la producción de genes estocásticos o fragmentos de los mismos y, después, la introducción de estos genes en células hospedadoras que producen una o más proteínas codificadas por los genes estocásticos. Después, las células hospedadoras se exploran para identificar los clones que producen los péptidos o polipéptidos que tienen la actividad deseada.

Otro método para producir péptidos o polipéptidos se describe en el documento PCT/US98/20094 (WO99/15650) presentado por Athersys, Inc. Conocido como "Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery" (RA-

GE-GD), el proceso implica la activación de la expresión del gen endógeno o la sobreexpresión de un gen mediante métodos de recombinación *in situ*. Por ejemplo, se activa o aumenta la expresión de un gen endógeno mediante la integración de una secuencia reguladora en la célula diana que es capaz de activar la expresión del gen por recombinación no homóloga o ilegítima. El ADN diana se somete primero a radiación y se inserta un promotor genético. Finalmente, el promotor localiza una interrupción delante de un gen, iniciando la transcripción del gen. Esto da como resultado la expresión del péptido o polipéptido deseado.

Se entenderá que también pueden usarse estos métodos para generar genotecas completas de expresión de polipéptidos IFN-L que puedan usarse posteriormente para la exploración fenotípica de alto rendimiento y una diversidad de ensayos, tales como ensayos bioquímicos, ensayos celulares y ensayos de organismos completos (por ejemplo, plantas, ratones, etc.).

Síntesis

Los especialistas en la técnica entenderán que las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos descritas en este documento pueden producirse por medios recombinantes y otros medios.

Agentes de unión selectiva

El término “agente de unión selectiva” se refiere a una molécula que tiene especificidad por uno o más polipéptidos IFN-L. Los agentes de unión selectiva adecuados incluyen anticuerpos y derivados de los mismos. Pueden prepararse agentes de unión selectiva adecuados usando métodos conocidos en la técnica. Un anticuerpo de polipéptido IFN-L ejemplar de la presente invención es capaz de unirse a cierta porción del polipéptido IFN-L, inhibiendo de este modo la unión del polipéptido con un receptor de polipéptido IFN-L.

Están dentro del alcance de la presente invención anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a polipéptidos IFN-L. Los anticuerpos pueden ser policlonales, incluyendo policlonales monoespecíficos; monoclonales (MAB); recombinantes, quiméricos, humanizados, tales como injertados a CDR; humanos; de cadena sencilla; y/o biespecíficos, así como fragmentos; variantes; o derivados de los mismos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen las porciones del anticuerpo que se unen a un epítipo en el polipéptido IFN-L. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen fragmentos Fab y F(ab') generados por escisión enzimática de anticuerpos de longitud completa. Otros fragmentos de unión incluyen los que se generan por técnicas de ADN recombinante, tales como la expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones variables de anticuerpos.

Los anticuerpos policlonales dirigidos contra un polipéptido IFN-L se producen generalmente en animales (por ejemplo, conejos o ratones) por medio de múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de polipéptido IFN-L y un adyuvante. Puede ser útil conjugar un polipéptido IFN-L con una proteína de soporte que sea inmunogénica en la especie a inmunizar, tal como la hemocianina de lapa californiana, albúmina del suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de la tripsina de la soja. Además, se usan agentes agregantes tales como aluminio para potenciar la respuesta inmune. Después de la inmunización, se extrae sangre de los animales y el suero se analiza para determinar el título de anticuerpos anti-polipéptido IFN-L.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra polipéptidos IFN-L se producen usando cualquier método que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares en cultivo continuo. Los ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los métodos del hibridoma de Kohler *et al.*, 1975, *Nature* 256: 495-97 y el método del hibridoma de células B humanas (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133: 3001; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). También se proporcionan en la invención líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales reactivos con polipéptidos IFN-L.

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden modificarse para su uso como agentes terapéuticos. Una realización es un anticuerpo “quimérico” en el que una porción de la cadena pesada (H) y/o ligera (L) es idéntica a, u homóloga a, una secuencia correspondiente en anticuerpos obtenidos de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que las restantes cadenas son idénticas a, u homólogas a, una secuencia correspondiente en anticuerpos obtenidos de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos. También se incluyen fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Véanse, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6851-55.

En otra realización, un anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo “humanizado”. Se conocen bien en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.585.089 y 5.693.762. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene introducidos en él uno o más restos aminoacídicos de una procedencia no humana. La humanización puede realizarse, por ejemplo, usando métodos descritos en la técnica (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522-25; Riechmann *et al.*, 1998, *Nature* 332: 323-27; Verhoeven *et al.*, 1988; *Science* 239: 1534-36), mediante la sustitución con al menos una porción de una región determinante de complementariedad (CDR) de un roedor de las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.

También se incluyen en la invención anticuerpos humanos que se unen a polipéptidos IFN-L. Usando animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de una producción de inmunoglobulinas endógena, dichos anticuerpos se producen mediante la inmunización con un antígeno polipeptídico IFN-L (es decir, que tiene al menos 6 aminoácidos contiguos), opcionalmente conjugado con un vehículo. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 2551-55; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 326: 255-58; Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in Immuno*, 7: 33. En un método, dichos animales transgénicos se producen mediante la incapacidad de los loci endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulinas pesadas y ligeras y la inserción de loci que codifican proteínas de las cadenas pesada y ligera humanas en el genoma de los mismos. Después, los animales parcialmente modificados, es decir, los que tienen menos que la dotación completa de modificaciones, se retrocruzan hasta obtener un animal que tiene todas las modificaciones del sistema inmunitario deseados. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos con secuencias de aminoácidos humanas (en lugar de, por ejemplo, murinas) incluyendo regiones variables que son inmuno-específicas para estos antígenos. Véanse las Solicitudes PCT N° PCT/US96/05928 y PCT/US93/06926. Se describen métodos adicionales en la Patente de Estados Unidos N° 5.545.807, en las Solicitudes PCT N° PCT/US91/245 y PCT/GB89/01207 y en las Patentes Europeas N° 546073B1 y 546073A1. También pueden producirse anticuerpos humanos mediante la expresión de ADN recombinante en células hospedadoras o mediante la expresión en células de hibridoma como se describe en este documento.

En una realización alternativa, también pueden producirse anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 227: 381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581). Estos procesos mimetizan la selección inmunológica mediante la presentación de repertorios de anticuerpos en la superficie de bacteriófagos filamentosos y la posterior selección de fagos por su unión a un antígeno de elección. Dicha técnica se describe en la Solicitud PCT N°. PCT/US98/17364, que describe el aislamiento de anticuerpos agonistas funcionales y de alta afinidad por receptores MPL- y msk- usando dicho planteamiento.

Los anticuerpos quiméricos, injertados a CDR y humanizados se producen típicamente por métodos recombinantes. Se introducen ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos en células hospedadoras y se expresan usando materiales y procedimientos que se describen en este documento. En una realización preferida, los anticuerpos se producen en células hospedadoras de mamíferos, tales como células CHO. Pueden producirse anticuerpos monoclonales (por ejemplo, humanos) mediante la expresión de ADN recombinante en células hospedadoras o mediante la expresión en células de hibridoma, como se describe en este documento.

Los anticuerpos anti-IFN-L de la invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* 147-158 (RCR Press, Inc., 1987)) para la detección y cuantificación de polipéptidos IFN-L. Los anticuerpos se unirán a polipéptidos IFN-L con una afinidad que sea apropiada para el método de ensayo que se emplea.

Para aplicaciones de diagnóstico, en ciertas realizaciones, pueden marcarse anticuerpos anti-IFN-L con un resto detectable. El resto detectable puede ser uno cualquiera que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹²⁵I, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In o ⁶⁷Ga; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o peroxidasa de rábano rústico (Bayer, *et al.*, 1990, *Meth. Enz.* 184: 138-63).

Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado (por ejemplo, un polipéptido IFN-L o una porción inmunológicamente reactiva del mismo) para competir con el analito de la muestra de ensayo (un polipéptido IFN-L) por la unión con una cantidad limitada de anticuerpos anti-IFN-L. La cantidad de un polipéptido IFN-L en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos típicamente se insolubilizan antes o después de la competición, de tal modo que el patrón y el analito que están unidos a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del patrón y del analito que permanecen no unidos.

Típicamente los ensayos de tipo sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítopo, de la proteína a detectar y/o cuantificar. En un ensayo de tipo sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une, típicamente, por un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un soporte sólido y, posteriormente, un segundo anticuerpo se une al analito, formando de este modo un complejo tripartito insoluble. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar de por sí marcado con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que esté marcado con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich indirectos). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), caso en el que el resto detectable es una enzima.

Los anticuerpos anti-IFN-L también son útiles para la formación de imágenes *in vivo*. Un anticuerpo marcado con un resto detectable puede administrarse a un animal, preferiblemente en el torrente sanguíneo y analizarse la presencia y la localización del anticuerpo marcado en el hospedador. El anticuerpo puede marcarse con cualquier resto que sea detectable en un animal, ya sea por resonancia magnética nuclear, radiología u otro medio de detección conocido en la técnica.

Los anticuerpos de la invención, puede usarse como agentes terapéuticos. Estos agentes terapéuticos son generalmente agonistas o antagonistas por el hecho de que potencian o reducen, respectivamente, al menos una de las actividades biológicas de un polipéptido IFN-L. En una realización, los anticuerpos antagonistas de la invención son anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido IFN-L y que son capaces de inhibir o eliminar la actividad funcional de un polipéptido IFN-L *in vivo* o *in vitro*. En realizaciones preferidas, el anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo antagonista, inhibirá la actividad funcional de un polipéptido IFN-L en al menos aproximadamente el 50% y, preferiblemente, en al menos aproximadamente el 80%. En otra realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-polipéptido IFN-L que sea capaz de interactuar con un compañero de unión de polipéptido IFN-L (un ligando o receptor), inhibiendo o eliminado de este modo la actividad del polipéptido IFN-L *in vitro* o *in vivo*. Se identifican anticuerpos anti-polipéptido IFN-L agonistas y antagonistas mediante ensayos de selección que se conocen bien en la técnica.

La invención también se refiere a un kilt que comprende anticuerpos de IFN-L y otros reactivos útiles para detectar niveles de polipéptidos IFN-L en muestras biológicas. Dichos reactivos pueden incluir un marcador detectable, suero bloqueante, muestras de control positivo y negativo y reactivos de detección.

Microseries

Se entenderá que puede utilizarse la tecnología de microseries de ADN de acuerdo con la presente invención. Las microseries de ADN son series en miniatura de alta densidad de ácidos nucleicos colocados sobre un soporte sólido tal como vidrio. Cada celda o elemento dentro de la serie contiene numerosas copias de una única especie de ácido nucleico que actúa como diana para la hibridación con una secuencia de ácido nucleico complementaria (por ejemplo, ARNm). En la generación de perfiles de expresión mediante el uso de la tecnología de microseries de ADN, se extrae primero el ARNm de una muestra celular o tisular y después se convierte enzimáticamente en ADNc marcado fluorescentemente. Este material se hibrida con la microserie y el ADNc no unido se retira mediante lavado. Después, la expresión de genes específicos representados en la serie se visualiza mediante la cuantificación de la cantidad de ADNc marcado que está específicamente unido a cada molécula de ácido nucleico diana. De esta forma, puede cuantificarse la expresión de miles de genes de una forma paralela, de alto rendimiento, a partir de una única muestra de material biológico.

Esta generación de perfiles de expresión de alto rendimiento tiene una amplia variedad de aplicaciones con respecto a las moléculas de IFN-L de la invención, incluyendo, pero sin limitación: la identificación y validación de genes relacionados con enfermedades de IFN-L como dianas para la terapéutica; la toxicología molecular de moléculas de IFN-L relacionadas e inhibidores de las mismas; la estratificación de poblaciones y la generación de marcadores sustitutos para ensayos clínicos; y la potenciación del descubrimiento de pequeñas moléculas de fármacos de polipéptidos IFN-L relacionados mediante la contribución a la identificación de compuestos selectivos en exploraciones de alto rendimiento.

Derivados químicos

Pueden prepararse derivados de polipéptidos IFN-L modificados químicamente por un especialista en la técnica, dadas las descripciones que se explican en este documento. Los derivados de polipéptidos IFN-L se modifican de un modo que es diferente, por el tipo o la localización de las moléculas naturalmente unidas al polipéptido. Los derivados pueden incluir moléculas formadas por la delección de uno o más grupos químicos naturalmente unidos. El polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 o de la SEC ID N°: 5 u otro polipéptido IFN-L puede modificarse mediante la unión covalente de uno o más polímeros. Por ejemplo, típicamente, el polímero seleccionado es soluble en agua, de tal modo que la proteína con la que se une no precipite en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Se incluye dentro del alcance de los polímeros adecuados una mezcla de polímeros. Preferiblemente, para uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

Cada uno de los polímeros puede ser de cualquier peso molecular y pueden estar ramificados o no ramificados. Cada uno de los polímeros tiene, típicamente, un peso molecular medio de entre aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica que en preparaciones de un polímero soluble en agua, algunas moléculas pesarán más y algunas menos que el peso molecular que se indica). El peso molecular medio de cada polímero está preferiblemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 12 kDa y aproximadamente 40 kDa y más preferiblemente entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 35 kDa.

Los polímeros solubles en agua adecuados o mezclas de los mismos incluyen, pero sin limitación, hidratos de carbono ligados a N o ligados a O, azúcares, fosfatos, polietilenglicol (PEG) (incluyendo las formas de PEG que se han usado para derivatizar proteínas, incluyendo mono-(C₁-C₁₀)-polietilenglicol, alcoxi-polietilenglicol o ariloxi-polietilenglicol), monometoxi-polietilenglicol, dextrano (tal como dextrano de bajo peso molecular de, por ejemplo, aproximadamente 6 kDa), celulosa u otros polímeros basados en hidratos de carbono, poli-(N-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y alcohol polivinílico. También se incluyen en la presente invención moléculas reticulantes bifuncionales que pueden usarse para preparar multímeros de polipéptidos IFN-L unidos covalentemente.

En general, la derivatización química puede realizarse en cualquier condición adecuada que se use para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activado. Los métodos para preparar derivados químicos de polipéptidos comprenderán generalmente las etapas de: (a) hacer reaccionar el polipéptido con la molécula de polímero activada (tal como un derivado éster o aldehído reactivo de la molécula de polímero) en condiciones en las que el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 o de la SEC ID N°: 5 u otro polipéptido IFN-L se une con una o más moléculas de polímero y (b) obtener los productos de reacción. Las condiciones de reacción óptimas se determinarán en base a parámetros conocidos y al resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor la proporción de moléculas de polímero con respecto a la proteína, mayor el porcentaje de molécula de polímero unida. En una realización, el derivado de polipéptido IFN-L puede tener un único resto de molécula de polímero en el extremo amino-terminal. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.234.784.

La pegilación de un polipéptido puede realizarse específicamente usando cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica. Dichas reacciones se describen, por ejemplo, en la siguiente bibliografía: Francis *et al.*, 1992, *Focus on Growth Factors* 3: 4-10; Patentes Europeas N° 0154316 y 0401384; y Patente de Estados Unidos N° 4.179.337. Por ejemplo, la pegilación puede realizarse mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo), como se describe en este documento. Para las reacciones de acilación, un polímero seleccionado debería tener un único grupo éster reactivo. Para la alquilación reductora, un polímero seleccionado debería tener un único grupo aldehído reactivo. Un aldehído reactivo es, por ejemplo, propionaldehído de polietilenglicol, que es estable en agua, o derivados mono C₁-C₁₀, alcoxi o ariloxi del mismo (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.252.714).

En otra realización, los polipéptidos IFN-L pueden acoplarse químicamente con biotina. Después, se deja que las moléculas de biotina/polipéptido IFN-L se unan a avidina, dando como resultado moléculas tetravalentes de avidina/biotina/polipéptido IFN-L. Los polipéptidos IFN-L también pueden acoplarse covalentemente con dinitrofenol (DNP) o trinitrofenol (TNP) y los conjugados resultantes precipitarse con anti-DNP o anti TNP-IgM para formar conjugados decaméricos con una valencia de 10.

Generalmente, las afecciones que pueden aliviarse o modularse mediante la administración de los presentes derivados de polipéptidos IFN-L incluyen las que se han descrito en este documento para polipéptidos IFN-L. Sin embargo, los derivados de polipéptidos IFN-L que se describen en este documento pueden tener actividades adicionales, una actividad biológica potenciada o reducida u otras características, tales como una vida media aumentada o disminuida en comparación con las moléculas no derivatizadas.

Animales no humanos generados por ingeniería genética

Se incluyen además dentro del alcance de la presente invención animales no humanos, tales como ratones, ratas u otros roedores; conejos, cabras, ovejas u otros animales de granja, en los que se hayan interrumpido los genes que codifican el polipéptido IFN-L nativo (es decir, “knocked out”) de tal modo que el nivel de expresión del polipéptido IFN-L se disminuya significativamente o se suprima completamente. Dichos animales pueden prepararse usando técnicas y métodos como los que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.557.032.

La presente invención incluye además animales no humanos tales como ratones, ratas u otros roedores; conejos, cabras, ovejas u otros animales de granja, en los que la forma nativa de un gen de IFN-L para ese animal o un gen de IFN-L heterólogo se sobreexpresa por el animal, generando de este modo un animal “transgénico”. Dichos animales transgénicos pueden prepararse usando métodos bien conocidos, tales como los que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.489.743 y en la Publicación PCT N° WO94/28122.

La presente invención incluye además animales no humanos en los que el promotor para uno o más de los polipéptidos IFN-L de la presente invención se activa o se inactiva (por ejemplo, mediante el uso de métodos de recombinación homóloga) para alterar el nivel de expresión de uno o más de los polipéptidos IFN-L nativos.

Estos animales no humanos pueden usarse para exploraciones de candidatos a fármacos. En dichas exploraciones, puede medirse el impacto de un candidato a fármaco en el animal. Por ejemplo, los candidatos a fármaco pueden disminuir o aumentar la expresión del gen de IFN-L. En ciertas realizaciones, la cantidad de polipéptido IFN-L que se produce puede medirse después de la exposición del animal al candidato a fármaco. Además, en ciertas realizaciones, se puede detectar el impacto real del candidato a fármaco en el animal. Por ejemplo, la sobreexpresión de un gen en particular puede dar como resultado, o puede asociarse con, una enfermedad o afección patológica. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un candidato a fármaco para disminuir la expresión del gen o su capacidad para prevenir o inhibir una afección patológica. En otros ejemplos, la producción de un producto metabólico en particular, tal como un fragmento de un polipéptido, puede dar como resultado, o asociarse con, una enfermedad o afección patológica. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un candidato a fármaco para disminuir la producción de dicho producto metabólico o su capacidad para prevenir o inhibir una afección patológica.

Evaluación de otros moduladores de la actividad del polipéptido IFN-L

En algunas situaciones, puede ser deseable identificar moléculas que sean moduladoras, es decir, agonistas o antagonistas de la actividad del polipéptido IFN-L. Pueden identificarse moléculas naturales o sintéticas que modulan al polipéptido IFN-L usando uno o más ensayos de exploración, tales como los que se describen en este documento.

Dichas moléculas pueden administrarse de una forma *ex vivo* o de una forma *in vivo*, mediante inyección o mediante administración por vía oral, un dispositivo de implante o similares.

La expresión “molécula de ensayo” se refiere a una molécula que se está evaluando para determinar su capacidad para modular (es decir, aumentar o disminuir) la actividad de un polipéptido IFN-L. Más comúnmente, una molécula de ensayo interactuará directamente con un polipéptido IFN-L. Sin embargo, también se contempla que una molécula de ensayo también puede modular la actividad del polipéptido IFN-L indirectamente, tal como afectando a la expresión del gen IFN-L o mediante la unión a un compañero de unión del polipéptido IFN-L (por ejemplo, un receptor o ligando). En una realización, una molécula de ensayo se unirá a un polipéptido IFN-L con una afinidad constante de al menos aproximadamente 10^{-6} M, preferiblemente de aproximadamente 10^{-8} M, más preferiblemente de aproximadamente 10^{-9} M y aún más preferiblemente de aproximadamente 10^{-10} M.

Se incluyen en la presente invención métodos para identificar compuestos que interactúen con polipéptidos IFN-L. En ciertas realizaciones, un polipéptido IFN-L se incuba con una molécula de ensayo en condiciones que permitan la interacción de la molécula de ensayo con un polipéptido IFN-L y se mide el grado de interacción. La molécula de ensayo puede explorarse en una forma sustancialmente purificada o en una mezcla bruta.

Un agonista o antagonista del polipéptido IFN-L puede ser una proteína, péptido, hidrato de carbono, lípido o molécula de pequeño peso molecular que interactúe con el polipéptido IFN-L para regular su actividad. Las moléculas que regulan la expresión del polipéptido IFN-L incluyen ácidos nucleicos que son complementarios a los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido IFN-L o que son complementarios a secuencias de ácidos nucleicos que dirigen o controlan la expresión del polipéptido IFN-L y que actúan como reguladores antisentido de la expresión.

Una vez que se ha identificado que una molécula de ensayo interactúa con un polipéptido IFN-L, la molécula puede evaluarse adicionalmente para determinar su capacidad para aumentar o disminuir la actividad del polipéptido IFN-L. La medición de la interacción de una molécula de ensayo con un polipéptido IFN-L puede realizarse en varios formatos, incluyendo ensayos de unión basados en células, ensayos de unión a membrana, ensayos en fase de solución e inmunoensayos. En general, una molécula de ensayo se incuba con un polipéptido IFN-L durante un periodo específico de tiempo y se determina la actividad del polipéptido IFN-L mediante uno o más ensayos para medir la actividad biológica.

La interacción de moléculas de ensayo con polipéptidos IFN-L también puede evaluarse directamente usando anticuerpos policlonales o monoclonales en un inmunoensayo. Como alternativa, pueden usarse formas modificadas de polipéptidos IFN-L que contienen marcadores de epítopos, como se han descrito en este documento, en solución y en inmunoensayos.

En el caso de que los polipéptidos IFN-L presenten actividad biológica mediante una interacción con un compañero de unión (por ejemplo, un receptor o un ligando) pueden usarse una diversidad de ensayos *in vitro* para medir la unión de un polipéptido IFN-L con el compañero de unión correspondiente (tal como un agente de unión selectiva, receptor o ligando). Estos ensayos pueden usarse para explorar moléculas de ensayo para determinar su capacidad para aumentar o disminuir la velocidad y/o el grado de unión de un polipéptido IFN-L con su compañero de unión. En un ensayo, un polipéptido IFN-L se inmoviliza en los pocillos de una placa de microtitulación. Después, puede añadirse un compañero de unión del polipéptido IFN-L radiomarcado (por ejemplo, un compañero de unión del polipéptido IFN-L yodado) y una molécula de ensayo, ya sea primero uno y luego otro (en cualquier orden) o simultáneamente en los pocillos. Después de la incubación, los pocillos pueden lavarse y contarse para determinar la radiactividad usando un contador de centelleo para determinar el grado en el que el compañero de unión está unido con el polipéptido IFN-L. Típicamente, una molécula se ensayará contra un intervalo de concentraciones y pueden usarse una serie de pocillos de control, que carecen de uno o más elementos de los ensayos de evaluación, para una dar precisión a la evaluación de los resultados. Una alternativa a este método implica revertir las “posiciones” de las proteínas, es decir, inmovilizar el compañero de unión del polipéptido IFN-L en los pocillos de la placa de microtitulación, incubar con la molécula de ensayo y con el polipéptido IFN-L radiomarcado y determinar el grado de unión del polipéptido IFN-L. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 18 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. y Wiley and Sons 1995).

Como una alternativa al radiomarcaje, un polipéptido IFN-L o su compañero de unión pueden conjugarse con biotina y, después, la presencia de proteína biotinilada puede detectarse usando estreptavidina ligada a una enzima, tal como peroxidasa de rábano rústico (HRP) o fosfatasa alcalina (AP), que pueden detectarse de forma colorimétrica, o mediante etiquetas fluorescentes de estreptavidina. Un anticuerpo dirigido contra un polipéptido IFN-L o contra un compañero de unión del polipéptido IFN-L y que esté conjugado con biotina también puede usarse para los fines de la detección, después de la incubación del complejo con estreptavidina ligada a enzima ligada a AP o HRP.

Un polipéptido IFN-L o un compañero de unión de un polipéptido IFN-L también pueden inmovilizarse por unión con perlas de agarosa, perlas acrílicas u otros tipos de dichos sustratos inertes en fase sólida. El complejo sustrato-proteína puede colocarse en una solución que contenga la proteína complementaria y el compuesto de ensayo. Después de la incubación, las perlas pueden precipitarse mediante centrifugación y la cantidad de unión entre un polipéptido IFN-L y su compañero de unión puede evaluarse usando los métodos que se describen en este documento. Como alternativa, el complejo sustrato-proteína puede inmovilizarse en una columna con la molécula de ensayo y hacerse pasar una proteína complementaria a través de la columna. La formación de un complejo entre un polipéptido IFN-L y

su compañero de unión puede evaluarse después usando cualquiera de las técnicas que se describen en este documento (por ejemplo, radiomarcaje o unión a anticuerpos).

Otro ensayo *in vitro* que es útil para la identificación de una molécula de ensayo que aumente o disminuya la formación de un complejo entre una proteína de unión de polipéptido IFN-L y un compañero de unión de polipéptido IFN-L es un sistema detector de resonancia de plasmón superficial, tal como el sistema de ensayo BIAcore (Pharmacia, Piscataway, NJ). El sistema BIAcore se utiliza como especifica el fabricante. Este ensayo implica esencialmente la unión covalente de un polipéptido IFN-L o de un compañero de unión de un polipéptido IFN-L con una microplaca sensora revestida con dextrano, que se localiza en un detector. El compuesto de ensayo y la otra proteína complementaria pueden inyectarse después, simultáneamente o secuencialmente, en la cámara que contiene la microplaca sensora. La cantidad de proteína complementaria que se une puede evaluarse en base a la variación de la masa molecular que está físicamente asociada con el lado revestido con dextrano de la microplaca sensora, midiéndose la variación de la masa molecular mediante el sistema detector.

En algunos casos, puede ser deseable evaluar dos o más compuestos de ensayo juntos para determinar su capacidad para aumentar o disminuir la formación de un complejo entre un polipéptido IFN-L y un compañero de unión de polipéptido IFN-L. En estos casos los ensayos que se exponen en este documento pueden modificarse fácilmente mediante la adición de dichos compuestos de ensayo adicionales simultáneamente con, o posteriormente a, el primer compuesto de ensayo. Las restantes etapas del ensayo son como se han expuesto en este documento.

Pueden usarse ventajosamente ensayos *in vitro* tales como los que se describen en este documento para explorar grandes cantidades de compuestos para determinar un efecto sobre la formación de un complejo entre un polipéptido IFN-L y un compañero de unión del polipéptido IFN-L. Los ensayos pueden automatizarse para explorar compuestos generados en bibliotecas de presentación de fagos, de péptidos sintéticos y de síntesis química.

Los compuestos que aumentan o disminuyen la formación de un complejo entre un polipéptido IFN-L y un compañero de unión de un polipéptido IFN-L también pueden explorarse en un cultivo celular, usando células y líneas celulares que expresen polipéptido IFN-L o compañero de unión del polipéptido IFN-L. Las células y líneas celulares pueden obtenerse a partir de cualquier mamífero, pero preferiblemente serán de origen humano u de otro primate, canino o de roedores. La unión de un polipéptido IFN-L con células que expresan compañero de unión del polipéptido IFN-L en la superficie se evalúa en presencia o ausencia de moléculas de ensayo y el grado de unión puede determinarse mediante, por ejemplo, citometría de flujo, usando un anticuerpo biotinilado contra un compañero de unión del polipéptido IFN-L. Ventajosamente, pueden usarse ensayos de cultivos celulares para evaluar adicionalmente compuestos que obtengan una puntuación positiva en los ensayos de unión a proteína que se describen en este documento.

También pueden usarse cultivos celulares para explorar el impacto de un candidato a fármaco. Por ejemplo, los candidatos a fármaco pueden disminuir o aumentar la expresión del gen de IFN-L. Por ejemplo, puede medirse la cantidad de polipéptido IFN-L o de un fragmento de polipéptido IFN-L que se produce después de la exposición del cultivo celular al candidato a fármaco. Se puede detectar el impacto real del candidato a fármaco sobre el cultivo celular. Por ejemplo, la sobreexpresión de un gen en particular puede tener un impacto particular sobre el cultivo celular. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un candidato a fármaco para aumentar o disminuir la expresión del gen o su capacidad para prevenir o inhibir un impacto en particular sobre el cultivo celular. En otros ejemplos, la producción de un producto metabólico en particular, tal como un fragmento de un polipéptido, puede dar como resultado, o estar asociada a, una enfermedad o afección patológica. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un candidato a fármaco para disminuir la producción de dicho producto metabólico en un cultivo celular.

Internalización de proteínas

La secuencia de proteína *tat* (del VIH) puede usarse para internalizar proteínas en una célula. Véase, por ejemplo, Falwell *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 664-68. Por ejemplo, se ha descrito que una secuencia de 11 aminoácidos (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEC ID N°: 18) de la proteína *tat* del VIH (denominado "dominio de transducción de proteínas" o TAT PDT) media la liberación a través de la membrana citoplasmática y de la membrana nuclear de una célula. Véanse Schwarze *et al.*, 1999, *Science* 285: 1569-72; y Nagahara *et al.*, 1998, *Nat. Med.* 4: 1449-52. En estos procedimientos, se preparan construcciones de FITC (G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R marcada con FITC; SEC ID N°: 19) que penetran en tejidos después de la administración por vía intraperitoneal y se detecta la unión de dichas construcciones con las células mediante análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células tratadas con una proteína de fusión *tat*- β -gal demostrarán actividad β -gal. Después de la inyección, la expresión de dicha construcción puede detectarse en varios tejidos, incluyendo hígado, riñón, pulmón, corazón y tejido cerebral. Se piensa que dichas construcciones sufren cierto grado de desplegamiento para entrar en la célula y así, después de su entrada en la célula pueden requerir un repliegamiento.

Se apreciará, por lo tanto, que la secuencia de la proteína *tat* puede usarse para internalizar un polipéptido deseado en una célula. Por ejemplo, usando la secuencia de proteína *tat*, puede administrarse intracelularmente un antagonista de IFN-L (tal como un agente de unión selectiva anti-IFN-L, una pequeña molécula, un receptor soluble o un oligonucleótido antisentido) para inhibir la actividad de una molécula de IFN-L. Como se usa en este documento, la expresión "molécula de IFN-L" se refiere tanto a moléculas de ácido nucleico de IFN-L como a polipéptidos IFN-L, como se han definido en este documento. Cuando se desee, la proteína IFN-L en sí también puede administrarse internamente en una célula usando estos procedimientos. Véase también, Straus, 1999, *Science* 285: 1466-67.

Identificación del origen celular usando polipéptidos IFN-L

De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, puede ser útil ser capaz de determinar el origen de cierto tipo celular asociado con un polipéptido IFN-L. Por ejemplo, puede ser útil determinar el origen de una enfermedad o afección patológica como ayuda para la selección de una terapia apropiada. En ciertas realizaciones, pueden usarse ácidos nucleicos que codifican polipéptido IFN-L como una sonda para identificar células que se describen en este documento mediante la exploración de ácidos nucleicos de las células con dicha sonda. En otras realizaciones, se pueden usar anticuerpos anti-polipéptido IFN-L para evaluar la presencia de polipéptido IFN-L en las células y, de este modo, determinar si dichas células son de los tipos que se describen en este documento.

Composiciones de polipéptido IFN-L y administración

Las composiciones terapéuticas están dentro del alcance de la presente invención. Dichas composiciones farmacéuticas de polipéptido IFN-L pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido IFN-L o de una molécula de ácido nucleico de IFN-L junto con un agente de formulación farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable seleccionado por ser adecuado con el modo de administración. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de unión selectiva a polipéptido IFN-L junto con un agente de formulación farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable seleccionado por ser adecuado con el modo de administración.

Los materiales de formulación aceptables son preferiblemente no tóxicos para el destinatario a las dosificaciones y concentraciones que se emplean.

La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, índice de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina), antimicrobianos, antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito sódico o sulfito de hidrógeno sódico), tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, u otros ácidos orgánicos), agentes formadores de volumen (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido tetraacético de etilendiamina (EDTA)), agentes formadores de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), cargas, monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas), proteínas (tales como albúmina del suero, gelatina o inmunoglobulinas), colorantes, aromatizantes y agentes diluyentes, agentes emulsionantes, polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sales (tales como sodio), conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol), alcoholes de azúcares (tales como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, tensioactivos o agentes humectantes (tales como plurónicos; PEG; ésteres de sorbitán; polisorbatos, tales como polisorbato 20 o polisorbato 80; tritón; trometamina, lecitina; colesterol o tiloxapal), agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol), agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos -preferiblemente cloruro de sodio o de potasio- o manitol sorbitol), vehículos de administración, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18ª Ed., A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990).

La composición farmacéutica óptima será determinada por un especialista dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración que se pretende, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, anteriormente. Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, el índice de liberación *in vivo* y el índice de eliminación *in vivo* de la molécula de IFN-L.

El vehículo o excipiente principal en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o excipiente adecuado para inyección puede ser agua, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente suplementado con otros materiales comunes en composiciones para la administración por vía parenteral. Son vehículos ejemplares adicionales solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina del suero. Otras composiciones farmacéuticas ejemplares comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5 o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado. En una realización de la presente invención, pueden prepararse composiciones de polipéptido IFN-L para su almacenamiento mediante la mezcla de la composición seleccionada, que tiene el grado de pureza deseado, con agentes de formulación óptimos (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, anteriormente) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, el producto de polipéptido IFN-L puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de polipéptido IFN-L pueden seleccionarse para la administración por vía parenteral. Como alternativa, las composiciones pueden seleccionarse para administrarse por inhalación o para administrarse a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de dichas composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la experiencia en la técnica.

Los componentes de formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Por ejemplo, se usan tampones para mantener la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, típicamente, dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

5 Cuando se contempla la administración por vía parenteral, las composiciones terapéuticas para usar en esta invención pueden ser en forma de una solución acuosa, parenteralmente aceptable y sin pirógenos que comprende la molécula de IFN-L deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección por vía parenteral es agua destilada estéril, en la que se formula una molécula de IFN-L como una solución isotónica estéril adecuadamente conservada. Otra preparación más puede implicar la formulación de la molécula deseada con
10 un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que proporcionen la liberación controlada o sostenida del producto que después puede administrarse mediante una inyección de liberación prolongada. También puede usarse ácido hialurónico, y éste puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de administración de fármacos implantables.

15 En una realización, una composición farmacéutica puede formularse para administrarse por inhalación. Por ejemplo, el polipéptido IFN-L puede formularse como un polvo seco para inhalación. También pueden formularse soluciones para inhalación de moléculas de ácido nucleico o de polipéptido IFN-L con un propulsor para la administración en aerosol. En otra realización más, las soluciones pueden nebulizarse. La administración por vía pulmonar se describe adicionalmente en la Publicación PCT N° WO 94/20069, que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

También se contempla que ciertas formulaciones pueden administrarse por vía oral. En una realización de la presente invención, los polipéptidos IFN-L que se administran de este modo pueden formularse con o sin los vehículos
25 que se usan normalmente en la preparación de compuestos de formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, puede diseñarse una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el momento en el tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción del polipéptido IFN-L. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de polipéptidos IFN-L en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Mediante la disolución de comprimidos en agua estéril o en otro vehículo apropiado, pueden prepararse soluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico o bicarbonato, lactosa o fosfato cálcico; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes, tales como estearato magnésico, ácido esteárico o talco.

35 Composiciones farmacéuticas de polipéptido IFN-L adicionales serán evidentes para los especialistas en la técnica, incluyendo formulaciones que implican polipéptidos IFN-L en formulaciones de administración sostenida o controlada. Los especialistas en la técnica también conocen técnicas para la formulación de una diversidad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como vehículos de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de liberación prolongada. Véanse, por ejemplo, los documentos PCT/US93/00829 y WO 93/15722, que describen la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de
45 composiciones farmacéuticas.

Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos conformados; por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919 y Patente Europea N° 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22: 547-56), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 y Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12: 98-105), etilvinilacetato (Langer *et al.*, anteriormente) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Patente Europea N° 133988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Eppstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688-92; y Patentes Europeas N° 036676, 088046 y 143949.

La composición farmacéutica de IFN-L para usar para la administración *in vivo* debe ser, típicamente, estéril. Esto puede conseguirse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización usando este método puede realizarse antes de o después de la liofilización y reconstitución.
60 La composición para la administración por vía parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. Además, las composiciones parenterales se colocan generalmente en un envase que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

65 Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para usar o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere reconstitución antes de su administración.

En una realización específica, la presente invención se refiere a kits para producir una unidad de administración de dosis única. Cada uno de los kits puede contener tanto un primer envase que tiene una proteína seca como un segundo envase que tiene una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de esta invención kits que contienen jeringas precargadas de cámara única o multicámara (por ejemplo, jeringas con un líquido y jeringas con un liofilizado).

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica de IFN-L para emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y de los objetivos. Un especialista en la técnica entenderá que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán, por lo tanto, dependiendo en parte de la molécula que se administra, de la indicación para la que se está usando la molécula de IFN-L, de la vía de administración y del tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y del estado (la edad y salud general) del paciente. Por consiguiente, el médico puede graduar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede variar desde aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores que se han mencionado anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación puede variar desde 0,1 $\mu\text{g/kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg; o desde 1 $\mu\text{g/kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg; o desde 5 $\mu\text{g/kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula de IFN-L en la formulación que se usa. Típicamente, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que consiga el efecto deseado. La composición puede administrarse, por lo tanto, como una dosis única o como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) en el tiempo, o como una infusión continua mediante un dispositivo de implante o catéter. El perfeccionamiento adicional de la dosificación apropiada se realiza de forma rutinaria por los especialistas en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas que realizan de forma rutinaria. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse a través del uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, por vía oral; a través de inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida; o mediante dispositivos de implante. Cuando se desee, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolada o mediante infusión de forma continua, o mediante un dispositivo de implante.

Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede administrarse localmente mediante el implante de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se usa un dispositivo de implante, el dispositivo puede implantarse en cualquier órgano o tejido adecuado y la administración de la molécula deseada puede ser mediante difusión, bolo de liberación medida o administración continua.

En algunos casos, puede ser deseable usar composiciones farmacéuticas de polipéptidos IFN-L de una manera *ex vivo*. En dichos casos, se exponen células, tejidos u órganos que han sido extirpados del paciente a composiciones farmacéuticas de polipéptido IFN-L, después de la cual las células, tejidos u órganos se implantan posteriormente de nuevo en el paciente.

En otros casos, un polipéptido IFN-L puede administrarse mediante el implante de ciertas células que han sido modificadas por ingeniería genética, usando métodos como los que se describen en este documento para expresar y secretar el polipéptido IFN-L. Dichas células pueden ser células animales o humanas y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. Opcionalmente, las células pueden estar inmortalizadas. Para disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de los tejidos adyacentes. Los materiales de encapsulación son típicamente recintos o membranas poliméricas biocompatibles semipermeables, que permiten la liberación del producto o productos proteicos pero evitan la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos adyacentes.

Como se analiza en este documento, puede ser deseable tratar poblaciones celulares aisladas (tales como células madre, linfocitos, glóbulos rojos, condrocitos, neuronas y similares con uno o más polipéptidos IFN-L. Esto puede conseguirse mediante la exposición de las células aisladas directamente al polipéptido, cuando está en una forma que es permeable a la membrana celular.

Realizaciones adicionales de la presente invención se refieren a células y a métodos (por ejemplo, recombinación homóloga y/o otros métodos de producción recombinante) para la producción *in vitro* de polipéptidos terapéuticos. Pueden usarse métodos de recombinación homólogos u otros para modificar una célula que contiene un gen de IFN-L normal transcripcionalmente silente o un gen subexpresado y producir, de este modo, una célula que exprese cantidades terapéuticamente eficaces de polipéptidos IFN-L.

La recombinación homóloga es una técnica que se desarrolló originariamente para la dirección de genes para inducir o corregir mutaciones en genes transcripcionalmente activos. Kucherlapati, 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36: 301. La técnica básica se desarrolló como un método para introducir mutaciones específicas en regiones específicas del genoma de mamíferos (Thomas *et al.*, 1986, *Cell* 44: 419-28; Thomas and Capecchi, 1987, *Cell* 51: 503-12; Doetschman *et al.*, 1988, *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 8583-87) o para corregir mutaciones específicas dentro de genes defectivos (Doetschman *et al.*, 1987, *Nature* 330: 576-78). Se describen técnicas de recombinación

homóloga ejemplares en la Patente de Estados Unidos N° 5.272.071; en las Patentes Europeas N° 9193051 t 505500; en el documento PCT/US90/07642 y en la Publicación PCT N° WO 91/09955).

Mediante la recombinación homóloga, la secuencia de ADN a insertar en el genoma puede dirigirse a una región específica del gen de interés mediante su unión con ADN de dirección. El ADN de dirección es una secuencia de nucleótidos que es complementaria (homóloga) a una región del ADN genómico. Se ponen en contacto pequeños fragmentos de ADN de dirección que son complementarios a una región específica del genoma con la cadena parental durante el proceso de replicación del ADN. Es una propiedad general del ADN que se ha insertado en una célula hibridar y, por lo tanto, recombinarse con otros fragmentos de ADN endógenos a través de regiones homólogas compartidas. Si esta cadena complementaria se une con un oligonucleótido que contiene una mutación o una secuencia diferente o un nucleótido adicional, también se incorpora en la cadena sintetizada *de novo* como resultado de la recombinación. Como resultado de la función de lectura a prueba de errores es posible que la nueva secuencia de ADN sirva como molde. Por lo tanto, el ADN transferido se incorpora en el genoma.

Unidas a estos fragmentos de ADN de dirección hay regiones de ADN que pueden interactuar con o controlar la expresión de un polipéptido IFN-L, por ejemplo, secuencias flanqueantes. Por ejemplo, un elemento promotor o potenciador, un supresor o un elemento modulador de la transcripción exógeno se inserta en el genoma de la célula hospedadora que se pretende próximo a y en orientación suficiente para influir en la transcripción del ADN que codifica el polipéptido IFN-L deseado. El elemento de control controla una porción del ADN presente en el genoma de la célula hospedadora. Por lo tanto, la expresión del polipéptido IFN-L deseado puede conseguirse, no mediante transfección de ADN que codifica el gen de IFN-L en sí, sino mediante el uso de ADN de dirección (que contiene regiones de homología con el gen endógeno de interés) acoplado con segmentos reguladores del ADN que proporcionan la secuencia génica endógena con señales reconocibles para la transcripción de un gen de IFN-L.

En un método ejemplar, la expresión de un gen de dirección deseado en una célula (es decir, un gen celular endógeno deseado) se altera por recombinación homóloga en el genoma celular en un sitio preseleccionado, mediante la introducción de un ADN que incluye al menos una secuencia regulador, un exón y un sitio donante de corte y empalme. Estos componentes se introducen en el ADN cromosómico (genómico) de tal modo que, en efecto, dé como resultado la producción de una nueva unidad de transcripción (en la que la secuencia reguladora, el exón y el sitio donante de corte y empalme presentes en la construcción de ADN están unidos operativamente al gen endógeno). Como resultado de la introducción de estos componentes en el ADN cromosómico, se altera la expresión del gen endógeno deseado.

La expresión génica alterada, como se describe en este documento incluye la activación (o la provocación de que se exprese) un gen que está normalmente silente (no expresado) en la célula que se obtiene, así como el aumento de la expresión de un gen que no se expresa a niveles fisiológicamente significativos en la célula que se obtiene. Las realizaciones incluyen además cambiar el patrón de regulación o inducción de tal modo que sea diferente del patrón de regulación o de inducción que se produce en la célula que se obtiene y reducir (incluyendo eliminar) la expresión de un gen que se expresa en la célula que se obtiene.

Un método por el que puede usarse recombinación homóloga para aumentar o provocar la producción de polipéptido IFN-L a partir un gen de IFN-L endógeno de una célula implica usar primero recombinación homóloga para colocar una secuencia de recombinación de un sistema de recombinación específico de sitio (por ejemplo, Cre/loxP, FLP/FRT) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5: 521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225: 890-900) cadena arriba de (es decir, 5' a) una región codificante del polipéptido IFN-L genómico endógeno de la célula. Un plásmido que contenía un sitio de recombinación homólogo al sitio que se colocó justo cadena arriba de la región codificante del polipéptido IFN-L genómico se introdujo en la línea celular modificada junto con la enzima recombinasa apropiada. Esta recombinasa provoca que el plásmido se integre, mediante el sitio de recombinación del plásmido, en el sitio de recombinación localizado justo cadena arriba de la región codificante del polipéptido IFN-L genómico en la línea celular (Baubonis y Sauer, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21: 2025-29; O'Gorman *et al.*, 1991, *Science* 251: 1351-55). Cualquier secuencia flanqueante conocida que aumente la transcripción (por ejemplo, un potenciador o promotor, intrón o potenciador tradicional), si está adecuadamente colocada en el plásmido, se integraría de tal modo que genere una unidad transcripcional nueva modificada que dé como resultado la producción *de novo* o aumentada del polipéptido IFN-L a partir del gen de IFN-L endógeno de la célula.

Un método adicional para usar la línea celular en la que se ha colocado una secuencia de recombinación específica de sitio justo cadena arriba de la región codificante del polipéptido IFN-L genómico endógeno de la célula es usar la recombinación homóloga para introducir un segundo sitio de recombinación en cualquier parte del genoma de la línea celular. Después, se introduce la enzima recombinasa apropiada en la línea celular de dos sitios de recombinación, provocando un acontecimiento de recombinación (deleción, inversión y translocación) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5: 521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225: 890-900) que generaría una unidad transcripcional nueva o modificada que dará como resultado la producción *de novo* o aumentada del polipéptido IFN-L a partir del gen de IFN-L endógeno de la célula.

Un planteamiento adicional para aumentar o provocar la expresión del polipéptido IFN-L a partir de un gen de IFN-L endógeno de la célula implica aumentar o provocar la expresión de un gen o genes (por ejemplo, factores de transcripción) y/o disminuir la expresión de un gen o genes (por ejemplo, represores transcripcionales) de una forma que de cómo resultado la producción *de novo* o aumentada del polipéptido IFN-L a partir del gen de IFN-L endógeno

de la célula. Este método incluye la introducción de un polipéptido de origen no natural (por ejemplo, un polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN específico de sitio fusionado con un dominio de factor transcripcional) en la célula de tal modo que dé como resultado la producción *de novo* o aumentada de polipéptido IFN-L a partir del gen de IFN-L endógeno de la célula.

5

La presente invención se refiere además a construcciones de ADN útiles en el método de alterar *in vitro* la expresión de un gen diana. En ciertas realizaciones, las construcciones de ADN ejemplares comprenden: (a) una o más secuencias de dirección, (b) una secuencia reguladora, (c) un exón y (d) un sitio donante de corte y empalme desparejado. La secuencia de dirección en la construcción de ADN dirige la integración de los elementos (a) - (d) en un gen diana en una célula de tal modo que los elementos (b) - (d) estén unidos operativamente a las secuencias del gen diana endógeno. En otra realización, las construcciones de ADN comprenden: (a) una o más secuencias de dirección, (b) una secuencia reguladora, (c) un exón, (d) un sitio donante de corte y empalme, (e) un intrón y (f) un sitio aceptor de corte y empalme, en las que la secuencia de dirección dirige la integración de los elementos (a) - (f) de tal modo que los elementos (b) - (f) estén unidos operativamente al gen endógeno. La secuencia de dirección es homóloga al sitio preseleccionado en el ADN cromosómico celular con el que se va a producir la recombinación homóloga. En la construcción, el exón está generalmente en posición 3' de la secuencia reguladora y el sitio donante de corte y empalme está en posición 3' del exón.

Si se conoce la secuencia de un gen en particular, tal como la secuencia de ácido nucleico del polipéptido IFN-L que se presenta en este documento, un fragmento de ADN que sea complementario a una región seleccionada del gen puede sintetizarse u obtenerse de otro modo, tal como mediante restricción apropiada del ADN nativo en sitios de reconocimiento específicos que se unen a la región de interés. Este fragmento sirve como secuencia de dirección tras la inserción en la célula e hibridará con su región homóloga dentro del genoma. Si esta hibridación se produce durante la replicación del ADN, este fragmento de ADN y cualquier secuencia adicional que esté unida al mismo, actuará como un fragmento Okazaki y se incorporará en la cadena de ADN hija sintetizada *de novo*. La presente invención, por lo tanto, incluye nucleótidos que codifican un polipéptido IFN-L, pudiendo usarse los nucleótidos como secuencias de dirección.

También se describe la terapia celular de polipéptidos IFN-L, por ejemplo, el implante de células que producen polipéptidos IFN-L. Esto implica implantar células capaces de sintetizar y secretar una forma biológicamente activa del polipéptido IFN-L. Dichas células productoras de polipéptido IFN-L pueden ser células que sean productoras naturales de polipéptido IFN-L o pueden ser células recombinantes cuya capacidad para producir polipéptidos IFN-L se haya aumentado mediante la transformación con un gen que codifique el polipéptido IFN-L deseado o con un gen que aumente la expresión del polipéptido IFN-L. Dicha modificación puede conseguirse por medio de un vector adecuado para administrar el gen, así como promover su expresión y secreción. Para minimizar una reacción inmunológica potencial en pacientes a los que se administra un polipéptido IFN-L, como puede ocurrir con la administración de un polipéptido de una especie extraña, se prefiere que las células naturales que producen polipéptido IFN-L sean de origen humano y produzcan polipéptido IFN-L humano. Así mismo se prefiere que las células recombinantes que producen polipéptido IFN-L se transformen con un vector de expresión que contenga un gen que codifique un polipéptido IFN-L humano.

Las células implantadas pueden estar encapsuladas para evitar la infiltración de tejidos adyacentes. Pueden implantarse células animales humanas o no humanas en pacientes en recintos o membranas poliméricas semipermeables biocompatibles que permitan la liberación del polipéptido IFN-L, pero que eviten la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales del tejido adyacente. Como alternativa, las células propias del paciente, transformadas para que produzcan polipéptidos IFN-L *ex vivo*, pueden implantarse directamente en el paciente sin dicha encapsulación.

Se conocen en el campo técnicas para la encapsulación de células vivas y para la preparación de las células encapsuladas y su implante en pacientes puede conseguirse de forma rutinaria. Por ejemplo, Baetge *et al.* (Publicaciones PCT N° WO95/05452 y PCT/US94/09299) describen cápsulas de membranas que contienen células modificadas por ingeniería genética para la administración eficaz de moléculas biológicamente activas. Las cápsulas son biocompatibles y son fácilmente recuperables. Las cápsulas encapsulan células transfectadas con moléculas de ADN recombinante que codifican moléculas biológicamente activas unidas operativamente con promotores que no están sometidos a regulación negativa *in vivo* tras el implante en un hospedador mamífero. Los dispositivos proporcionan la administración de las moléculas a partir de células vivas en sitios específicos dentro de un destinatario. Además, véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.892.538; 5.011.472; y 5.106.627. Se describe un sistema para encapsular células vivas en la Publicación PCT N°. WO91/10425 (Aebischer *et al.*). Véanse también, la Publicación PCT N° WO91/10470 (Aebischer *et al.*); Winn *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 113: 322-29, Aebischer *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.*, 111: 269-75, y Tresco *et al.*, 1992, *ASAI* 38: 17-23).

También se describe la administración de terapia génica de polipéptidos IFN-L *in vivo* e *in vitro*. Un ejemplo de una técnica de terapia génica es el uso del gen de IFN-L (ADN genómico, ADNc y/o ADN sintético) que codifica un polipéptido IFN-L que puede estar unido operativamente a un promotor constitutivo o inducible para formar una "construcción de ADN de terapia génica". El promotor puede ser homólogo o heterólogo al gen de IFN-L endógeno, con tal de que sea activo en el tipo celular o tisular en el que se insertará la construcción. Otros componentes de la construcción de ADN de terapia génica pueden incluir opcionalmente moléculas de ADN diseñadas para su integración específica de sitio (por ejemplo, secuencias endógenas útiles para recombinación homóloga), promotores

específicos de tejido, potenciadores o silenciadores, moléculas de ADN capaces de proporcionar una ventaja selectiva sobre la célula parental, moléculas de ADN útiles como marcadores para identificar células transformadas, sistemas de selección negativa, agentes de unión específica a células (tales como, por ejemplo, para la dirección celular), factores de internalización específicos de células, factores de transcripción que potencien la expresión a partir de un vector y factores que permitan la producción de vectores.

Una construcción de ADN de terapia génica puede introducirse después en la células (*ex vivo* o *in vivo*) usando vectores virales o no virales. Un medio para introducir la construcción de ADN de terapia génica es por medio de vectores virales, como se describe en este documento. Ciertos vectores, tales como vectores retrovirales, administrarán la construcción de ADN al ADN cromosómico de las células y el gen puede integrarse en el ADN cromosómico. Otros vectores funcionarán como episomas y la construcción de ADN de terapia génica permanecerá en el citoplasma.

Además, pueden incluirse elementos reguladores para la expresión controlada del gen IFN-L en la célula diana. Dichos elementos se activan en respuesta a un efector apropiado. De esta forma, un polipéptido terapéutico puede expresarse cuando se desee. Un medio de control convencional implica el uso de pequeñas moléculas dimerizadoras o rapalogs para dimerizar proteínas quiméricas que contienen un dominio de unión a moléculas pequeñas y un dominio capaz de iniciar un proceso biológico, tal como una proteína de unión a ADN o una proteína de activación de la transcripción (véanse las Publicaciones PCT N° WO 96/41865, WO 97/31898 y WO 97/31899). La dimerización de las proteínas puede usarse para iniciar la transcripción del transgén.

Una tecnología de regulación alternativa usa un método para almacenar proteínas expresadas a partir del gen de interés en el interior de la célula como un agregado a agrupación. El gen de interés se expresa como una proteína de fusión que incluye un dominio de agregación condicional que da como resultado la retención de la proteína agregada en el retículo endoplasmático. Las proteínas almacenadas son estables e inactivas en el interior de la célula. Las proteínas pueden liberarse, sin embargo, mediante la administración de un fármaco (por ejemplo, un ligando molecular pequeño) que elimine el dominio de agregación condicional y, por lo tanto, rompa específicamente los agregados o agrupaciones de tal modo que las proteínas puedan secretarse de la célula. Véanse, Aridor *et al.*, 2000, *Science* 287: 816-17 y Rivera *et al.*, 2000, *Science* 287: 826-30.

Otros medios de control adecuados o interruptores genéticos incluyen, pero sin limitación, los sistemas que se describen en este documento. Se usa Mifepristone (RU486) como un antagonista de la progesterona. La unión de un dominio de unión a ligando de receptor de progesterona modificado con el antagonista de progesterona activa la transcripción mediante la formación de un dímero de dos factores de transcripción que después pasan hacia el interior del núcleo para unirse con el ADN. El dominio de unión a ligando se modifica para eliminar la capacidad del receptor de unirse con el ligando natural. El sistema de receptor de hormonas esteroideas se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos n° 5.364.791 y en las Publicaciones PCT N° WO 96/04911 y WO 97/10337.

Otro sistema de control más usa ecdysona (una hormona esteroidea de la mosca de la fruta) que se une a y activa un receptor de ecdysona (receptor citoplasmático). Después el receptor se transloca al núcleo para unirse a un elemento de respuesta de ADN específico (promotor del gen sensible a ecdysona). El receptor de ecdysona incluye un dominio de transactivación, un dominio de unión al ADN y un dominio de unión a ligando para iniciar la transcripción. El sistema de ecdysona se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N°. 5.514.578 y en las Publicaciones PCT N°. WO 97/38117, WO 96/37609 y WO 93/03162.

Otro medio de control usa un transactivador positivo controlable por tetraciclina. Este sistema implica un dominio de unión a ADN de proteína represora *tet* mutada (*tet* R-4 mutada con cambios aminoacídicos que dan como resultado una proteína transactivadora inversa regulada por tetraciclina, es decir, que se une a un operador *tet* en presencia de tetraciclina) unido a un polipéptido que activa la transcripción. Dichos sistemas se describen en las Patentes de Estados Unidos N°. 5.464.758, 5.650.298 y 5.654.168.

Se describen construcciones de ácidos nucleicos y sistemas de control de la expresión adicionales en las Patentes de Estados Unidos N° 5.741.679 y 5.834.186, de Innovir Laboratorios Inc.

Puede conseguirse una terapia génica *in vivo* mediante la introducción del gen que codifica el polipéptido IFN-L en células mediante la inyección local de una molécula de ácido nucleico de IFN-L o mediante otros vectores de administración virales o no virales apropiados. Hefti, 1994, *Neurobiology* 25: 1418-35. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido IFN-L puede estar contenida en un vector de virus adenoasociado (AAV) para su administración en las células a las que se dirige (véanse, por ejemplo, Johnson, Publicación PCT N° WO 95/34670; y Solicitud PCT N° PCT/US95/07178). Típicamente, el genoma de AAV recombinante contiene repeticiones terminales invertidas de AAV flanqueando una secuencia de ADN que codifica un polipéptido IFN-L unido operativamente a un promotor funcional y a secuencias de poliadenilación.

Los vectores virales adecuados alternativos incluyen, pero sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus herpes simple, lentivirus, virus de la hepatitis, parvovirus, papovavirus, poxvirus, alfavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramixovirus y vectores de virus del papiloma. La Patente de Estados Unidos N° 5.672.344 describe un sistema de transferencia génica mediada por virus *in vivo* que implica un vector HSV-1 neurotrófico recombinante. La Patente de Estados Unidos N° 5.399.346 proporciona ejemplos de un proceso para proporcionar a un paciente una proteína terapéutica mediante la administración de células humanas que han sido tratadas *in vitro* para insertar un segmento de ADN que

codifica una proteína terapéutica. Se describen métodos adicionales y materiales para la práctica de técnicas de terapia génica en las Patentes de Estados Unidos N° 5.631.236 (que implica vectores adenovirales), 5.672.510 (que implica vectores retrovirales), 5.635.399 (que implica vectores retrovirales que expresan citocinas).

5 Los métodos de administración no virales incluyen, pero sin limitación, transferencia mediada por liposomas, administración de ADN desnudo (inyección directa), transferencia mediada por receptor (complejo ADN-ligando), electroporación, precipitación con fosfato cálcico y bombardeo de micropartículas (por ejemplo, pistola génica). Los materiales y métodos de terapia génica también pueden incluir promotores inducibles, potenciadores-promotores específicos de tejido, secuencias de ADN diseñadas para la integración específica de sitio, secuencias de ADN capaces de proporcionar una ventaja selectiva sobre la célula parental, marcadores para identificar células transformadas, sistemas de selección negativa y sistemas de control de la expresión (medidas de seguridad), agentes de unión específica a células (para dirigirse a células), factores de internalización específicos de células y factores de transcripción para potenciar la expresión mediante un vector, así como métodos para la fabricación de vectores. Dichos métodos y materiales adicionales para la práctica de las técnicas de terapia génica se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 10 4.970.154 (que implica técnicas de electroporación), 5.679.599 (que describe un sistema que contiene lipoproteínas para la administración génica), 5.676.954 (que implica vehículos de liposomas), 5.593.875 (que describe métodos para la transfección por fosfato cálcico) y 4.945.050 (que describe un proceso en el que se propulsan partículas biológicamente activas en células a una velocidad a la que las partículas penetran la superficie de las células y se incorporan en el interior de las células) y la Publicación PCT N° WO 96/40958 (que implica ligandos nucleares).

20 También se describe que la terapia génica o terapia celular de IFN-L puede incluir además la administración de uno o más polipéptidos adicionales en la misma o en células diferentes. Dichas células pueden introducirse por separado en el paciente, o las células pueden contenerse en un único dispositivo implantable, tal como la membrana de encapsulación que se ha descrito anteriormente, o las células pueden modificarse por separado por medio de vectores virales.

Un medio para aumentar la expresión del polipéptido IFN-L endógena en una célula mediante terapia génica es insertar uno o más elementos potenciadores en el promotor del polipéptido IFN-L, en el que los elementos potenciadores pueden servir para aumentar la actividad transcripcional del gen de IFN-L. Los elementos potenciadores que se usen se seleccionarán en base al tejido en el que se desee activar el gen -se seleccionarán elementos potenciadores que se sabe que confieren la activación del promotor en ese tejido. Por ejemplo, si debe “activarse” un gen que codifica un polipéptido IFN-L en células T, puede usarse el elemento potenciador del promotor *lck*. Aquí, la porción funcional del elemento transcripcional que se añade puede insertarse en un fragmento de ADN que contiene el promotor del polipéptido IFN-L (y, opcionalmente, insertarse en un vector y/o secuencias flanqueantes 5' y/o 3') usando técnicas de clonación convencionales. Esta construcción, conocida como “construcción de recombinación homóloga” puede introducirse después en las células deseadas *ex vivo* o *in vivo*.

También puede usarse terapia génica para disminuir la expresión del polipéptido IFN-L mediante la modificación de la secuencia de nucleótidos del promotor endógeno. Dicha modificación se consigue, típicamente, mediante métodos de recombinación homóloga. Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene toda o una porción del promotor del gen de IFN-L seleccionado para su inactivación puede modificarse por ingeniería genética para eliminar y/o reemplazar fragmentos del promotor que regulan la transcripción. Por ejemplo, puede delecionarse la caja TATA y/o el sitio de unión de un activador de la transcripción del promotor usando técnicas de biología molecular convencionales; dicha delección puede inhibir la actividad del promotor, reprimiendo de este modo la transcripción del gen de IFN-L correspondiente. La delección de la caja TATA o del sitio de unión del activador de la transcripción en el promotor puede llevarse a cabo mediante la generación de una construcción de ADN que comprenda toda o la porción pertinente del promotor del polipéptido IFN-L (de la misma o de una especie relacionada a la del gen de IFN-L que se va a regular) en la que uno o más de los nucleótidos de la caja TATA y/o del sitio de unión del activador de la transcripción se mutan mediante sustitución, delección y/o inserción de uno o más nucleótidos. Como resultado, la caja TATA y/o el sitio de unión del activador disminuyen su actividad o se inactivan completamente. Esta construcción, que también contendrá, típicamente, al menos aproximadamente 500 bases de ADN que se corresponden con las secuencias de ADN 5' y 3' nativas (endógenas) adyacentes en el segmento del promotor que se ha modificado, puede introducirse en las células apropiadas (*ex vivo* o *in vivo*) directamente o mediante un vector viral, como se describe en este documento. Típicamente, la integración de la construcción en el ADN genómico de las células será mediante recombinación homóloga, en la que las secuencias de ADN 5' y 3' en la construcción del promotor pueden servir para ayudar a integrar la región promotora modificada mediante hibridación con el ADN cromosómico endógeno.

Usos terapéuticos

60 Pueden usarse moléculas de ácido nucleico de IFN-L, polipéptidos y agonistas y antagonistas del mismo para tratar, diagnosticar, aliviar o prevenir varias enfermedades, trastornos o afecciones, incluyendo las que se enumeran en este documento.

Los agonistas y antagonistas del polipéptido IFN-L incluyen las moléculas que regulan la actividad del polipéptido IFN-L y aumentan o disminuyen al menos una actividad de la forma madura del polipéptido IFN-L. Los agonistas o antagonistas pueden ser co-factores, tales como una proteína, péptido, hidrato de carbono, lípido o molécula de pequeño peso molecular, que interactúen con el polipéptido IFN-L y, de este modo, regule su actividad. Los agonistas o antagonistas del polipéptido potenciales incluyen anticuerpos que reaccionan con formas solubles o unidas a

membranas de polipéptidos IFN-L, que comprenden parte o todos los dominios extracelulares de dichas proteínas. Las moléculas que regulan la expresión del polipéptido IFN-L incluyen, típicamente, ácidos nucleicos que codifican el polipéptido IFN-L que pueden actuar como reguladores antisentido en la expresión.

Los polipéptidos IFN-L pueden desempeñar un papel en el control del crecimiento y mantenimiento de células cancerosas en base a la homología de polipéptidos IFN-L con interferones conocidos. Por consiguiente, pueden ser útiles moléculas de ácido nucleico de IFN-L, polipéptidos y agonistas y antagonistas del mismo para el diagnóstico y/o tratamiento del cáncer. Los ejemplos de dichos cánceres incluyen, pero sin limitación, leucemia mielógena crónica, leucemia de células vellosas, sarcoma de Kaposi, melanomas, cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer de mama, cánceres del sistema hematopoyético, cáncer de próstata, cáncer ovárico y cáncer testicular. Otros cánceres se incluyen dentro del alcance de la invención.

Los polipéptidos IFN-L pueden desempeñar un papel en la modulación del sistema inmunitario en base a la homología de polipéptidos IFN-L con interferones conocidos. Por consiguiente, pueden ser útiles moléculas de ácido nucleico de IFN-L, polipéptidos y agonistas y antagonistas del mismo para el diagnóstico y/o tratamiento de disfunciones del sistema inmunitario. Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriática, artritis inflamatoria, artrosis, enfermedad inflamatoria de las articulaciones, enfermedad autoinmune, lupus, diabetes, enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de trasplantes y enfermedad injerto contra huésped. Otras enfermedades influidas por la disfunción del sistema inmunitario se incluyen dentro del alcance de la invención.

Los polipéptidos IFN-L pueden desempeñar un papel en el control de infecciones virales y microbianas en base a la homología de polipéptidos IFN-L con interferones conocidos. Por consiguiente, pueden ser útiles moléculas de ácido nucleico de IFN-L, polipéptidos y agonistas y antagonistas del mismo para el diagnóstico y/o tratamiento de infecciones. Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen pero sin limitación, hepatitis, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano y enfermedad granulomatosa crónica. Otras enfermedades causadas por infecciones se incluyen dentro del alcance de la invención.

Los polipéptidos IFN-L pueden desempeñar un papel en el control de la formación y el mantenimiento de los huesos en base a la homología de polipéptidos IFN-L con interferones conocidos. Por consiguiente, pueden ser útiles moléculas de ácido nucleico de IFN-L, polipéptidos y agonistas y antagonistas para el diagnóstico y/o tratamiento de trastornos óseos. Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, osteoporosis, osteopetrosis, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad periodontal e hipercalcemia. Otros trastornos óseos se incluyen dentro del alcance de la invención.

Los polipéptidos IFN-L pueden desempeñar un papel en la proliferación inapropiada de células en base a la homología de polipéptidos IFN-L con interferones conocidos. Por consiguiente, pueden ser útiles moléculas de ácido nucleico de IFN-L, polipéptidos y agonistas y antagonistas para el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades en las que exista una proliferación celular anormal. Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, arterioesclerosis y reestenosis vascular. Otras enfermedades influidas por la proliferación inapropiada de células se incluyen dentro del alcance de la invención.

La presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con antígeno fas humano soluble o secretado o versiones recombinantes del mismo (Publicación PCT N° WO 96/20206; Mountz *et al.*, 1995, *J Immunol.*, 155: 4829-37; y Patente Europea N° 510691). La Publicación PCT N° WO 96/20206 describe el antígeno fas humano secretado (nativo y recombinante, incluyendo una proteína de fusión de Ig), métodos para el aislamiento de los genes responsables de codificar el antígeno fas humano recombinante soluble, métodos para la clonación del gen en vectores y tipos celulares adecuados y métodos para la expresión del gen para producir los inhibidores. La Patente Europea N° 510691 enseña ácidos nucleicos que codifican el antígeno fas humano, incluyendo antígeno fas soluble, vectores que expresan dichos ácidos nucleicos y transformantes transfectados con dicho vector. Cuando se administra por vía parenteral, las dosis de una proteína de fusión de antígeno fas soluble o secretado son generalmente de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg.

El tratamiento de las enfermedades y trastornos enumerados en este documento puede incluir el uso de fármacos de primera línea para el control del dolor y la inflamación; estos fármacos se clasifican como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los tratamientos secundarios incluyen corticosteroides, fármacos antirreumáticos de acción lenta (ARAL) o fármacos modificantes de la enfermedad (DM). Puede encontrarse información con respecto a los siguientes compuestos en *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy* (16ª ed. 1992) y en *Pharmaprojects* (PJB Publications Ltd).

La presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L y de cualquiera de uno o más AINE para el tratamiento de las enfermedades y trastornos que se enumeran en este documento, incluyendo inflamaciones agudas y crónicas, tales como enfermedades reumáticas y enfermedad de injerto contra hospedador. Los AINE deben su acción antiinflamatoria, al menos en parte, a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (7ª ed, 1985)). Los AINE pueden clasificarse en al menos nueve grupos: (1) derivados del ácido salicílico, (2) derivados del ácido propiónico, (3) derivados del ácido acético, (4) derivados del ácido fenámico, (5) derivados del ácido carboxílico, (6) derivados del ácido butírico, (7) oxicams, (8) pirazoles y (9) pirazolonas.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido salicílico, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Dichos derivados del ácido salicílico, ésteres de profármaco y sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprenden: acetaminosalol, aloxiprina, aspirina, benorilato, bromosaligenina, acetilsalicilato cálcico, trisalicilato de cloro y de magnesio, salicilato de magnesio, salicilato de cloro, diflusal, etersalato, fendosal, ácido gentísico, glicol salicilato, salicilato de imidazol, acetilsalicilato de lisina, mesalamina, salicilato de morfina, 1-naftilsalicilato, olsalazina, parsalmida, fenilacetilsalicilato, fenilsalicilato, salacetamida, ácido O-acético de salicilamida, salsalato, salicilato sódico y sulfasalazina. También se pretende que se incluyan en este grupo derivados del ácido salicílico relacionados estructuralmente que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido propiónico, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Los derivados del ácido propiónico, ésteres de profármaco y sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprenden: alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclórico, carprofeno, dexindoprofeno, fenoprofeno, flunoxarprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, furciprofeno, ibuprofeno, ibuprofeno de aluminio, ibuproxam, indoprofeno, isoprofeno, ketoprofeno, loxoprofeno, mioprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, oxaprozina, piketoprofeno, pimeprofeno, piroprofeno, pranoprofeno, ácido protizínico, piridoxiprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico y tioxaprofeno. También se pretende que se incluyan en este grupo derivados del ácido propiónico estructuralmente relacionados que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido acético, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Los derivados del ácido acético, ésteres de profármaco y sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprenden: acetaminopiracina, alclofenaco, amfenaco, bufexamaco, cinmetacina, clopiraco, delmetacina, diclofenaco potásico, diclofenaco sódico, etodolaco, felbinaco, fenclofenaco, fencloraco, ácido fenclórico, fentiazaco, furofenaco, glucametacina, ibufenaco, indometacina, isofezolaco, isoxepaco, lonazolaco, ácido metiazínico, oxametacina, oxpinaco, pimetacina, proglumetacina, sulindaco, talmetacina, tiaramida, tiopinaco, tolmetina, tolmetina sódica, zidometacina y zomepiraco. También se pretende que se incluyan en este grupo derivados del ácido acético estructuralmente relacionados que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido fenámico, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Los derivados del ácido fenámico, ésteres de profármaco y sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprenden: ácido enfenámico, etofenamato, ácido flufenámico, isonixina, ácido meclofenámico, meclofenamato sódico, ácido medofenámico, ácido mefenámico, ácido niflumico, talniflumato, terofenamato, ácido tolfenámico y ufenamato. También se pretende que se incluyan en este grupo derivados del ácido fenámico estructuralmente relacionados que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido carboxílico, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Los derivados del ácido carboxílico, ésteres de profármaco y sales farmacéuticamente aceptables del mismo que pueden usarse comprenden: clidanaco, diflunisal, flufenisal, inoridina, ketorolaco y tinoridina. También se pretende que se incluyan en este grupo derivados del ácido carboxílico estructuralmente relacionados que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido butírico, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Los derivados del ácido butírico, ésteres de profármaco y sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprenden: bumadizón, butibufén, fenbufén y xenbucina. También se pretende que se incluyan en este grupo derivados del ácido butírico estructuralmente relacionados que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más oxicams, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los oxicams, ésteres de profármaco y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: droxicam, enolicam, isoxicam, piroxicam, sudoxicam, tenoxicam y 4-hidroxil-1,2-benzotiazina-1,1-dióxido de 4-(N-fenil)-carboxamida. También se pretende que se incluyan en este grupo oxicams estructuralmente relacionados que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más pirazoles, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los pirazoles, ésteres de profármaco y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que pueden usarse comprenden: difenamizol y epirizol. También se pretende que se incluyan en este grupo pirazoles estructuralmente relacionados que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de una o más pirazolonas, ésteres de profármaco o sales farmacéu-

ticamente aceptables de las mismas. Los pirazolonas, ésteres de profármaco y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas que pueden usarse comprenden: apazona, azapropazona, benzpiperilona, feprazona, mofebutazona, morazona, oxifenbutazona, fenilbutazona, pipebuzona, propilfenazona, ramifenazona, suxibuzona y tiazolinabutazona. También se pretende que se incluyan en este grupo pirazolonas estructuralmente relacionadas que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más de los siguientes: AINE: ácido ϵ -acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxibutírico, amixetrina, anitrazafeno, antrafenina, bendazaco, lisinato de bendazaco, benzidamina, beprozina, broperamol, bucolom, bufazolaco, citproquazona, cloximato, dazidamina, deboxamet, detomidina, difenpiramida, difenpiramida, difisalamina, ditazol, emorfazona, mesilato de fanetizol, flenfumizol, floctafenina, flumizol, flunixina, fluproquazona, fopirtolina, fosfosal, guaimesal, guaiazoleno, isonixim, HCl de lefetamina, leflunomida, lofemizol, lotifazol, clonixinato de lisina, meseclazona, nabumetona, nictindol, nimesulida, orgo-teína, orpanoxina, oxaceprol, oxapadol, paranilina, perisoxal, citrato de perisoxal, pifoxime, piproxeno, pirazolaco, piferidona, proquazona, proxazol, tielavina B, tiftamizol, timegadina, tolectina, tolpadol, triptamida y los denominados mediante códigos comerciales tales como 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, FK-506, GV3658, ITF182, KCNTEI6090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (ácido 4-benzoil-1-indancarboxílico), TVX2706, U60257, UR2301 y WY41770. También se pretende que se incluyan en este grupo AINE estructuralmente relacionados que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más corticosteroides, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de las enfermedades y trastornos que se enumeran en este documento, incluyendo inflamaciones agudas y crónicas, tales como enfermedades reumáticas, enfermedad de injerto contra hospedador y esclerosis múltiple. Los corticosteroides, ésteres de profármaco y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen hidrocortisona y compuestos que proceden de hidrocortisona, tales como 21-acetoxipregnenolona, alclomerasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, valerato de betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, butirato de clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacón, desonida, desoximerasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucoronide, flumetasona, pivalato de flumetasona, flucinolona acetonida, flunisolida, fluciclonida, fluorocinolona acetonida, butil fluocortina, fluocortolona, hexanoato de fluocortolona, valerato de diflucortolona, fluorometolona, acetato de fluprednolona, acetato de fluprednido, fluprednisolona, flurandrenolida, formocortal, halcinonida, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, fosfato de hidrocortisona, succinato 21-sódico de hidrocortisona, tebutato de hidrocortisona, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicarboato, prednisolona, 21-diedriaminoacetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, succinato sódico de prednisolona, 21-*m*-sulfobenzoato sódico de prednisolona, 21-estearoglicolato sódico de prednisolona, tebutato de prednisolona, 21-trimetilacetato de prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, 21-dietilaminoacetato de prednilideno, tixocortol, triamcinolona, triamcinolona acetonida, triamcinolona benetonida y triamcinolona hexacetona. También se pretende que se incluyan en este grupo corticosteroides estructuralmente relacionados que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más fármacos antirreumáticos de acción lenta (ARAL) o fármacos antirreumáticos modificantes de la enfermedad (DMARD), ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de las enfermedades y trastornos que se enumeran en este documento, incluyendo inflamaciones agudas y crónicas, tales como enfermedades reumáticas, enfermedad de injerto contra hospedador y esclerosis múltiple. Los ARAL o DMARD, ésteres de profármaco y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: alocupreida sódica, auranofina, aurotioglucosa, aurotioglicanida, azatioprina, brequinar sódico, bucilamina, 3-aurotio-2-propanol-1-sulfonato cálcico, clorambucilo, cloroquina, clobuzarita, cuproxolina, ciclofosfamida, ciclosporina, dapsona, 15-desoxipergualina, diacereína, glucosamina, sales de oro (por ejemplo, sal de oro de cicloquina, tiomalato sódico de oro, tiosulfato sódico de oro, hidroxiclороquina, sulfato de hidroxiclороquina, hidroxiiurea, kebusona, levamisol, lobenzarita, melitina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mizoribina, mofetil de micofenolato, mioral, mostaza de nitrógeno, D-penicilamina, piridinol imidazoles tales como SKNF86002, y SB203580, rapamicina, tioles, timopoyetina y vincristina. También se pretende que se incluyan dentro de este grupo ARAL o DMARD estructuralmente relacionados que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención describe el uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, postratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más inhibidores COX2, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de las enfermedades y trastornos que se enumeran en este documento, incluyendo inflamaciones agudas y crónicas. Los ejemplos de inhibidores COX2, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen, por ejemplo, celecoxib. También se pretende que se incluyan en este grupo inhibidores COX2 relacionados que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares.

Además, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido IFN-L en combinación (pretratamiento, pos-tratamiento o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más antimicrobianos, ésteres de profármaco o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de las enfermedades y trastornos que se enumeran en este documento, incluyendo inflamaciones agudas o crónicas. Los antimicrobianos incluyen, por ejemplo, las clases generales de penicilinas, cefalosporinas y otros betalactámicos, aminoglicósidos, azoles, quinolonas, macrólidos, rifamicinas, tetraciclinas, sulfonamidas, lincosamidas y polimixinas. Las penicilinas incluyen, pero sin limitación, penicilina G, penicilina V, metecilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato, hetacilina, ciclacilina, bacampicilina, carbenicilina, indanil carbenicilina, ticarcilina, ticarcilina/clavulanato, azlocilina, mezlocilina, peperacilina y mecilina. Las cefalosporinas y otros betalactámicos incluyen, pero sin limitación, cefalotina, cefafirina, cefalexina, cepradina, cefazolina, cefadroxi-lo, cefaclor, cefamandol, cefotetano, cefoxitina, ceruroxima, cefonicid, ceforadina, cefixime, cefotaxime, moxalactam, ceftizoxime, ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidima, imipenem y aztreonam. Los aminoglicósidos incluyen, pero sin limitación, estreptomina, gentamicina, trobramicina, amikacina, netilmicina, kanamicina y neomicina. Los azoles incluyen, pero sin limitación, fluconazol. Las quinolonas incluyen, pero sin limitación, ácido nalidíxico, norfloxacin, enoxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, esparfloxacina y temafloxacina. Los macrólidos incluyen, pero sin limitación, eritromicina, espiramicina y azitromicina. Las rifamicinas incluyen, pero sin limitación, rifampina. Las tetraciclinas incluyen, pero sin limitación, espiciclina, clortetracilina, clomociclina, democlociclina, deoxiciclina, guameciclina, limeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, penimepiclina, pipaciclina, rolitetraciclina, sanciclina, senociclina y tetracilina. Las sulfonamidas incluyen, pero sin limitación, sulfanilamida, sulfametoxazol, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfisoxazol y co-trimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol). Las lincosamidas incluyen, pero sin limitación, clindamicina y lincomicina. Las polimixinas (polipéptidos) incluyen, pero sin limitación, polimixina B y colistina.

Los agonistas o antagonistas de la función del polipéptido IFN-L pueden usarse (simultáneamente o secuencialmente) junto con una o más citocinas, factores de crecimiento, antibióticos, antiinflamatorios y/o agentes quimioterápicos cuando sea apropiado para la afección que se trata.

Se contemplan otras enfermedades causadas por o mediadas por niveles indeseables de polipéptidos IFN-L. Los niveles indeseables incluyen niveles excesivos de polipéptidos IFN-L y niveles por debajo de lo normal de polipéptidos IFN-L.

Usos de ácidos nucleicos y polipéptido IFN-L

Las moléculas de ácido nucleico de la invención (incluyendo las que no codifican polipéptidos biológicamente activos en sí) pueden usarse para mapear las localizaciones del gen de IFN-L y genes relacionados en cromosomas. El mapeo puede realizarse mediante técnicas conocidas en el campo, tales como amplificación por PCR e hibridación *in situ*.

Pueden ser útiles moléculas de ácido nucleico de IFN-L (incluyendo las que no codifican polipéptidos biológicamente activos en sí) como sondas de hibridación en ensayos de diagnóstico para analizar, cualitativa o cuantitativamente, la presencia de una molécula de ácido nucleico de IFN-L en muestras de tejido o fluido corporal de mamíferos.

También pueden emplearse otros métodos cuando es deseable inhibir la actividad de uno o más polipéptidos IFN-L. Dicha inhibición puede efectuarse mediante moléculas de ácido nucleico que sean complementarias a y que hibriden con secuencias de control de la expresión (formación de triple hélice) o con ARNm de IFN-L. Por ejemplo, pueden introducirse en la célula moléculas de ADN o ARN antisentido que tengan una secuencia que sea complementaria con al menos una porción de un gen IFN-L. Pueden diseñarse sondas antisentido mediante técnicas disponibles usando la secuencia del gen IFN-L que se describe en este documento. Típicamente, cada una de dichas moléculas antisentido será complementaria al sitio de inicio (extremo 5') de cada gen de IFN-L seleccionado. Después, cuando la molécula antisentido hibrida con el correspondiente ARNm de IFN-L se evita o se reduce la traducción de este ARNm. Los inhibidores antisentido proporcionan información con respecto a la disminución o ausencia de un polipéptido IFN-L en una célula u organismo.

Como alternativa, puede emplearse terapia génica para generar un inhibidor negativo dominante de uno o más polipéptidos IFN-L. En esta situación, el ADN que codifica un polipéptido mutante de cada polipéptido IFN-L seleccionado puede prepararse e introducirse en las células de un paciente usando métodos virales o no virales que se describen en este documento. Cada uno de dichos mutantes se diseña típicamente para competir con el polipéptido endógeno en su papel biológico.

Además, un polipéptido IFN-L, ya sea biológicamente activo o no, puede usarse como inmunógeno, es decir, el polipéptido contiene al menos un epítipo contra el que pueden generarse anticuerpos. Los agentes de unión selectiva que se unen a un polipéptido IFN-L (como se describe en este documento) pueden usarse para fines de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*, incluyendo, pero sin limitación, su uso en forma marcada para detectar la presencia del polipéptido IFN-L en una muestra celular o de fluido corporal. Los anticuerpos también pueden usarse para prevenir, tratar o diagnosticar varias enfermedades y trastornos, incluyendo las que se enumeran en este documento. Los anticuerpos pueden unirse a un polipéptido IFN-L de tal modo que disminuyan o bloqueen al menos una actividad característica de un polipéptido IFN-L, o pueden unirse a un polipéptido para aumentar al menos una actividad característica de un polipéptido IFN-L (incluyendo el aumento de la farmacocinética del polipéptido IFN-L).

Los polipéptidos IFN-L de la presente invención pueden usarse para clonar receptores de polipéptido IFN-L, usando una estrategia de clonación y expresión. Puede usarse polipéptido IFN-L radiomarcado (¹²⁵yodo) o un polipéptido IFN-L marcado por afinidad/actividad (tal como una fusión de Fc o una fusión de fosfatasa alcalina) en ensayos de unión para identificar un tipo celular o línea celular o tejido que exprese receptores del polipéptido IFN-L. El ARN aislado de dichas células o tejidos puede convertirse en ADNc, clonarse en un vector de expresión de mamíferos y transfectarse en células de mamíferos (tales como células COS o 293) para generar una genoteca de expresión. Después, puede usarse un polipéptido IFN-L marcado o radiomarcado como ligando de afinidad para identificar y aislar de esta genoteca el subconjunto de células que expresan los receptores del polipéptido IFN-L en su superficie. Después, puede aislarse el ADN de estas células y transfectarse en células de mamífero para generar una genoteca de expresión secundaria en la que la fracción de células que expresan receptores de polipéptido IFN-L es varias veces superior a la de la genoteca original. Este proceso de enriquecimiento puede repetirse sucesivamente hasta que se aisle un único clon recombinante que contenga un receptor de polipéptido IFN-L. El aislamiento de los receptores de polipéptidos IFN-L es útil para identificar o desarrollar nuevos agonistas y antagonistas de la ruta de señalización del polipéptido IFN-L. Dichos agonistas y antagonistas incluyen receptores de polipéptido IFN-L solubles, anticuerpos anti-receptor de polipéptido IFN-L, pequeñas moléculas u oligonucleótidos antisentido, y pueden usarse para tratar, prevenir o diagnosticar una o más enfermedades o trastornos descritos en este documento.

Se realizó un depósito de ADNc que codifica el polipéptido IFN-L humano subclonado en pSPORT1 (Gibco BRL) y transfectado en la cepa DH10B de *E. coli*, que tiene N° de acceso PTA-976, en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, el 23 de noviembre de 1999.

Se pretende que los siguientes ejemplos tengan fines ilustrativos únicamente y de ningún modo deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Clonación del gen del polipéptido IFN-L de rata

Generalmente, se usaron materiales y métodos que se describen en Sambrook *et al*; anteriormente, para clonar y analizar el gen que codifica el polipéptido IFN-L de rata.

Se aislaron secuencias que codificaban el polipéptido IFN-L de rata a partir de un genoteca de ADNc de placenta de rata mediante secuenciación de ADNc aleatoria a gran escala junto con análisis asistido por ordenador. Para construir la genoteca de ADNc de placenta de rata, se preparó ARNm de placenta de embrión de rata de 17 días [E17] mediante métodos convencionales (Chomczynski y Sacchi, 1987, *Anal. Biochem* 162: 156). Después de la síntesis usando el kit Superscript Plasmid cDNA (Gibco BRL), el ADNc de rata se subclonó en los sitios *Sal* I y *Not* I del vector pSPORT1 (Gibco BRL).

El análisis de secuencia del ADNc de longitud completa del polipéptido IFN-L de rata indicó que el gen comprende una fase de lectura abierta de 573 pb que codifica una proteína de 191 aminoácidos (Figuras 1A-1B). La secuencia del polipéptido IFN-L de rata se predice que contiene un péptido señal (Figura 1A, el péptido señal predicho se indica mediante *subrayado*). La secuencia del polipéptido IFN-L de rata se identificó como un nuevo miembro de la familia de proteínas del interferón después de la comparación de la secuencia del polipéptido IFN-L de rata con secuencias de proteínas de la base de datos GenBank.

Ejemplo 2

Clonación del gen del polipéptido IFN-L humano

Generalmente, se usaron los materiales y métodos que se describen en Sambrook *et al.*, anteriormente, para clonar y analizar el gen que codifica el polipéptido IFN-L humano.

Un examen de la estructura genómica de miembros conocidos de la familia de genes de interferón reveló que los miembros de esta familia comparten una estructura única sin intrones. Las secuencias que codificaban el polipéptido IFN-L humano se aislaron, por lo tanto, mediante la exploración de una genoteca de ADN genómico humano con una sonda obtenida a partir del gen del polipéptido IFN-L de rata.

Se generó una sonda de IFN-L de rata radiactiva mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADNc del polipéptido IFN-L de rata. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron usando un termociclador Perkin-Elmer 9600 (PE Biosystems, Foster City, CA) y las siguientes condiciones de reacción: 20 ng de ADNc de polipéptido IFN-L de rata, 20 pmol de cada uno de los cebadores 1795-01 (5'-A-T-G-A-C-A-C-T-G-A-A-G-T-A-T-T-A-T-G-G-3', SEC ID N°: 20) Y 1795-02 (5'-A-T-T-C-A-T-G-T-T-G-A-G-T-A-G-T-T-G-T-A-3'; SEC ID N°: 21), 1 mmol de cada uno de dATP, dTTP, dGTP, 0,01 mmol de dCTP, ³²P-dCTP 100 µCi, MgCl₂ 4 mM, tampón de PCR 1x y polimerasa Taq 5U (PE Biosystems). Se preparó una reacción de PCR "fría" (es decir, una que no se realiza en presencia de dCTP marcado de forma radiactiva y utiliza una mezcla de dNTP equilibrada) simultáneamente con la reacción marcada. Las reacciones de amplificación se realizaron a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto durante 45 ciclos. Se purificaron sondas marcadas y no marcadas combinadas usando una columna Quick Spin G-50 (Qiagen), se llevaron a ebullición a 100°C durante 10 minutos y

ES 2 300 280 T3

se enfriaron en hielo durante 20 minutos antes de añadir la solución de hibridación. Se generaron sondas con una actividad específica de al menos 5×10^5 cpm/ μ l usando este método.

- Se aislaron secuencias que codificaban el polipéptido IFN-L humano mediante la exploración de una genoteca de ADN genómico lambda humano (Stratagene, Cat. N°. 946206). Para la exploración principal, se sembraron en placas 1×10^6 clones a una densidad de 50.000 colonias/placa y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa usando técnicas convencionales. Los clones positivos se volvieron a explorar antes del análisis.

- La sonda de IFN-L de rata se hibridó con los filtros durante una noche a 42°C en formamida al 30%, SSC 5X, Denhart 2X, ADN de esperma de salmón 10 μ g/ml, SDS al 0,2%, EDTA 2 mM y pirofosfato al 0,1%. Después de la hibridación, los filtros se lavaron durante 30-60 minutos a temperatura ambiente en SSC 1X y SDS al 0,1% y después durante 15 minutos a 55°C en SSC 0,2X y SDS al 0,1%.

- Se recuperaron tres clones positivos después de la exploración primaria y secundaria y se preparó el ADN del fago lambda mediante un método de cultivo en placa sólida. El inserto *Not* 1 se escindió de los clones y se ligó en pSPORT1 (Gibco, BRL), y estas ligaciones se usaron posteriormente para transformar la cepa de DH10 de *E. coli*. Después de la transformación, se recuperaron los plásmidos usando un kit de preparación de plásmidos Spin Column (Qiagen).

- Los plásmidos obtenidos a partir de estos tres clones positivos de ADN genómico se analizaron mediante análisis por transferencia de Southern usando la sonda de IFN-L de rata utilizada en la exploración de la genoteca de ADN genómico. Después de digerir el ADN plasmídico recuperado con *Hind* III, los fragmentos digeridos se resolvieron en un gel de agarosa y después se transfirieron a una membrana de nailon. Las condiciones de hibridación eran idénticas a las utilizadas en la exploración de la genoteca de ADN genómico. El análisis por transferencia de Southern indicó que era probable que los tres clones genómicos positivos contuvieran insertos genómicos idénticos. Los fragmentos que hibridaron con la sonda de IFN-L de rata se subclonaron posteriormente en pSPORT1 para el análisis de secuenciación. Este análisis confirmó que los tres clones de ADN genómico positivos contenían insertos genómicos idénticos.

- El análisis de secuencia de los tres clones genómicos que contenían secuencias que codificaban el polipéptido IFN-L humano indicó que el gen comprende una fase de lectura abierta de 621 pb que codifica una proteína de 207 aminoácidos (Figuras 2A-2B). La secuencia del polipéptido IFN-L humano se predice que contiene un péptido señal (Figura 2A, el péptido señal predicho se indica mediante *subrayado*). El análisis de secuencia del polipéptido IFN-L sugiere firmemente que la proteína es una molécula de citocina secretada.

- Se observó una similitud del 64% entre la fase de lectura abierta del gen de IFN-L humano y el ADNc de IFN-L de rata. La Figura 3 ilustra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido IFN-L humano (SEC ID N°: 5), del IFN- β humano (SEC ID N°: 7) y del polipéptido IFN-L de rata (SEC ID N°: 2). El polipéptido IFN-L humano tiene una identidad del 30% con el IFN- β humano. El polipéptido IFN-L humano tiene una identidad del 40,5% con y una similitud del 50% con el polipéptido IFN-L de rata. Los cinco restos de cisteína predichos en el polipéptido IFN-L humano se alinean perfectamente con los del polipéptido IFN-L de rata.

Ejemplo 3

Expresión de ARNm de IFN-L

- Se determinaron los patrones de expresión evolutivos de ARNm de IFN-L mediante análisis por transferencia de Northern usando una sonda de ADNc de rata de longitud completa marcada con ^{32} P para detectar la presencia del transcrito del polipéptido IFN-L en varias fases diferentes de embriones de rata y de ratón. Se aisló el ARN de los embriones de rata y de ratón usando las mismas técnicas que se emplearon para la construcción de la genoteca de ADNc de placenta de rata. Las transferencias de Northern se prehibridaron en formamida al 40%, SSC 5X, EDTA 1 mM y SDS al 0,1% durante 4 horas a 42°C. Las transferencias se hibridaron durante una noche a 42°C en la misma solución, excepto por la adición de la sonda de IFN-L de rata. Después de la hibridación, las transferencias se lavaron durante 30 minutos a 60°C en SSC 1X y SDS al 0,1%.

- Se examinó la expresión de ARNm de IFN-L en diversos tejidos humanos mediante RT-PCR usando técnicas convencionales. Se detectó el ARNm de IFN-L humano en páncreas, intestino delgado, próstata, útero, tiroides y placenta.

- La expresión de ARNm de IFN-L se localizó mediante hibridación *in situ*. Se fijó un panel de tejidos normales de ratón adulto y embrionario en paraformaldehído al 4%, se embebieron en parafina y se seccionaron a 5 μ m. Los segmentos seccionaron se permeabilizaron en HCl 0,2 M, se digirieron con proteinasa K y se acetilaron con trietanolamina y acético anhidro. Las secciones se prehibridaron durante 1 hora a 60°C en solución de hibridación (NaCl 300 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 5 mM, solución de Denhardt 1X, SDS al 0,2%, DTT 10 mM, ARNt 0,25 mg/ml, polia 25 μ g/ml, poliC 25 μ g/ml y formamida al 50%) y después se hibridaron durante una noche a 60°C en la misma solución que contenía dextrano al 10% y 2×10^4 cpm/ μ l de una ribosonda antisentido marcada por ^{33} P complementaria al gen de IFN-L humano. La ribosonda se obtuvo mediante la transcripción *in vitro* de un clon que contenía las secuencias de ADNc del IFN-L humano, usando técnicas convencionales.

Después de la hibridación, las secciones se aclararon en solución de hibridación, se trataron con ARNasa para digerir la sonda no hibridada y después se lavaron en SSC 0,1X a 55°C durante 30 minutos. Después, las secciones se sumergieron en emulsión NTB-2 (Kodak, Rochester, NY), se expusieron durante 3 semanas a 4°C, se revelaron y se contratiñeron con hematoxilina y eosina. Se analizó simultáneamente la morfología tisular y la señal de hibridación mediante iluminación de campo oscuro y convencional para cerebro (una sección sagital y dos coronarias), tracto gastrointestinal (esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon proximal y colon distal), glándula pituitaria, hígado, pulmón, corazón, bazo, timo, ganglios linfáticos, riñón, glándulas adrenales, vejiga, páncreas, glándula salivales, órganos reproductores masculinos y femeninos (ovario, oviducto, y útero en la hembra; y testículos, epidídimo, próstata, vesícula seminal y vaso deferente en el macho), BAT y WAT (subcutáneo y perirrenal), hueso (fémur), piel, mama y músculo esquelético.

Ejemplo 4

Producción de polipéptidos IFN-L

A. Expresión de polipéptidos IFN-L en bacterias

Se usó PCR para amplificar secuencias de ADN molde que codifican polipéptido IFN-L humano o de rata usando cebadores que se corresponden con los extremos 5' y 3' de la secuencia (Tabla I) y que incorporaban sitios de enzimas de restricción para permitir la inserción del producto amplificado en un vector de expresión. Después de la amplificación, los productos de PCR se purificaron en gel, se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas y se ligaron en el vector de expresión pAMG21 (ATTCC N° 98113) usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Después del ligamiento de las secuencias del inserto de PCR y del vector, se usaron las mezclas de reacción del ligamiento para transformar una cepa hospedadora de *E. coli* (por ejemplo, cepa N° 2596 de Amgen) mediante electroporación y se seleccionaron los transformantes por su resistencia al fármaco kanamicina. Se aisló el ADN plasmídico de las colonias seleccionadas y se sometió a secuenciación de ADN para confirmar la presencia de un inserto apropiado.

Para construir un vector de expresión bacteriana del polipéptido IFN-L de rata, se amplificaron las secuencias de ácido nucleico de IFN-L a partir de un molde ADNc usando los cebadores 1825-22 y 1825-21. El producto de PCR que se obtuvo después de la amplificación con estos cebadores se insertó en los sitios *Nde* I y *Bam* HI de pAMG21 y, después, la reacción de ligamiento se usó en la transformación bacteriana. El clon bacteriano resultante se denominó cepa N° 3729 de Amgen. La Figura 4 ilustra la secuencia de nucleótidos del inserto pAMG21 de la cepa N° 3729 de Amgen y la secuencia de aminoácidos predicha codificada por este inserto.

Se construyó un vector de expresión bacteriana de polipéptido IFN-L de rata, en el que la cisteína en la posición 180 se sustituyó con un resto de serina, usando los cebadores 1825-22 y 1909-56. El producto de PCR que se obtuvo después de la amplificación con estos cebadores se insertó en los sitios *Nde* I y *Bam* HI de pAMG21 y después se usó la reacción de ligamiento en la transformación bacteriana.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla I

SEC ID	ID del oligonucleótido	Secuencia
22	1825-22	5'-GAATAACATATGTGTATATCTCGATCATACTATCTTGGAGAAATATG-3'
23	1825-21	5'-CCGGGATCCATTAAATTCATGTTTCAGCAGTTTGTAAAAAATACTGAAACAACGACGAAATTTCC-3'
24	1909-56	5'-CCGGGATCCATTAAATTCATGTTTCAGCAGTTTGTAAAAAATACTGAAAGAACGACGAAATTTCC-3'
25	1967-32	5'-TTGATCTAGAAAGGAGGAATAACATATGTGTAACTGCTGAACGTTTCACTGCGTGTACCTGG-3'
26	1982-14	5'-CCGGGATCCATTATTTACGACGGAACAGAGCGGTAAATTTGTAAAAGTAGTACAGGCAACGATTTCC-3'
27	1967-33	5'-CCGGGATCCATTATTTACGACGGAACAGAGCGGTAAATTTGTAAAAGTAGTACAGAGAACGACGGATTTCCC-3'
28	2103-87	5'-AAGGAGCATATGCTGGACTGTAACTGCTGAACGTTTCAC-3'
29	1200-54	5'-GTTATTGCTCAGCGGTGGCA-3'

ES 2 300 280 T3

El clon bacteriano resultante se denominó cepa N° 3858 de Amgen. La Figura 5 ilustra la secuencia de nucleótidos del inserto pAMG21 de la cepa 3858 de Amgen y la secuencia de aminoácidos predicha codificada por este inserto.

Para construir un vector de expresión bacteriana de polipéptido IFN-L humano, se amplificaron las secuencias de ácido nucleico de IFN-L a partir de un molde de ADNc usando los cebadores 1967-32 y 1982-14. El producto de PCR que se obtuvo después de la amplificación con estos cebadores se insertó en los sitios *Xba* I y *Bam* HI de pAMG21 y, después, la reacción de ligamiento se usó en la transformación bacteriana. El clon bacteriano resultante se denominó cepa N° 4047 de Amgen. La Figura 6 ilustra la secuencia de nucleótidos del inserto pAMG21 de la cepa N° 4047 de Amgen y la secuencia de aminoácidos predicha codificada por este inserto.

Un vector de expresión bacteriana del polipéptido IFN-L humano, en el que la cisteína de la posición 193 se sustituyó con un resto de serina, se construyó usando los cebadores 1967-32 y 1967-33. El producto de PCR que se obtuvo después de la amplificación con estos cebadores se insertó en los sitios *Xba* I y *Bam* HI de pAMG21 y, después, la reacción de ligamiento se usó en la transformación bacteriana. El clon bacteriano resultante se denominó cepa N° 3969 de Amgen. La Figura 7 ilustra la secuencia de nucleótidos del inserto pAMG21 de la cepa N° 3969 Amgen y la secuencia de aminoácidos predicha codificada por este inserto.

Un vector de expresión bacteriana del polipéptido IFN-L humano, que expresaba una variante N-terminal del polipéptido IFN-L humano, se construyó mediante la amplificación del plásmido de la cepa N° 4047 con los cebadores 1967-32 y 1967-33. El producto de PCR que se obtuvo después de la amplificación con estos cebadores se insertó en los sitios *Nde* I y *Bam* HI de pAMG21 y, después, la reacción de ligamiento se usó en la transformación bacteriana. El clon bacteriano resultante se denominó cepa N° 4182 de Amgen. La Figura 8 ilustra la secuencia de nucleótidos del inserto pAMG21 de la cepa N° 4182 de Amgen y la secuencia de aminoácidos predicha codificada por este inserto.

Para generar polipéptidos IFN-L, las células hospedadoras transformadas se incubaron primero en medio de caldo Terrific que contenía kanamicina 50 µg/ml a 30°C antes de la inducción del polipéptido IFN-L. La expresión del polipéptido IFN-L se indujo mediante la adición de N-(3-oxohexanoil)-*dl*-homoserina lactona 30 ng/ml seguida de una incubación de seis horas a 30°C o a 37°C. La expresión del polipéptido IFN-L se evaluó mediante la centrifugación del cultivo, resuspensión y lisis de los sedimentos bacterianos y el análisis de proteínas de las células hospedadoras mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Se escindió una única banda de un gel de SDS-poliacrilamida que se correspondía con el polipéptido IFN-L producido en *E. coli* a partir del gel y se determinó la secuencia de aminoácidos N-terminal, esencialmente como se describe en Matsudaira *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 10-35).

Los polipéptidos IFN-L se purificaron de la forma siguiente. Las células se lisaron primero en agua por homogeneización de alta presión y se recogieron los cuerpos de inclusión mediante centrifugación. Los cuerpos de inclusión solubilizados se sometieron después a una diversidad de condiciones de plegamiento.

B. Construcción de vectores de expresión de mamíferos de polipéptido IFN-L

Se produjeron versiones de proteína nativa y de fusión de proteína nativa-Fc de los polipéptidos IFN-L tanto humanos como de rata en un sistema de expresión de mamíferos CHO o 293. Las secuencias de ADN molde que codificaban polipéptidos IFN-L se amplificaron mediante PCR usando los cebadores correspondientes a los extremos 5' y 3' (Tabla II).

Para construir vectores de expresión de polipéptido IFN-L, se amplificaron secuencias de ácido nucleico de IFN-L como se describe a continuación. Se obtuvieron secuencias de ácido nucleico de IFN-L de rata usando uno de tres pares de cebadores (el cebador directo 1847-77 y 1847-88, 1896-56 o 1896-57). Se generó una construcción de fusión de polipéptido IFN-L de rata-Fc mediante la clonación de productos de PCR preparados con el primer conjunto de cebadores, que incorporaban sitios de clonación *Hind* III y *Not* I y ningún codón de terminación. Se generaron polipéptidos solubles de IFN-L de rata mediante la clonación de productos de PCR preparados con el segundo conjunto de cebadores, que incorporaban sitios de clonación *Hind* III y *Sal* I y dos codones de terminación en pDSRα, o el tercer conjunto de cebadores, que incorporaban sitios de clonación *Hind* III y *Not* I y dos codones de terminación, en pCEP4.

Tabla II

SEC ID	ID del oligonucleótido	Secuencia
30	1847-77	5'-CCCAAGCTTACCATGACACTGAAGTATTTATG-3'
31	1847-78	5'-AAGGAAAAAAGCGCGCATTCATGTTGAGTAG-3'
32	1896-56	5'-ACGCGTCGACTCATCAATTCATGTTGAGTAGTTTG-3'
33	1896-57	5'-AAGGAAAAAAGCGCGCTCATCAATTCATGTTGAGTAG-3'
34	1954-45	5'-ACGCGTCGACTTATTAATTCCTCCTGAATAG-3'
35	1954-56	5'-AAGGAAAAAAGCGCGCTTATTAATTCCTCCTGAATAGAGC-3'
36	1955-44	5'-CCCAAGCTTACCATGAGCACCAACCTGATATG-3'
37	1954-47	5'-CCCAAGCTTACCATGATTCAAAAGTGTGTGGC-3'
38	1954-48	5'-AAGGAAAAAAGCGCGCGCCCTCGATTTTCCTCTAGAATAGAGCTGTAA-3'
39	1954-49	5'-AAGGAAAAAAGCGCGCGCTTTCCTCCTGAATAGAGCTGTAA-3'

Se obtuvieron secuencias de ácido nucleico de IFN-L humanas usando uno de tres pares de cebadores (el cebador directo 1954-48 y 1954-49 y el cebador directo 1955-44 y 1854-45 o 1854-46). Se generó una construcción de fusión de polipéptido IFN-L humano-Fc mediante la clonación de los productos de PCR preparados con el primer conjunto de cebadores, que incorporaban sitios de clonación de *Not* I, sin codón de terminación y un sitio de escisión de factor Xa. Se generaron polipéptidos IFN-L humanos solubles mediante la clonación de productos de PCR preparados con el segundo conjunto de cebadores, que incorporaban sitios de clonación *Hind* III y *Sal* I y dos codones de terminación, en pDSR α , o el tercer conjunto de cebadores, que incorporaban sitios de clonación *Hind* III y *Not* I y dos codones de terminación, en pCEP4. También se utilizó un segundo cebador directo (1954-47) en lugar del 1955-44 para generar construcciones que poseyeran dos codones de inicio.

Se realizaron amplificaciones por PCR usando un termociclador Perkin-Elmer 9600 y las siguientes condiciones de reacción: 20 ng de ADNc de polipéptido IFN-L humano o de rata, 20 pmol de cada uno de los cebadores apropiados, 1 mmol de dNTP, MgCl₂ 4 mM; tampón de PCR 1X y polimerasa Taq 5 U (PE Biosystems). Se realizaron las reacciones de amplificación a 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto durante 4 ciclos seguidos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto durante 26 ciclos.

Los productos de PCR se purificaron usando columnas de centrifugación para purificación de PCR Qiagen y después se sometieron a digestión con las endonucleasas de restricción apropiadas. Después de la digestión, se separaron los fragmentos en geles de agarosa, se purificaron usando columnas de centrifugación para purificación en gel de Qiagen y se ligaron en los vectores apropiados. Las ligaciones se usaron para transformar la cepa DH10 de *E. coli*. Después del análisis de secuencia de los transformantes seleccionados, se prepararon reservas de plásmido a gran escala para la transfección de cultivos tisulares.

C. Expresión y purificación de polipéptido IFN-L en células de mamífero

Se introdujeron construcciones de expresión de polipéptido IFN-L en células 293 EBNA o CHO usando un protocolo de lipofección o de fosfato cálcico.

Para realizar estudios funcionales sobre los polipéptidos IFN-L que se produjeron, se generaron grandes cantidades de medios condicionados a partir de un conjunto de clones EBNA 293 seleccionados con higromicina. Las células se cultivaron en matraces triples de Nunc de 500 cm hasta una confluencia del 80% antes de cambiarlas a medios sin suero una semana antes de recoger los medios. Los medios condicionados se recogieron y se congelaron a -20°C hasta la purificación.

Los medios condicionados se purificaron mediante cromatografía de afinidad como se describe a continuación. Los medios se descongelaron y se hicieron pasar después a través de un filtro de 0,2 μ m. Se equilibró una columna de proteína G con PBS a pH 7,0 y después se cargó con los medios filtrados. La columna se lavó con PBS hasta que la absorbancia a A₂₈₀ alcanzó las medidas basales. El polipéptido IFN-L se eluyó de la columna con HCl-glicina 0,1 M a pH 2,7 y se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 1 M a pH 8,5. Las fracciones que contenían polipéptido IFN-L se combinaron, se dializaron en PBS y se almacenaron a -70°C.

Para la escisión del factor Xa del polipéptido de fusión de polipéptido IFN-L humano-Fc, la proteína purificada por cromatografía de afinidad se dializó en Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 2 mM a pH 8,0. La proteasa de restricción factor Xa se añadió a la proteína dializada a 1/100 (p/p) y la muestra se digirió durante una noche a temperatura ambiente.

Ejemplo 5

Actividad biológica de polipéptidos IFN-L

Se ensayó la fosforilación del polipéptido IFN-L de la forma siguiente. Las líneas celulares se expusieron a 1 μ g/ml del polipéptido de fusión IFN-L de rata-Fc generado en el Ejemplo 4C o a una solución de control a 37°C durante 15 minutos. Después de la exposición a polipéptido IFN-L, las células se lisaron y las proteínas celulares se recuperaron y se separaron por SDS-PAGE. Después las proteínas separadas se analizaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo anti-pTyr. Varias líneas celulares demostraron un aumento en la fosforilación de proteínas celulares después de la exposición a polipéptido de fusión IFN-L-Fc.

Ejemplo 6

Producción de anticuerpos anti-polipéptido IFN-L

Pueden obtenerse anticuerpos contra polipéptidos IFN-L mediante la inmunización con proteína purificada o con péptidos IFN-L producidos por síntesis biológica o química. Los procedimientos adecuados para generar anticuerpos incluyen los que se describen en Hudson y Bay, *Practical Immunology* (2ª ed. Blackwell Scientific Publications).

En un procedimiento para la producción de anticuerpos, se inyectan animales (típicamente ratones o conejos) con un antígeno IFN-L (tal como un polipéptido IFN-L) y los que tienen niveles de valores en suero suficientes determinados por ELISA se seleccionan para producción de hibridomas. Se recogen los bazos de los animales inmunizados y

se preparan como suspensiones de una sola célula a partir de las que se recuperan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan con células de mieloma de ratón (tal como células Sp2/0-Ag14), se incuban primero en DMEM con penicilina 200 U/ml, sulfato de estreptomicina 200 µg/ml y glutamina 4 mM y después se incuban en medio de selección HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Después de la selección, los sobrenadantes de cultivo tisular se toman de cada pocillo de fusión y se ensayan para determinar la producción de anticuerpo anti-IFN-L por ELISA.

También pueden emplearse procedimientos alternativos para obtener anticuerpos anti-IFN-L, tales como la inmunización de ratones transgénicos que portan loci de Ig humanas para la producción de anticuerpos humanos y la exploración de bibliotecas de anticuerpos sintéticos, tales como las que se generan por mutagénesis de un dominio variable de anticuerpo.

Ejemplo 7

Expresión de polipéptido IFN-L en ratones transgénicos

Para evaluar la actividad biológica del polipéptido IFN-L, se prepara una construcción que codifica una proteína de fusión de polipéptido IFN-L/Fc bajo el control de un promotor ApoE específico de hígado. La administración de esta construcción se espera que cause cambios patológicos que sean informativos de la función del polipéptido IFN-L. De forma similar, se prepara una construcción que contiene el polipéptido IFN-L de longitud completa bajo el control del promotor de la beta actina. La administración de esta construcción se espera que de como resultado una expresión ubicua.

Para generar estas construcciones, se usa PCR para amplificar las secuencias de ADN molde que codifican un polipéptido IFN-L usando cebadores que se corresponden con los extremos 5' y 3' de la secuencia deseada y que incorporan sitios de enzimas de restricción para permitir la inserción del producto amplificado en un vector de expresión. Después de la amplificación, los productos de PCR se purifican en gel, se digieren con las enzimas de restricción apropiadas y se ligan en un vector de expresión usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, las secuencias del polipéptido IFN-L amplificadas pueden clonarse en un vector de expresión bajo el control del promotor de β -actina humano, como se describe en Graham *et al.*, 1997, *Nature Genetics*, 17: 272-74 y Ray *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5: 2265-73.

Después del ligamiento, se usan mezclas de reacción para transformar una cepa de hospedador *E. coli* por electroporación y se seleccionan los transformantes por su resistencia a fármacos. Se aísla el ADN plasmídico de las colonias seleccionadas y se somete a secuenciación de ADN para confirmar la presencia de un inserto apropiado y la ausencia de mutaciones. El vector de expresión de polipéptido IFN-L se purifica mediante dos vueltas de centrifugación en gradiente de densidad de CsCl, escisión con una enzima de restricción adecuada y el fragmento linealizado que contiene el transgén de polipéptido IFN-L se purifica mediante electroforesis en gel. El fragmento purificado se resuspende en Tris 5 mM, pH 7,4 y EDTA 0,2 mM a una concentración de 2 mg/ml.

Se inyectaron embriones de una sola célula de ratones de estirpe BDF1 x BDF1 como se ha descrito (Publicación PCT N° WO 97/23614). Los embriones se cultivaron durante una noche en un incubador de CO₂ y se transfirieron 15-20 embriones a dos células a los oviductos de una ratona hembra CD1 pseudogestante. La descendencia obtenida a partir del implante de los embriones microinyectados se exploró mediante amplificación por PCR del transgén integrado en muestras de ADN genómico de la forma siguiente. Se digirieron fragmentos de orejas en 20 ml de tampón de oreja (Tris 20 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, SDS al 0,5% y proteinasa K 500 mg/ml) a 55°C durante una noche. Después, la muestra se diluyó con 200 ml de TE y se usaron 2 ml de la muestra de oreja en una reacción de PCR, usando los cebadores apropiados.

A 8 semanas de edad, se sacrificaron animales fundadores transgénicos y animales de control para su necropsia y análisis patológico. Se extirparon porciones de bazo y se aisló el ARN celular total de los bazos usando el Total RNA Extraction Kit (Qiagen) y se determinó la expresión del transgén por RT-PCR. El ARN se recuperó de los bazos y se convirtió en ADNc usando el SuperScript™ Preamplification System (Gibco BRL) de la forma siguiente. Un cebador adecuado, localizado en la secuencia del vector de expresión y 3' al transgén del polipéptido IFN-L, se usó para cebar la síntesis de ADNc a partir de los transcritos del transgén. Diez miligramos de ARN total de bazo de los fundadores transgénicos y de los controles se incubaron con 1 mM de cebador durante 10 minutos a 70°C y se colocaron en hielo. La reacción se suplementó después con Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 10 mM de cada dNTP, DTT 0,1 mM y 200 U de transcriptasa inversa SuperScript II. Después de la incubación durante 50 minutos a 42°C, la reacción se detuvo por calentamiento durante 15 minutos a 72°C y se digirió con 2 U de ARNasa H durante 20 minutos a 37°C. Después, las muestras se amplificaron por PCR usando cebadores específicos para polipéptido IFN-L.

Ejemplo 8

Actividad biológica de polipéptido IFN-L en ratones transgénicos

Antes de la eutanasia, los animales transgénicos se pesaron, se anestesiaron con isoflurano y se extrajo sangre por punción cardíaca. Las muestras se sometieron a análisis hematológico y químico del suero. Se realizó una radiografía después de la exsanguinación a muerte. Tras una disección general, los órganos viscerales principales se sometieron a análisis del peso.

ES 2 300 280 T3

Después de la disección general, se extirparon los tejidos (es decir, hígado, bazo, páncreas, estómago, tracto gastrointestinal completo, riñón, órganos reproductores, piel y glándulas mamarias, hueso, cerebro, corazón, pulmón, timo, tráquea, esófago, tiroides, adrenales, vejiga urinaria, ganglios linfáticos y músculo esquelético) y se fijaron en formalina tamponada con Zn al 10% para su examen histológico. Después de la fijación, los tejidos se procesaron en bloques de parafina y se obtuvieron secciones de 3 mm. Todas las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y después se sometieron al análisis histológico.

El bazo, los ganglios linfáticos y las placas de Peyer de los ratones tanto transgénicos como de control se sometieron a análisis inmunohistológico con anticuerpos específicos de células B y de células T de la forma siguiente. Las secciones embebidas en parafina fijadas con formalina se desparafinaron y se hidrataron en agua desionizada. Las secciones se inactivaron con peróxido de hidrógeno al 3%, se bloquearon con Protein Block (Lipshaw, Pittsburg, PA) y se incubaron en anti-B220 y CD3 de ratón monoclonales de rata (Harlan, Indianapolis, IN). Se detectó la unión de anticuerpos mediante inmunoglobulinas de conejo anti-rata biotiniladas y peroxidasa conjugada con estreptavidina (BioGenex, San Ramón, CA) con DAB como cromógeno (BioTek; Santa Barbara, CA). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina.

Después de la necropsia, se extirparon MLN y secciones de bazo y timo de animales transgénicos y de hermanos de camada de control. Se prepararon suspensiones de una sola célula mediante molienda suave de los tejidos con el extremo romo de una jeringa contra el fondo de un tamiz celular de nailon de 100 mm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Las células se lavaron dos veces, se contaron y aproximadamente 1×10^6 células de cada tejido se incubaron después durante 10 minutos con bloque CD16/32 (Fc γ III/II) Fc 0,5 μ g en un volumen de 20 μ l. Después, las muestras se tiñeron durante 30 minutos a 2-8°C en un volumen de 100 μ l de PBS (sin Ca⁺ ni Mg⁺), albúmina de suero bovino al 0,1% y ázida sódica al 0,01% con 0,5 μ g de anticuerpo de FITC o de anticuerpos monoclonales conjugados con PE contra CD90.2 (Thy-1.2), CD45R (B220), CD11 (Mac-1), Gr-1, CD4 o CD8 (PharMingen, San Diego, CA). Después de la unión a anticuerpos, las células se lavaron y después se analizaron mediante citometría de flujo en un FACSscan (Becton Dickinson).

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende:

(a) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1;

(b) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 4;

(c) la secuencia de nucleótidos de los restos 53 a 628 de la SEC ID N°: 1;

(d) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2;

(e) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a), (c) o (d) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a), (c) o (d); o

(f) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a) - (e),

en la que la secuencia de nucleótidos de (e) - (f) no es la secuencia

```

tttttttt ttttttgac tgtgtgttt ttttgttt atttttttg ctagtaacgt caatgccata atccataagt tgttttttg acaagttgac atttctgcta gctttccac
tgaattttt cttttgctta acataagact tccttgact gtactgcctt gaaccctgac ctgaaaagt ctgcgtccg aagtgtgtag cagcagactc gcaa
tagcct tagaatcaag cgttcttggg gacattgag cagtcacaac ttctatctaa gttctgtctt gaagctggat gattctcaat tcatgttgag tagttgttaa
aatatactga aacatcttct tatttcacc acgacaatct tccaggcaca gaaactgtat ttct;

```

y en la que la secuencia de nucleótidos de (e) a (f) no es la secuencia

```

agattatatt cactcathtt agtgactgtt gttttttt gttttttt ttttctagt aacgtcaatg ccataatcca taagttgttt tttgacaag ttgacatttt tgc
tagcttt tccactgaaa ttttctttt gcttaacata agacttctt tgactgtact gccttgaaac ctgacctga aaagtcttgc gtccgaagtg ttagcagca
tactcgcaat agccttagaa tcaagcgttc ttggggacat ttgagcagtc acaacttcta tctaagtctt tgcttgaagc tggatgattc tcaattcatg ttgag
tactt tgtaaacc.

```

2. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende:

(a) una región de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 que comprende un fragmento de al menos 75 nucleótidos que codifica un polipéptido de 25 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2;

(b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos de (a) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de (a) y en la que la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que, al exponerse a células de mamíferos, provoca un aumento de la fosforilación en tirosina de proteínas celulares; o

(c) una secuencia de nucleótidos complementaria a (a) o (b);

en la que la secuencia de nucleótidos de (a) a (c) no es la secuencia

```

tttttttt ttttttgac tgtgtgttt ttttgttt atttttttg ctagtaacgt caatgccata atccataagt tgttttttg acaagttgac atttctgcta gctttccac
tgaattttt cttttgctta acataagact tccttgact gtactgcctt gaaccctgac ctgaaaagt ctgcgtccg aagtgtgtag cagcagactc gcaa
tagcct tagaatcaag cgttcttggg gacattgag cagtcacaac ttctatctaa gttctgtctt gaagctggat gattctcaat tcatgttgag tagttgttaa
aatatactga aacatcttct tatttcacc acgacaatct tccaggcaca gaaactgtat ttct.

```

3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 (a) - (e) o las reivindicaciones 2 (a) o (b).

4. Una célula hospedadora aislada que comprende el vector de la reivindicación 3.

5. La célula hospedadora de la reivindicación 4, que es una célula eucariota.

6. La célula hospedadora de la reivindicación 4, que es una célula procariota.

7. Un proceso para producir un polipéptido IFN-L que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 4 en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido y, opcionalmente, aislar el polipéptido del cultivo, en el que el vector comprendido por la célula hospedadora no comprende las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 1 (b).

8. Un polipéptido IFN-L producido por el proceso de la reivindicación 7.

ES 2 300 280 T3

9. El proceso de la reivindicación 7, en el que la molécula de ácido nucleico comprende un ADN promotor, distinto del ADN promotor del polipéptido IFN-L nativo, unido operativamente al ADN que codifica el polipéptido IFN-L.

10. Un proceso para determinar si un compuesto inhibe la actividad del polipéptido IFN-L o la producción del polipéptido IFN-L, que comprende exponer a una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 ó 6 al compuesto y medir la actividad del polipéptido IFN-L o la producción del polipéptido IFN-L en dicha célula.

11. Un polipéptido aislado que comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2.

12. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3, comprendiendo además opcionalmente una metionina amino-terminal.

13. Un polipéptido IFN-L aislado codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende:

(a) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1;

(b) la secuencia de nucleótidos de los restos 53 a 628 de la SEC ID N°: 1;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2;

(d) una región de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 que comprende un fragmento de al menos 75 nucleótidos que codifica un polipéptido de 25 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2; o

(e) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a) - (d) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a) - (d);

en la que la secuencia de nucleótidos de (d) - (e) no es la secuencia

ttttttttt ttttttgac tgtgttttt ttttgtttt atttttttg ctagtaacgt caatgccata atccataagt tgttttttg acaagttgac atttctgcta gctttccac
tgaaatttt ctttgccta acataagact tccttgact gtactgect gaaccctgac ctgaaaagt ctgcgtccg aagtgttag cagcagactc gcaa
tagcct tagaatcaag cgttcttggg gacatttgag cagtacacac ttctatctaa gttcttgctt gaagctggat gattctcaat tcatgttgag tagtttgtaa
aatatactga aacatctct tattccacc acgacaatct tcaggcaca gaaactgtat ttct;

y en la que secuencia de nucleótidos de (d) - (e) no es la secuencia

agattatatt cactcatttt agtgactgtt gtttttttt gttttatttt tttgctagt aacgtcaatg ccataatcca taagttgttt tttgacaag ttgacatttt tgc
tagcttt tccactgaaa ttttctttt gcttaacata agacttcctt tgactgtact gccttgaacc ctgacctga aaagtcttgc gtccgaagtg ttagcagca
tactcgcaat agccttagaa tcaagcgttc ttggggacat ttgagcagtc acaacttcta tctaagttct tgcttgaagc tggatgattc tcaattcatg ttgag
tactt tgtaaacc.

14. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un polipéptido constituido por:

(a) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3, comprendiendo además opcionalmente una metionina amino-terminal.

15. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 14, que es un anticuerpo humanizado.

16. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 14, que es un anticuerpo humano o un fragmento del mismo.

17. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 14, que es un anticuerpo policlonal o un fragmento del mismo.

18. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 14, que es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.

19. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 14, que es un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo.

20. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 14, que es un anticuerpo injertado a CDR o un fragmento del mismo.

ES 2 300 280 T3

21. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 14, que es un fragmento de una región variable.

22. El fragmento de la región variable de la reivindicación 21, que es un fragmento Fab o Fab'.

23. Un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende al menos una región determinante de complementariedad con especificidad por un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

24. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 14, que está unido a un marcador detectable.

25. Un hibridoma que produce un anticuerpo que es capaz de unirse a un polipéptido IFN-L codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende:

(a) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1;

(b) la secuencia de nucleótidos de los restos 53 a 628 de la SEC ID N°: 1;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2;

(d) una región de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 que comprende un fragmento de al menos 75 nucleótidos que codifica un polipéptido de 25 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2; o

(e) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a) - (d) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a) - (d);

en la que la secuencia de nucleótidos de (d) - (e) no es la secuencia

```
tttttttt ttttttgac tgtgttttt tttttttt attttttt ctgtaacgt caatgccata atccataagt tgttttttg acaagttgac attctgcta gctttccac  
tgaaatttt cttttgcta acataagact tccttgact gtactgcctt gaacctgac ctgaaaagt ctgctgccg aagtgttag cagcagactc gcaa  
tagcct tagaatcaag cgttctggg gacattgag cagtcacaac ttctatctaa gtcttgctt gaagctggat gattctcaat tcatgttgag tagttgtta  
aatatactga aacatctct tattccacc acgacaatct tccaggcaca gaaactgtat ttct;
```

y en la que secuencia de nucleótidos de (a) - (c) no es la secuencia

```
agattatatt cactcathtt agtgactgtt gttttttt gttttttt tttgctagt aacgtcaatg ccataatcca taagtgttt tttgacaag ttgacattt tgc  
tagcttt tccactgaaa tttttttt gcttaacata agacttcctt tgactgtact gcctgaacc ctgacctga aaagtctgc gtccgaagtg ttagcagca  
tactcgcaat agccttagaa tcaagcgtc ttggggacat ttgagcagtc acaacttcta tctaagttct tgctgaagc tggatgattc tcaattcatg ttgag  
tactt tgtaaacc.
```

26. Un método *in vitro* para detectar o cuantificar la cantidad de polipéptido IFN-L usando el anticuerpo o fragmento anti-IFN-L de la reivindicación 14.

27. Una composición que comprende:

(1) un polipéptido que comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3, comprendiendo además opcionalmente una metionina amino-terminal; y

(2) un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.

28. La composición de la reivindicación 27, en la que el agente de formulación farmacéuticamente aceptable es un vehículo, adyuvante, solubilizante, estabilizante o antioxidante.

29. La composición de la reivindicación 27, en la que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3.

30. Un polipéptido que comprende un derivado de un polipéptido aislado que comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2, o

(b) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3; comprendiendo además opcionalmente una metionina amino-terminal;

ES 2 300 280 T3

en el que el derivado está covalentemente modificado con un polímero soluble en agua seleccionado del grupo constituido por polietilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinilpirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados y alcohol polivinílico.

31. Una composición que comprende:

(1) una molécula de ácido nucleico que comprende:

- (a) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1;
- (b) la secuencia de nucleótidos de los restos 53 a 628 de la SEC ID N°: 1;
- (c) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2;
- (d) una región de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 que comprende un fragmento de al menos 75 nucleótidos que codifica un polipéptido de 25 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2; o
- (e) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a) - (d) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a) - (d);

en la que la secuencia de nucleótidos de (d) - (e) no es la secuencia

```
tttttttt ttttttgac tgtgttttt ttttgttt atttttttg ctagtaacgt caatgccata atccataagt tgttttttg acaagttgac atttctgcta gctttccac  
tgaaatttt cttttgctta acataagact tcctttgact gtactgcctt gaaccctgac cttgaaaagt cttgcgtccg aagtgtgtag cagcagactc gcaa  
tagcct tagaatcaag cgttcttggg gacatttgag cagtcacaac ttctatctaa gttcttgctt gaagctggat gatttcaat tcatgttgag tagtttgtaa  
aatatactga aacatcttct tatttccacc acgacaatct tccaggcaca gaaactgtat ttct;
```

y en la que secuencia de nucleótidos de (d) - (e) no es la secuencia

```
agattatatt cactcatttt agtgactgtt gtttttttt gttttatttt ttttgctagt aacgtcaatg ccataatcca taagtgttt tttgacaag ttgacatttt tgc  
tagcttt tccactgaaa ttttctttt gcttaacata agacttcctt tgactgtact gccttgaacc ctgacctga aaagtcttgc gtccgaagtg ttagcagca  
tactcgcaat agccttagaa tcaagcgctt ttggggacat ttgagcagtc acaacttcta tctaagtctt tgcctgaagc tggatgattc tcaattcatg ttgag  
tactt tgtaaacc; y
```

(2) un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.

32. La composición de la reivindicación 31, en la que dicha molécula de ácido nucleico está contenida en un vector viral.

33. Un vector viral que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende:

- (a) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1;
- (b) la secuencia de nucleótidos de los restos 53 a 628 de la SEC ID N°: 1;
- (c) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2;
- (d) una región de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 que comprende un fragmento de al menos 75 nucleótidos que codifica un polipéptido de 25 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2; o
- (e) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a) - (d) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a) - (d);

en la que la secuencia de nucleótidos de (d) - (e) no es la secuencia

```
tttttttt ttttttgac tgtgttttt ttttgttt atttttttg ctagtaacgt caatgccata atccataagt tgttttttg acaagttgac atttctgcta gctttccac  
tgaaatttt cttttgctta acataagact tcctttgact gtactgcctt gaaccctgac cttgaaaagt cttgcgtccg aagtgtgtag cagcagactc gcaa  
tagcct tagaatcaag cgttcttggg gacatttgag cagtcacaac ttctatctaa gttcttgctt gaagctggat gatttcaat tcatgttgag tagtttgtaa  
aatatactga aacatcttct tatttccacc acgacaatct tccaggcaca gaaactgtat ttct;
```

y en la que secuencia de nucleótidos de (d) - (e) no es la secuencia

```
agattatatt cactcatttt agtgactgtt gtttttttt gttttatttt ttttgctagt aacgtcaatg ccataatcca taagtgttt tttgacaag ttgacatttt tgc  
tagcttt tccactgaaa ttttctttt gcttaacata agacttcctt tgactgtact gccttgaacc ctgacctga aaagtcttgc gtccgaagtg ttagcagca
```

ES 2 300 280 T3

tactcgcaat agccttagaa tcaagcgttc ttggggacat ttgagcagtc acaacttcta tctaagttct tgcttgaagc tggatgattc tcaattcatg ttgag tactt tgtaaacc.

34. Un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido que comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3, comprendiendo además opcionalmente una metionina amino-terminal;

fusionado con una secuencia de aminoácidos heteróloga.

35. El polipéptido de fusión de la reivindicación 34, en el que la secuencia de aminoácidos heteróloga es un dominio constante de IgG o un fragmento del mismo.

36. Un método *in vitro* para diagnosticar una afección patológica o una susceptibilidad a una afección patológica seleccionada de entre cánceres, incluyendo leucemia mielógena crónica, leucemia de células vellosas, sarcoma de Kaposi, melanomas, cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer mamario, cánceres del sistema hematopoyético, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer testicular, enfermedades relacionadas con la disfunción del sistema inmunitario incluyendo esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriática, artritis inflamatoria, artrosis, enfermedad inflamatoria de las articulaciones, enfermedades autoinmunes, lupus, diabetes, enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de trasplantes y enfermedad de injerto contra hospedador; infecciones incluyendo hepatitis, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano y enfermedad granulomatosa crónica; enfermedades relacionadas con trastornos óseos, incluyendo osteoporosis, osteopetrosis, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad periodontal e hipercalcemia; enfermedades relacionadas con proliferación celular anormal, incluyendo arteriosclerosis y reestenosis vascular;

en un sujeto que comprende:

(1) determinar la presencia o la cantidad de expresión de:

(a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2;

(b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3; comprendiendo además opcionalmente una metionina amino-terminal;

(c) un polipéptido IFN-L codificado por la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1;

(d) un polipéptido IFN-L codificado por la secuencia de nucleótidos de los restos 53 a 628 de la SEC ID N°: 1;

(e) una región de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 que comprende un fragmento de al menos 75 nucleótidos que codifica un polipéptido IFN-L de 25 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2; o

(f) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos una identidad del 90% con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a) - (e) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a) - (e);

en una muestra; y

(2) diagnosticar una afección patológica o una susceptibilidad a una afección patológica en base a la presencia o la cantidad de expresión del polipéptido.

37. Un dispositivo que comprende:

(1) una membrana adecuada para implante; y

(2) células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 encapsuladas dentro de dicha membrana, en el que dichas células secretan un polipéptido que comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3; comprendiendo además opcionalmente una metionina amino-terminal; y

dicha membrana es permeable a dicha proteína impermeable a materiales perjudiciales para dichas células.

ES 2 300 280 T3

38. Un método para identificar un compuesto que se une a un polipéptido IFN-L que comprende:

(1) poner en contacto un polipéptido aislado que comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 3, comprendiendo además opcionalmente una metionina amino-terminal;

con un compuesto; y

(2) determinar el grado de unión del polipéptido IFN-L con el compuesto.

39. El método de la reivindicación 38, que comprende además determinar la actividad del polipéptido cuando está unido al compuesto;

40. Uso de una molécula de ácido nucleico que comprende:

(a) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1;

(b) la secuencia de nucleótidos de los restos 53 a 628 de la SEC ID N°: 1;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2;

(d) una región de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 que comprende un fragmento de al menos 75 nucleótidos que codifica un polipéptido de 25 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2; o

(e) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a) - (d) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a) - (d);

en la que la secuencia de nucleótidos de (d) - (e) no es la secuencia

```
tttttttt ttttttgac tgtgttttt tttttttt attttttt ctagtaacgt caatgccata atccataagt tgttttttg acaagttgac atttctgcta gctttccac  
tgaaatttt ctttgccta acataagact tcctttgact gtactgcctt gaacctgac cttgaaaagt ctgcgtccg aagtgtgtag cagcagactc gcaa  
tagcct tagaatcaag cgttctggg gacattgag cagtcacaac ttctatctaa gtcttgctt gaagctggat gatttcaat tcatgttgag tagttgttaa  
aatatactga aacatcttct tatttcacc acgacaatct tccaggcaca gaaactgtat ttct;
```

y en la que secuencia de nucleótidos de (d) - (e) no es la secuencia

```
agattatatt cactcattt agtgactgtt gttttttt gttttttt ttttctagt aacgtcaatg ccataatcca taagttgtt tttgacaag ttgacattt tgc  
tagcttt tccactgaaa ttttcttt gcttaacata agacttcctt tgactgtact gcctgaacc ctgacctga aaagtcttc gtccgaagtg ttagcagca  
tactgcaat agccttagaa tcaagcgtc ttggggacat ttgagcagtc acaacttcta tctaagttct tgctgaagc tggatgattc tcaattcatg ttgag  
tactt tgtaaacc;
```

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección patológica seleccionada entre el cáncer, incluyendo leucemia mielógena crónica, leucemia de células vellosas, sarcoma de Kaposi, melanomas, cáncer de pulmón, cáncer cerebro, cáncer de mama, cánceres del sistema hematopoyético, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer testicular; enfermedades relacionadas con la disfunción del sistema inmunitario incluyendo esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriática, artritis inflamatoria, artrosis, enfermedad inflamatoria de las articulaciones, enfermedades autoinmunes, lupus, diabetes, enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de trasplantes y enfermedad de injerto contra hospedador; infecciones incluyendo hepatitis, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano y enfermedad granulomatosa crónica; enfermedades relacionadas con trastornos óseos, incluyendo osteoporosis, osteopetrosis, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad periodontal e hipercalcemia; enfermedades relacionadas con proliferación celular anormal, incluyendo arteriosclerosis y reestenosis vascular.

41. Un mamífero transgénico no humano que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende:

(a) la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC ID N°: 1;

(b) la secuencia de nucleótidos de los restos 53 a 628 de la SEC ID N°: 1;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2;

(d) una región de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 que comprende un fragmento de al menos 75 nucleótidos que codifica un polipéptido de 25 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2; o

ES 2 300 280 T3

(e) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a) - (d) y que hibrida en condiciones altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a) - (d);

5 en la que la secuencia de nucleótidos de (d) a (e) no es la secuencia

10 tttttttt ttttttgac tgttgTTTT ttttgTTTT atttttttg ctagtaacgt caatgccata atccataagt tgttttttg acaagttgac attctgcta gctttccac
tgaaatttt ctttgctta acataagact tccttgact gtactgcctt gaaccctgac ctgaaaagt ctgcgtccg aagtgttag cagcagactc gcaa
tagcct tagaatcaag cgttctggg gacattgag cagtcacaac ttctatctaa gttcttgctt gaagctggat gattctcaat tcatgttgag tagttgttaa
aatatactga aacatcttct tattccacc acgacaatct tccaggcaca gaaactgtat ttct;

y en la que secuencia de nucleótidos de (d) a (e) no es la secuencia

15 agattatatt cactcatttt agtgactgtt gttttttt gttttttt tttgctagt aacgtcaatg ccataatcca taagtgttt tttgacaag ttgacatttt tgc
tagcttt tccactgaaa ttttctttt gcttaacata agacttcctt tgactgtact gccttgaacc ctgacctga aaagtcttg ctcgaagtg ttagcagca
tactcgcaat agccttagaa tcaagcgttc ttggggacat ttgagcagtc acaacttcta tctaagttct tgcttgaagc tggatgattc tcaattcatg ttgag
tactt tgtaaacc;

20 en el que la que la secuencia de nucleótidos o la región de la secuencia de nucleótidos se introdujo en el mamífero
de una forma que permite la sobreexpresión de la molécula de ácido nucleico.

25 42. Un proceso para determinar si un compuesto inhibe la actividad del polipéptido IFN-L o la producción del
polipéptido IFN-L en un mamífero transgénico no humano de acuerdo con la reivindicación 41, en el que la actividad
del polipéptido IFN-L o la producción del polipéptido IFN-L en dicho mamífero transgénico previamente expuesto a
dicho compuesto se mide *in vitro*.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1A

```

gggtgttgta gatatttttc ctttgggaaga aatactgagc accaaggctg ag atg aca 58
                                     Met Thr
                                     1

ctg aag tat tta tgg ctg gtg gcc ctc gtg gct cta tac att tca ccc 106
Leu Lys Tyr Leu Trp Leu Val Ala Leu Val Ala Leu Tyr Ile Ser Pro
      5              10              15

atc cag tct cag aac tgt gtg tat ctg gat cat acc atc ttg gaa aac 154
Ile Gln Ser Gln Asn Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn
      20              25              30

atg aaa ctt ctg agc agc atc agg acc acc ttt ccc tta aga tgt cta 202
Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu
      35              40              45              50

aaa gat atc acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc 250
Lys Asp Ile Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val
              55              60              65

cag cat gtg aaa aag gac ata aag gca gtc acc tat cat ata tct tct 298
Gln His Val Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser
              70              75              80

ctg gcg cta att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca 346
Leu Ala Leu Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr
      85              90              95

gag gaa cgc ttg gaa cgt atc aga tcg gga ctt ttc aaa caa gtg cag 394
Glu Glu Arg Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln
      100              105              110

caa gct cga gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag 442
Gln Ala Arg Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu
      115              120              125              130

gac agt aca tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac 490
Asp Ser Thr Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr
              135              140              145

ctg gaa ttg aac aag tat ttc ttc aga atc aga aag ttc ctg gta aat 538
Leu Glu Leu Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn
              150              155              160

aag aaa tac agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa ata aga 586
Lys Lys Tyr Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg
              165              170              175

aga tgt ttc agt ata ttt tac aaa cta ctc aac atg aat tgagaatcat 635
Arg Cys Phe Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
      180              185              190

ccagcttcaa gcaagaactt agatagaagt tgtgactgct caaatgtccc caagaacgct 695

```

FIG. 1B

tgattctaag gctattgcga gtctgctgct acacacttcg gacgcaagac ttttcaaggt 755
caggggttcaa ggtagtacag tcaaaggaag tcttatgtta agcaaaagaa aaatttcagt 815
ggaaaagcta gcagaaatgt caacttgtca aaaaaacaac ttatggatta tggcattgac 875
gttactagca aaaaaaataa aacaaaaaaaa aacaaaaa 913

FIG. 2A

```

aagcttaatt taacaaaatt ggaaaaacct aaactatact gtgctctggt gacctagcaa 60
tcaaataatc acagtcattt ggtcaatgtc tatgattaac tcaatgagac aggatgtttg 120
gctatagcac caggtacaaa aaatatattt tcatgaagga tcactccctc ttatgtaata 180
gatttgggtg agtgagttag tgagttagtg catggactca cagcttttgg ctttctgaaa 240
taccctgcat cagtcttggt atgatgattc cttagtgtg ggatggatca tccaggcatt 300
taaggtaaca cgatggtaat tctttgctca tttttcaggg aaaaaaaaaa gttatcactt 360
ccaaagtcgg catagtcacc cgaagtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa cctcagaggc 420
aaaggaaagg ggccgcaacc ttggttaact gtgaaatgac gaatgagaaa actcctcctg 480
ctgaagatat tcaggtatat aaaggcacat gaaggaaaac tcaaaacatc attgtcatat 540
acacatcttc tggatttttt agcttgcaaa aaaa atg agc acc aaa cct gat atg 595
Met Ser Thr Lys Pro Asp Met
1 5

att caa aag tgt ttg tgg ctt gag atc ctt atg ggt ata ttc att gct 643
Ile Gln Lys Cys Leu Trp Leu Glu Ile Leu Met Gly Ile Phe Ile Ala
10 15 20

ggc acc cta tcc ctg gac tgt aac tta ctg aac gtt cac ctg aga aga 691
Gly Thr Leu Ser Leu Asp Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg
25 30 35

gtc acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca ttt 739
Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe
40 45 50 55

cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa gag 787
Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu
60 65 70

ttt ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc ttc 835
Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe
75 80 85

tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc ttc 883
Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe
90 95 100

aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt gat 931
Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp
105 110 115

cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat gaa 979
Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu
120 125 130 135

```

FIG. 2B

```

aat gaa gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca gaa 1027
Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu
          140          145          150

gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc cac 1075
Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His
          155          160          165

agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc tgg 1123
Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp
          170          175          180

gag att gtc cga gtg gaa atc aga aga tgt ttg tat tac ttt tac aaa 1171
Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys
          185          190          195

ttt aca gct cta ttc agg agg aaa taaggatat ttttggaatt aaaattcctt 1225
Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
200          205

ttccctccga aatctctttc tctttctcct cctccatctt ctttttaagg attgttgtgc 1285

tgtcctgtaa gcctgtcctc agttggactg gtagcctcgg aacatcaggg acactcacct 1345

ctctaaggag aggtaatgcc aaccatcctc agggtgacca agagtctcct tagaaagtct 1405

ttaagacatt tttaaaggaa taagattccc tctcgtctt cttctattct ctcttgctct 1465

tttctgtggc cattttgaaa gagctttgct atatatacca cctgtggact tcaccaagac 1525

aatggctaga ggataggag cagagaatgt tgcaaatgg taacatttca atgacttaac 1585

tgttttgctg ccaagggtgc ttatcctatg aaaattcagc acattaaaag agcttatata 1645

tgctccctag agtcaatact cttgcatttt cccctcctg ctcgggggga aaaagggttg 1705

catttctggc ccatttcctt ctgagcttgg tttgtttgaa ttgatgcttg tggaatggta 1765

tttcattact ttaagagtga agatccatag tgaaattgga tggatggttg aattagacga 1825

ccattaagct t 1836

```

FIG. 3

	1				50
huIFN-L	MSTKPDMIQK	CLWLEILMGI	FIAGTSLSDC	NLLNVHLRRV	TWQNLRLHLS
raIFN-L	-----MTLK	YLWLVALVAL	YISPIQSQNC	VYLDHT	ILENMKLLSS
huIFN- β	-----MTNK	CLLQIALLLC	FSTTALSMSY	NLLGFLQRSS	NFQCQKLLWQ
cons	-----MT-K	CLWL-AL---	FI---LS--C	NLL-V-LR--	--QN-KLLSS
	51				100
huIFN-L	MSNSFPVECL	RENIAPQLPQ	EFLOYTQPMK	RDIKKAFYEM	SLQAFNIFS.
raIFN-L	IRTTFPLRCL	KDITDPEFPQ	EILLYVQHVK	KDIKAVTYHI	SSLALIIFSL
huIFN- β	LNGRLEY.CL	KDRMNFDIPE	EIKQLQQFQK	EDAALTIYEM	LQNIFAIFRQ
cons	----FP--CL	KD---FE-PQ	EILQY-Q--K	-DIK---YEM	S--AF-IFS-
	101				150
huIFN-L	QHTFKYWKER	HLKQIQIGLD	QQAAYLNQCL	EEDENENEDM	KEMKENEMKP
raIFN-L	KDSISLATEE	RLERIRSGLF	KQVQQARECM	VDEENKNT.	.EDSTSQHPL
huIFN- β	DSSSTGWNET	IVENLLANVY	HQINHLKTVL	.EEKLEKEDF	TRGK.....
cons	--S---W-E-	-LE-I--GL-	-Q---L--CL	-EEENENED-	-E-K-----
	151				200
huIFN-L	SEARVPQLSS	LELRRYFHRI	DNFLKEKKYS	DCAWIIVRVE	IRRCLYYFYK
raIFN-L	SEGF..KAVY	LELNKYFFRI	RKFLVNKKYS	PCAWKIVVVE	IRRCPSIFYK
huIFN- β	LMSS	LHLKRYYGRI	LHYLKAKEYS	HCAWTIVRVE	ILRNIFYFINR
cons	SE-----SS	LEL-RYF-RI	--FLK-KKYS	-CAW-IVRVE	IRRCFY-FYK
	201				
huIFN-L	FTALFRRK				
raIFN-L	LLNMN---				
huIFN- β	LTGYLRN-				
cons	LT---R--				

FIG. 4

cat	atg	tgt	gta	tat	ctc	gat	cat	act	atc	ttg	gag	aat	atg	aaa	ctt	48
Met	Cys	Val	Tyr	Leu	Asp	His	Thr	Ile	Leu	Glu	Asn	Met	Lys	Leu		
1				5					10					15		
ctg	agc	agc	atc	cgt	acc	acc	ttt	cct	ctg	cgt	tgt	ctg	aaa	gat	atc	96
Leu	Ser	Ser	Ile	Arg	Thr	Thr	Phe	Pro	Leu	Arg	Cys	Leu	Lys	Asp	Ile	
			20					25					30			
acg	gat	ttt	gag	ttt	cct	caa	gag	att	ctg	ctg	tac	gtc	cag	cat	gtg	144
Thr	Asp	Phe	Glu	Phe	Pro	Gln	Glu	Ile	Leu	Leu	Tyr	Val	Gln	His	Val	
		35					40					45				
aaa	aag	gac	ata	aag	gca	gtc	acc	tat	cat	ata	tct	tct	ctg	gcg	cta	192
Lys	Lys	Asp	Ile	Lys	Ala	Val	Thr	Tyr	His	Ile	Ser	Ser	Leu	Ala	Leu	
		50					55					60				
att	att	ttc	agt	ctt	aaa	gac	tcc	atc	tcc	ctg	gcg	aca	gag	gaa	cgc	240
Ile	Ile	Phe	Ser	Leu	Lys	Asp	Ser	Ile	Ser	Leu	Ala	Thr	Glu	Glu	Arg	
	65					70					75					
ttg	gaa	cgt	atc	aga	tcg	gga	ctt	ttc	aaa	caa	gtg	cag	caa	gct	cga	288
Leu	Glu	Arg	Ile	Arg	Ser	Gly	Leu	Phe	Lys	Gln	Val	Gln	Gln	Ala	Arg	
	80					85				90					95	
gag	tgc	atg	gta	gac	gag	gag	aac	aag	aac	acg	gag	gag	gac	agt	aca	336
Glu	Cys	Met	Val	Asp	Glu	Glu	Asn	Lys	Asn	Thr	Glu	Glu	Asp	Ser	Thr	
			100					105					110			
tca	caa	cat	cct	cac	tca	gag	ggc	ttc	aag	gca	gtc	tac	ctg	gaa	ttg	384
Ser	Gln	His	Pro	His	Ser	Glu	Gly	Phe	Lys	Ala	Val	Tyr	Leu	Glu	Leu	
			115				120					125				
aac	aag	tat	ttc	ttc	aga	atc	aga	aag	ttc	ctg	gta	aat	aag	aaa	tac	432
Asn	Lys	Tyr	Phe	Phe	Arg	Ile	Arg	Lys	Phe	Leu	Val	Asn	Lys	Lys	Tyr	
		130					135					140				
agt	ttc	tgt	gcc	tgg	aag	att	gtc	gtg	gtg	gaa	att	cgt	cgt	tgt	ttc	480
Ser	Phe	Cys	Ala	Trp	Lys	Ile	Val	Val	Val	Glu	Ile	Arg	Arg	Cys	Phe	
	145					150					155					
agt	att	ttt	tac	aaa	ctg	ctg	aac	atg	aat	taatggatcc						520
Ser	Ile	Phe	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Met	Asn							
160					165											

FIG. 5

cat atg tgt gta tat ctc gat cat act atc ttg gag aat atg aaa ctt	48
Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu	
1 5 10 15	
ctg agc agc atc cgt acc acc ttt cct ctg cgt tgt ctg aaa gat atc	96
Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile	
20 25 30	
acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc cag cat gtg	144
Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val	
35 40 45	
aaa aag gac atc aag gca gtc acc tat cat atc tct tct ctg gcg ctg	192
Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu	
50 55 60	
att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca gag gaa cgc	240
Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg	
65 70 75	
ttg gaa cgt atc cgt tct ggt ctt ttc aaa caa gtg cag caa gct cgt	288
Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg	
80 85 90 95	
gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag gac agt aca	336
Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr	
100 105 110	
tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac ctg gaa ttg	384
Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu	
115 120 125	
aac aag tat ttc ttc cgt atc cgt aag ttc ctg gta aat aag aaa tac	432
Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr	
130 135 140	
agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa att cgt cgt tct ttc	480
Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Ser Phe	
145 150 155	
agt att ttt tac aaa ctg ctg aac atg aat taatggatcc	520
Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn	
160 165	

FIG. 6

tctagaaagg	aggaataaca	t	atg	tgt	aac	ctg	ctg	aac	gtt	cac	ctg	cgt	51			
			Met	Cys	Asn	Leu	Leu	Asn	Val	His	Leu	Arg				
			1				5					10				
cgt	gtt	acc	tgg	caa	aat	ctg	aga	cat	ctg	agt	agt	atg	agc	aat	tca	99
Arg	Val	Thr	Trp	Gln	Asn	Leu	Arg	His	Leu	Ser	Ser	Met	Ser	Asn	Ser	
				15					20					25		
ttt	cct	gta	gaa	tgt	cta	cga	gaa	aac	ata	gct	ttt	gag	ttg	ccc	caa	147
Phe	Pro	Val	Glu	Cys	Leu	Arg	Glu	Asn	Ile	Ala	Phe	Glu	Leu	Pro	Gln	
			30					35					40			
gag	ttt	ctg	caa	tac	acc	caa	cct	atg	aag	agg	gac	atc	aag	aag	gcc	195
Glu	Phe	Leu	Gln	Tyr	Thr	Gln	Pro	Met	Lys	Arg	Asp	Ile	Lys	Lys	Ala	
		45					50					55				
ttc	tat	gaa	atg	tcc	cta	cag	gcc	ttc	aac	atc	ttc	agc	caa	cac	acc	243
Phe	Tyr	Glu	Met	Ser	Leu	Gln	Ala	Phe	Asn	Ile	Phe	Ser	Gln	His	Thr	
	60					65					70					
ttc	aaa	tat	tgg	aaa	gag	aga	cac	ctc	aaa	caa	atc	caa	ata	gga	ctt	291
Phe	Lys	Tyr	Trp	Lys	Glu	Arg	His	Leu	Lys	Gln	Ile	Gln	Ile	Gly	Leu	
	75				80					85					90	
gat	cag	caa	gca	gag	tac	ctg	aac	caa	tgc	ttg	gag	gaa	gac	gag	aat	339
Asp	Gln	Gln	Ala	Glu	Tyr	Leu	Asn	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Asp	Glu	Asn	
				95					100					105		
gaa	aat	gaa	gac	atg	aaa	gaa	atg	aaa	gag	aat	gag	atg	aaa	ccc	tca	387
Glu	Asn	Glu	Asp	Met	Lys	Glu	Met	Lys	Glu	Asn	Glu	Met	Lys	Pro	Ser	
			110					115					120			
gaa	gcc	agg	gtc	ccc	cag	ctg	agc	agc	ctg	gaa	ctg	agg	aga	tat	ttc	435
Glu	Ala	Arg	Val	Pro	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Glu	Leu	Arg	Arg	Tyr	Phe	
		125					130					135				
cac	agg	ata	gac	aat	ttc	ctg	aaa	gaa	aag	aaa	tac	agt	gac	tgt	gcc	483
His	Arg	Ile	Asp	Asn	Phe	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser	Asp	Cys	Ala	
	140					145					150					
tgg	gag	att	gtc	cga	gtg	gaa	atc	cgt	cgt	tgc	ctg	tac	tac	ttt	tac	531
Trp	Glu	Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Arg	Arg	Cys	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	
	155				160					165					170	
aaa	ttt	acc	gct	ctg	ttc	cgt	cgt	aaa	taatggatcc							568
Lys	Phe	Thr	Ala	Leu	Phe	Arg	Arg	Lys								
				175												

FIG. 7

tctagaaagg aggaataaca t	atg tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt	51
	Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg	
	1 5 10	
cgt gtt acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca	99	
Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser		
	15 20 25	
ttt cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa	147	
Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln		
	30 35 40	
gag ttc ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc	195	
Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala		
	45 50 55	
ttc tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc	243	
Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr		
	60 65 70	
ttc aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt	291	
Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu		
	75 80 85 90	
gat cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat	339	
Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn		
	95 100 105	
gaa aat gaa gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca	387	
Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser		
	110 115 120	
gaa gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc	435	
Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe		
	125 130 135	
cac agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc	483	
His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala		
	140 145 150	
tgg gag att gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tct ctg tac tac ttt tac	531	
Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Ser Leu Tyr Tyr Phe Tyr		
	155 160 165 170	
aaa ttt acc gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc	568	
Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys		
	175	

FIG. 8

cat atg ctg gac tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt cgt gtt acc	48
His Met Leu Asp Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr	
1 5 10 15	
tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca ttt cct gta	96
Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val	
20 25 30	
gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa gag ttt ctg	144
Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu	
35 40 45	
caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc ttc tat gaa	192
Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu	
50 55 60	
atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc ttc aaa tat	240
Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr	
65 70 75 80	
tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt gat cag caa	288
Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln	
85 90 95	
gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat gaa aat gaa	336
Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu	
100 105 110	
gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca gaa gcc agg	384
Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg	
115 120 125	
gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc cac agg ata	432
Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile	
130 135 140	
gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc tgg gag att	480
Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile	
145 150 155 160	
gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tgc ctg tac tac ttt tac aaa ttt acc	528
Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr	
165 170 175	
gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc	556
Ala Leu Phe Arg Arg Lys	
180	

ES 2 300 280 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Welcher, Andrew
 Wen, Duanzhi
 Kelly, Michael
 <120> Moléculas de tipo interferón y usos de las mismas
 <130> 99, 372-A
 <140>
 <141>
 <150> 60/169, 720
 <151> 08-12-1999
 <160> 39
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 913
 <212> ADN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (53)..(625)
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (53)..(115)
 <400> 1

 ggggtgttgta gatatttttc ctttggaaga aatactgagc accaaggctg ag atg aca 58
 Met Thr
 1
 ctg aag tat tta tgg ctg gtg gcc ctc gtg gct cta tac att tca ccc 106
 Leu Lys Tyr 5 Leu Trp Leu Val Ala 10 Leu Val Ala Leu Tyr 15 Ile Ser Pro
 atc cag tct cag aac tgt gtg tat ctg gat cat acc atc ttg gaa aac 154
 Ile Gln Ser 20 Gln Asn Cys 25 Val Tyr Leu Asp His Thr 30 Ile Leu Glu Asn
 atg aaa ctt ctg agc agc atc agg acc acc ttt ccc tta aga tgt cta 202
 Met Lys Leu Leu Ser 35 Ser 40 Ile Arg Thr Thr Phe 45 Pro Leu Arg Cys Leu 50
 aaa gat atc acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc 250
 Lys Asp Ile Thr 55 Phe Glu Phe Pro 60 Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val 65
 cag cat gtg aaa aag gac ata aag gca gtc acc tat cat ata tct tct 298
 Gln His Val 70 Lys Lys Asp Ile Lys Ala 75 Val Thr Tyr His 80 Ile Ser Ser
 ctg gcg cta att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca 346
 Leu Ala Leu 85 Ile Ile Phe Ser 90 Leu Lys Asp Ser 95 Ile Ser Leu Ala Thr

ES 2 300 280 T3

gag gaa cgc ttg gaa cgt atc aga tcg gga ctt ttc aaa caa gtg cag 394
 Glu Glu Arg Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln
 100 105 110
 5
 caa gct cga gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag 442
 Gln Ala Arg Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu
 115 120 125 130
 10
 gac agt aca tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac 490
 Asp Ser Thr Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr
 135 140 145
 15
 ctg gaa ttg aac aag tat ttc ttc aga atc aga aag ttc ctg gta aat 538
 Leu Glu Leu Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn
 150 155 160
 20
 aag aaa tac agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa ata aga 586
 Lys Lys Tyr Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg
 165 170 175
 25
 aga tgt ttc agt ata ttt tac aaa cta ctc aac atg aat tgagaatcat 635
 Arg Cys Phe Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
 180 185 190
 ccagcttcaa gcaagaactt agatagaagt tgtgactgct caaatgtccc caagaacgct 695
 30
 tgattctaag gctattgcga gtctgctgct acacacttcg gacgcaagac ttttcaaggt 755
 caggggttcaa ggtagtacag tcaaaggaag tcttatgtta agcaaaagaa aaatttcagt 815
 ggaaaagcta gcagaaatgt caacttgtca aaaaaacaac ttatggatta tggcattgac 875
 35
 gttactagca aaaaaaataa aacaaaaaaa aacaaaaa 913

40 <210> 2
 <211> 191
 <212> PRT
 45 <213> *Rattus norvegicus*

50

55

60

65

ES 2 300 280 T3

<400> 2

5 Met Thr Leu Lys Tyr Leu Trp Leu Val Ala Leu Val Ala Leu Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Pro Ile Gln Ser Gln Asn Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu
20 25 30

10 Glu Asn Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg
35 40 45

15 Cys Leu Lys Asp Ile Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu
50 55 60

Tyr Val Gln His Val Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile
65 70 75 80

20 Ser Ser Leu Ala Leu Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu
85 90 95

25 Ala Thr Glu Glu Arg Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln
100 105 110

Val Gln Gln Ala Arg Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr
115 120 125

30 Glu Glu Asp Ser Thr Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala
130 135 140

35 Val Tyr Leu Glu Leu Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu
145 150 155 160

Val Asn Lys Lys Tyr Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu
165 170 175

40 Ile Arg Arg Cys Phe Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
180 185 190

45 <210> 3

<211> 168

<212> PRT

50 <213> *Rattus norvegicus*

55

60

65

ES 2 300 280 T3

<400> 3

5	Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu Leu Ser	1 5 10 15
	Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile Thr Asp	20 25 30
10	Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val Lys Lys	35 40 45
	Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu Ile Ile	50 55 60
15	Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg Leu Glu	65 70 75 80
20	Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg Glu Cys	85 90 95
	Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr Ser Gln	100 105 110
25	His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu Asn Lys	115 120 125
30	Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr Ser Phe	130 135 140
	Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Cys Phe Ser Ile	145 150 155 160
35	Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn	165

40 <210> 4
 <211> 1836
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>
 <221> CDS
 <222> (575)..(1195)

50 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (575)..(655)

55

60

65

ES 2 300 280 T3

<400> 4

5 aagcttaatt taacaaaatt ggaaaaacct aaactatact gtgctctggt gacctagcaa 60
tcaataatc acagtcattt ggtcaatgtc tatgattaac tcaatgagac aggatgtttg 120
10 gctatagcac caggtacaaa aaatatattt tcatgaagga tcactccctc ttatgtaata 180
gatttgggtg agtgagtgtg tgagtgtgtg catggactca cagcttttgg ctttctgaaa 240
taccctgcat cagtcttggt atgatgattc cttagtgtg ggatggatca tccaggcatt 300
15 taaggtaaca cgatggtaat tctttgctca tttttcaggg aaaaaaaaaa gttatcactt 360
ccaaagtcgg catagtcacc cgaagtataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa cctcagaggc 420
20 aaaggaaagg ggccgcaacc ttggttaact gtgaatgac gaatgagaaa actcctcctg 480
ctgaagatat tcagggtatat aaaggcacat gaaggaaaac tcaaacatc attgtcatat 540
acacatcttc tggatttttt agcttgcaaa aaaa atg agc acc aaa cct gat atg 595
Met Ser Thr Lys Pro Asp Met
25 1 5
att caa aag tgt ttg tgg ctt gag atc ctt atg ggt ata ttc att gct 643
Ile Gln Lys Cys Leu Trp Leu Glu Ile Leu Met Gly Ile Phe Ile Ala
30 10 15 20
ggc acc cta tcc ctg gac tgt aac tta ctg aac gtt cac ctg aga aga 691
Gly Thr Leu Ser Leu Asp Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg
35 25 30 35
gtc acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca ttt 739
Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe
40 40 45 50 55
cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa gag 787
Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu
60 65 70
ttt ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc ttc 835
Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe
45 75 80 85
tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc ttc 883
Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe
50 90 95 100
aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt gat 931
Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp
55 105 110 115

ES 2 300 280 T3

[illegible]

<210> 5

<211> 207

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 300 280 T3

<400> 5

5 Met Ser Thr Lys Pro Asp Met Ile Gln Lys Cys Leu Trp Leu Glu Ile
1 5 10 15

Leu Met Gly Ile Phe Ile Ala Gly Thr Leu Ser Leu Asp Cys Asn Leu
20 25 30

10 Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu
35 40 45

15 Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile
50 55 60

Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys
65 70 75 80

20 Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn
85 90 95

25 Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys
100 105 110

Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys
115 120 125

30 Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu
130 135 140

35 Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu
145 150 155 160

Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys
165 170 175

40 Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg
180 185 190

45 Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
195 200 205

<210> 6

<211> 178

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 300 280 T3

<400> 6

5 Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu
 1 5 10 15

 Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg
 20 25 30

10 Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln
 35 40 45

 Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln
 50 55 60

 Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg
 65 70 75 80

20 His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu
 85 90 95

 Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu
 100 105 110

 Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu
 115 120 125

30 Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile Asp Asn Phe Leu
 130 135 140

 Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val Glu
 145 150 155 160

35 Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg
 165 170 175

40 Arg Lys

<210> 7

<211> 187

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

55

60

65

ES 2 300 280 T3

<400> 7

5 Met Thr Asn Lys Cys Ile Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys His Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
20 25 30

10 Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
35 40 45

15 Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
50 55 60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
65 70 75 80

20 Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
85 90 95

25 Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
100 105 110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
115 120 125

30 Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
130 135 140

35 Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
145 150 155 160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
165 170 175

40 Phe Ile Asn Lys Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
180 185

<210> 8

<211> 520

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Inserto de ADNc del polipéptido de tipo IFN de rata y secuencia parcial del vector pAMG21

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(510)

ES 2 300 280 T3

<400> 8

5	cat atg tgt gta tat ctc gat cat act atc ttg gag aat atg aaa ctt	48
	Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu	
	1 5 10 15	
10	ctg agc agc atc cgt acc acc ttt cct ctg cgt tgt ctg aaa gat atc	96
	Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile	
	20 25 30	
15	acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc cag cat gtg	144
	Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val	
	35 40 45	
20	aaa aag gac ata aag gca gtc acc tat cat ata tct tct ctg gcg cta	192
	Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu	
	50 55 60	
25	att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca gag gaa cgc	240
	Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg	
	65 70 75	
30	ttg gaa cgt atc aga tgg gga ctt ttc aaa caa gtg cag caa gct cga	288
	Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg	
	80 85 90 95	
35	gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag gac agt aca	336
	Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr	
	100 105 110	
40	tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac ctg gaa ttg	384
	Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu	
	115 120 125	
45	aac aag tat ttc ttc aga atc aga aag ttc ctg gta aat aag aaa tac	432
	Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr	
	130 135 140	
50	agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa att cgt cgt tgt ttc	480
	Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Cys Phe	
	145 150 155	
55	agt att ttt tac aaa ctg ctg aac atg aat taatggatcc	520
	Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn	
	160 165	

<210> 9

<211> 169

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Inserto de ADNc del polipéptido de tipo IFN de rata y secuencia parcial del vector pAMG21

ES 2 300 280 T3

<400> 9

```

5      Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu Leu
      1          5          10          15

      Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile Thr
      20          25          30

10     Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val Lys
      35          40          45

      Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu Ile
      50          55          60

      Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg Leu
      65          70          75          80

20     Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg Glu
      85          90          95

      Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr Ser
      100         105         110

      Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu Asn
      115         120         125

30     Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr Ser
      130         135         140

      Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Cys Phe Ser
      145         150         155         160

35     Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
      165

```

40 <210> 10

<211> 520

<212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Inserto de ADNc del polipéptido de tipo IFN de rata y secuencia parcial del vector pAMG21

50

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(510)

55

60

65

ES 2 300 280 T3

<400> 10

5	cat atg tgt gta tat ctc gat cat act atc ttg gag aat atg aaa ctt	48
	Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu	
	1 5 10 15	
10	ctg agc agc atc cgt acc acc ttt cct ctg cgt tgt ctg aaa gat atc	96
	Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile	
	20 25 30	
15	acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc cag cat gtg	144
	Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val	
	35 40 45	
20	aaa aag gac atc aag gca gtc acc tat cat atc tct tct ctg gcg ctg	192
	Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu	
	50 55 60	
25	att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca gag gaa cgc	240
	Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg	
	65 70 75	
30	ttg gaa cgt atc cgt tct ggt ctt ttc aaa caa gtg cag caa gct cgt	288
	Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg	
	80 85 90 95	
35	gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag gac agt aca	336
	Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr	
	100 105 110	
40	tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac ctg gaa ttg	384
	Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu	
	115 120 125	
45	aac aag tat ttc ttc cgt atc cgt aag ttc ctg gta aat aag aaa tac	432
	Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr	
	130 135 140	
50	agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa att cgt cgt tct ttc	480
	Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Ser Phe	
	145 150 155	
55	agt att ttt tac aaa ctg ctg aac atg aat taatggatcc	520
	Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn	
	160 165	

<210> 11

<211> 169

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Inserto de ADNc del polipéptido de tipo IFN de rata y secuencia parcial del vector pAMG21

ES 2 300 280 T3

<400> 11

5 Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu Leu
1 5 10 15

Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile Thr
20 25 30

10 Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val Lys
35 40 45

15 Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu Ile
50 55 60
Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg Leu
65 70 75 80

20 Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg Glu
85 90 95

Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr Ser
100 105 110

25 Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu Asn
115 120 125

30 Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr Ser
130 135 140

Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Ser Phe Ser
145 150 155 160

35 Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
165

40 <210> 12

<211> 568

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Inserto de ADNc del polipéptido de tipo IFN humano y secuencia parcial del vector pAMG21

50

55

60

65

ES 2 300 280 T3

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(558)

5

<400> 12

10	tctagaaagg aggaataaca t atg tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt	51
	Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg	
	1 5 10	
15	cgt gtt acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca	99
	Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser	
	15 20 25	
20	ttt cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa	147
	Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln	
	30 35 40	
25	gag ttt ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc	195
	Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala	
	45 50 55	
30	ttc tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc	243
	Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr	
	60 65 70	
35	ttc aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt	291
	Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu	
	75 80 85 90	
40	gat cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat	339
	Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn	
	95 100 105	
45	gaa aat gaa gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca	387
	Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser	
	110 115 120	
50	gaa gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc	435
	Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe	
	125 130 135	
55	cac agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc	483
	His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala	
	140 145 150	
60	tgg gag att gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tgc ctg tac tac ttt tac	531
	Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr	
	155 160 165 170	
65	aaa ttt acc gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc	568
	Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys	
	175	

<210> 13

60

<211> 179

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Inserto de ADNc del polipéptido de tipo IFN de rata y secuencia parcial del vector pAMG21

ES 2 300 280 T3

<400> 13

5	Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr Trp Gln Asn	1 5 10 15
	Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val Glu Cys Leu	20 25 30
10	Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu Gln Tyr Thr	35 40 45
	Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu Met Ser Leu	50 55 60
15	Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr Trp Lys Glu	65 70 75 80
20	Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln Ala Glu Tyr	85 90 95
	Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu Asp Met Lys	100 105 110
25	Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg Val Pro Gln	115 120 125
	Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile Asp Asn Phe	130 135 140
30	Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val	145 150 155 160
35	Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Phe	165 170 175
	Arg Arg Lys	

40

<210> 14

<211> 568

<212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: Inserto de ADNc del polipéptido de tipo IFN humano y secuencia parcial del vector pAMG21

<220>

<221> CDS

55 <222> (22)..(558)

60

65

ES 2 300 280 T3

<400> 14

5	tctagaaagg aggaataaca t atg tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt	51
	Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg	
	1 5 10	
10	cgt gtt acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca	99
	Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser	
	15 20 25	
15	ttt cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa	147
	Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln	
	30 35 40	
20	gag ttc ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc	195
	Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala	
	45 50 55	
25	ttc tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc	243
	Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr	
	60 65 70	
30	ttc aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt	291
	Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu	
	75 80 85 90	
35	gat cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat	339
	Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn	
	95 100 105	
40	gaa aat gaa gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca	387
	Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser	
	110 115 120	
45	gaa gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc	435
50	Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe	
	125 130 135	
55	cac agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc	483
	His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala	
	140 145 150	
60	tgg gag att gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tct ctg tac tac ttt tac	531
	Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Ser Leu Tyr Tyr Phe Tyr	
	155 160 165 170	
65	aaa ttt acc gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc	568
	Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys	
	175	

<210> 15

<211> 179

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Inserto de ADNc del polipéptido de tipo IFN humano y secuencia parcial del vector pAMG21

ES 2 300 280 T3

<400> 15

5 Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr Trp Gln Asn
 1 5 10 15

 Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val Glu Cys Leu
 20 25 30

10 Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu Gln Tyr Thr
 35 40 45

 Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu Met Ser Leu
 50 55 60

 Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr Trp Lys Glu
 65 70 75 80

20 Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln Ala Glu Tyr
 85 90 95

 Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu Asp Met Lys
 100 105 110

 Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg Val Pro Gln
 115 120 125

30 Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile Asp Asn Phe
 130 135 140

 Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val
 145 150 155 160

35 Glu Ile Arg Arg Ser Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Phe
 165 170 175

40 Arg Arg Lys

<210> 16

<211> 556

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: Inserto de ADNc del polipéptido de tipo IFN humano y secuencia parcial del vector pAMG21

<220>

55 <221> CDS

<222> (1)..(546)

60

65

ES 2 300 280 T3

<400> 16

5	cat atg ctg gac tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt cgt gtt acc	46
	His Met Leu Asp Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr	
	1 5 10 15	
10	tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca ttt cct gta	96
	Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val	
	20 25 30	
15	gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa gag ttt ctg	144
	Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu	
	35 40 45	
20	caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc ttc tat gaa	192
	Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu	
	50 55 60	
25	atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc ttc aaa tat	240
	Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr	
	65 70 75 80	
30	tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt gat cag caa	288
	Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln	
	85 90 95	
35	gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat gaa aat gaa	336
	Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu	
	100 105 110	
40	gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca gaa gcc agg	384
	Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg	
	115 120 125	
45	gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc cac agg ata	432
	Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile	
	130 135 140	
50	gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc tgg gag att	480
	Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile	
	145 150 155 160	
55	gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tgc ctg tac tac ttt tac aaa ttt acc	528
	Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr	
	165 170 175	
60	gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc	556
	Ala Leu Phe Arg Arg Lys	
	180	

<210> 17

<211> 182

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Inserto de ADNc del polipéptido de tipo IFN humano y secuencia parcial del vector pAMG21

ES 2 300 280 T3

<400> 17

	His	Met	Leu	Asp	Cys	Asn	Leu	Leu	Asn	Val	His	Leu	Arg	Arg	Val	Thr
	1				5					10					15	
5	Trp	Gln	Asn	Leu	Arg	His	Leu	Ser	Ser	Met	Ser	Asn	Ser	Phe	Pro	Val
			20					25					30			
10	Glu	Cys	Leu-Arg	Glu	Asn	Ile	Ala	Phe	Glu	Leu	Pro	Gln	Glu	Phe	Leu	
		35					40					45				
	Gln	Tyr	Thr	Gln	Pro	Met	Lys	Arg	Asp	Ile	Lys	Lys	Ala	Phe	Tyr	Glu
	50						55					60				
15	Met	Ser	Leu	Gln	Ala	Phe	Asn	Ile	Phe	Ser	Gln	His	Thr	Phe	Lys	Tyr
	65				70					75						80
	Trp	Lys	Glu	Arg	His	Leu	Lys	Gln	Ile	Gln	Ile	Gly	Leu	Asp	Gln	Gln
20					85				90						95	
	Ala	Glu	Tyr	Leu	Asn	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Asp	Glu	Asn	Glu	Asn	Glu
				100					105					110		
25	Asp	Met	Lys	Glu	Met	Lys	Glu	Asn	Glu	Met	Lys	Pro	Ser	Glu	Ala	Arg
		115						120					125			
	Val	Pro	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Glu	Leu	Arg	Arg	Tyr	Phe	His	Arg	Ile
30		130					135					140				
	Asp	Asn	Phe	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser	Asp	Cys	Ala	Trp	Glu	Ile
	145				150					155						160
35	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Arg	Arg	Cys	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	Lys	Phe	Thr
				165					170						175	
	Ala	Leu	Phe	Arg	Arg	Lys										
				180												

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

45 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 18

	Tyr	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg
50											16
	1				5						10

55 <210> 19

<211> 15

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Internalización del dominio obtenido de la proteína tat del VIH

65

ES 2 300 280 T3

	<400> 19	
	Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg	
5	1 5 10 15	
	<210> 20	
	<211> 21	
10	<212> ADN	
	<231> <i>Rattus norvegicus</i>	
	<400> 20	
15	atgacactga agtatttatg g	21
	<210> 21	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<231> <i>Rattus norvegicus</i>	
25	<400> 21	
	attcatgttg agtagtttgt a	21
30	<210> 22	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<231> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1825-22	
40	<400> 22	
	gaataacata tgtgtgtata tctcgatcat actatcttgg agaataatg	48
45	<210> 23	
	<211> 63	
	<212> ADN	
	<231> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1825-21	
55	<400> 23	
	ccgcggatcc attaattcat gttcagcagt ttgtaaaaaa tactgaaaca acgacgaatt	60
	tcc	63
60	<210> 24	
	<211> 63	
	<212> ADN	
65	<231> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 300 280 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1909-56

<400> 24

5 **ccgcgggatcc attaatteat gttcagcagt ttgtaaaaaa tactgaaaga acgacgaatt 60**
 tcc **63**

10 <210> 25

 <211> 67

 <212> ADN

15 <231> Secuencia artificial

 <220>

 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1967-32

20 <400> 25

ttgatctaga aaggaggaat aacatatgtg taacctgctg aacgttcacc tgcgtcgtgt 60

25 **tacctgg** **67**

 <210> 26

 <211> 71

 <212> ADN

30 <231> Secuencia artificial

 <220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1982-14

 <400> 26

ccgcgggatcc attattttacg acggaacaga gcggtaaatt tgtaaaagta gtacaggcaa 60

40 **cgacgatttc c** **71**

 <210> 27

45 <211> 72

 <212> ADN

 <231> Secuencia artificial

50 <220>

 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1967-33

 <400> 27

55 **ccgcgggatec attattttacg acggaacaga gcggtaaatt tgtaaaagta gtacagagaa 60**
 cgacggattt cc **72**

60 <210> 28

 <211> 39

 <212> ADN

65 <231> Secuencia artificial

 <220>

ES 2 300 280 T3

	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 2103-87	
	<400> 28	
5	aaggagcata tgctggactg taacctgctg aacgttcac	39
	<210> 29	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<231> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1200-54	
	<400> 29	
20	gttattgcatc agcggtggca	20
	<210> 30	
25	<211> 32	
	<212> ADN	
	<231> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1847-77	
	<400> 30	
35	cccaagctta ccatgacact gaagtattta tg	32
	<210> 31	
40	<211> 33	
	<212> ADN	
	<231> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1847-78	
	<400> 31	
50	aaggaaaaa gcggccgcat tcattgtgag tag	33
	<210> 32	
55	<211> 35	
	<212> ADN	
	<231> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1896-56	
	<400> 32	
65	acgcgtcgac tcaccaattc atgttgagta gtttg	35

ES 2 300 280 T3

	<210> 33	
	<211> 39	
	<212> ADN	
5	<231> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1896-57	
10	<400> 33	
	aaggaaaaaa gcggccgctc atcaattcat gttgagtag	39
15	<210> 34	
	<211> 31	
	<212> ADN	
20	<231> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1954-45	
25	<400> 34	
	acgcgtcgac ttattatttc ctctgaata g	31
30	<210> 35	
	<211> 42	
	<212> ADN	
35	<231> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1954-46	
40	<400> 35	
	aaggaaaaaa gcggccgctt attatttcct cctgaataga gc	42
45	<210> 36	
	<211> 33	
	<212> ADN	
50	<231> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1955-44	
55	<400> 36	
	cccaagctta ccatgagcac caaacctgat atg	33
60	<210> 37	
	<211> 34	
	<212> ADN	
65	<231> Secuencia artificial	

ES 2 300 280 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1954-47

5 <400> 37

cccaagctta ccatgattca aaagtgttg tggc

34

10 <210> 38

<211> 53

<212> ADN

<231> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1954-48

20 <400> 38

aaggaaaaaa gcgccgcgc gccctcgat ttctctctg aatagagctg taa

53

25 <210> 39

<211> 41

<212> ADN

<231> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR 1954-49

35 <400> 39

aaggaaaaaa gcggccgctt tcctctgaa tagagctgta a

41

40

45

50

55

60

65