



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 0716948-5 A2**

(22) Data de Depósito: 22/06/2007
(43) Data da Publicação: 19/02/2013
(RPI 2198)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/20
A61K 38/21
A61P 31/12
A61P 35/00
A61P 37/02
C07K 14/555
C07K 19/00

(54) **Título:** POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA, PROTEÍNA, CONSTRUTO DE PROTEÍNA, USO DA PROTEÍNA, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER, PARA TRATAR UMA DOENÇA VIRAL, PARA UMA CONDIÇÃO RESPONSIVA A TERAPIA COM INTERFERON, E, COMPOSIÇÃO

(30) **Prioridade Unionista:** 18/06/2007 US 11/764786

(73) **Titular(es):** Novagen Holding Corporation

(72) **Inventor(es):** Chunsheng Mao, Haitao Wang, Jing Xu, Jizhi Li, Ling Wang, Longbin Liu, Rui Zhang, Yong Du

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & Cia.

(86) **Pedido Internacional:** PCT CA2007001123 de 22/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/154719de 24/12/2008

(57) **Resumo:** POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA, PROTEÍNA, CONSTRUTO DE PROTEÍNA, USO DA PROTEÍNA, MÉTODOS PARA TRATAR CÂNCER, PARA TRATAR UMA DOENÇA VIRAL, PARA TRATAR UMA CONDIÇÃO RESPONSIVA A TERAPIA COM INTERFERON, E, COMPOSIÇÃO. Este pedido se refere a proteínas tipo-interferon humano recombinantes. Em uma modalidade uma proteína recombinante criada pela tecnologia de embaralhamento de gene é descrita tendo atividades anti-virais e anti-proliferativas aumentadas em comparação com o interferon alfa 2b humano (HuIFNa2b). A invenção abrange um polinucleotídeo que codifica a proteína e vetores recombinantes e células hospedeiras que compreendem o polinucleotídeo. Preferivelmente o polinucleotídeo é selecionado do grupo de polinucleotídeos tendo, cada, uma sequência pelo menos 93% idêntica a SEQ ID No: 1 e a proteína selecionada do grupo de proteínas tendo, cada, uma sequência de aminoácido pelo menos 85% idêntica à SEQ ID No: 2. As proteínas e as composições que compreendem as proteínas podem ser usadas para tratamento de condições que respondem à terapia com r tais como doenças virais e câncer.

A
SEQ ID NO:1
TGTAACTGTCTCAAAACCCACAGCCTGGGTAGCAAGAGGACCTTGATGCTCTGGCGCAGATGGGGAATC
TCCCTTTTCTCCTGCTGAAGGAGACATGACTTTGAATTTCCCAAGAGGAATTTGATGGCAACCACTTC
CAGAAGGCTCAGGCACTCTGTCTCCATGAGCTGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTACGACAAAGGAA
TCATCTGCTCTCTGGAGTGGGGCTCTCAGCAAAATTCGCAACCACTCTTACGGGCACTAAATGACTTG
GAGGCTGTATGATCAGGAGGTTGGGGTGGAGGACTCCCTGATGATGCGGACTCCATCTGGCTGTG
AAGAATATCTCCAAAGATCACTCTTTATCTGATGGAGAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGTC
AGATGAGAAATCTGATGATCCCTCTCTTTTCAACAACTTGCAGAAAGATTAGGGGGAAGAT

B
SEQ ID NO:2
CNLSQTHSLGSRFTLMLAGMKISLFSCLKDRHDFEPQREFDQKQKA
QAIISVLHLLIQTFMFLPSTREBAAMDOLDKVFTHLVQLDLEACHQG
EVIVRETFPMAGSILAVKCTPQRTIYLAKKYGPCMEVVRVETHELS
FSTNLQKRLGKD

C

DNA	1	TGTAATCTGTCTCAAAACCCACAGCCTGGGTAGCAAGAGGACCTTGATGCTC
Proteína	1	C N L S Q T H S L G S K R T L M L
DNA	52	CTGGCGCAGATGGGGAATCTCCCTTTTCTCCTGCTGAAGGAGACAT
Proteína	18	L A Q M G K I S L F S C L K D R H
DNA	103	GACTTTGAATTTCCCAAGAGGAATTTGATGCAACAGCTTCAGAAGCT
Proteína	35	D F E F P Q E E F D Q N Q F Q K A
DNA	154	CAGGCACTCTGTCTCCATGAGCTGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTC
Proteína	52	Q A I S V L H E L I Q Q T F N L F
DNA	205	AGCACAAGGAATCATCTGCTGCTGGGATGAGGGCTCTAGACAAATC
Proteína	69	S T K E S S A A W D E G L L D K P
DNA	256	CGCACCGAAGCTTACCGGACGCTAAATGACTTGGAGGCTGTATATGACG
Proteína	86	R T E L Y R Q L N D L E A C M M Q
DNA	307	GAGGTGGGGTGGAGGAGCTCCCTGATGATGCGGACTCATCTGCTG
Proteína	103	E V G V E E T P L M N A D S I L A
DNA	358	GTGAAGAAATCTTCAAGAAATCACTCTTTATCTGATGGAGAGAAATAC
Proteína	120	V K K Y F Q R I T L Y L M E K K Y
DNA	409	AGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGTCAAGATAGAAATCATGATCCCTCTCT
Proteína	137	S P C A W E V V R V E I H R S L S
DNA	460	TTTTCACCAACTTCAAAAAGATTAGGGGGAAGAT
Proteína	154	F S T N L Q K R L R G K D

“POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA, PROTEÍNA, CONSTRUTO DE PROTEÍNA, USO DA PROTEÍNA, MÉTODOS PARA TRATAR CÂNCER, PARA TRATAR UMA DOENÇA VIRAL, PARA TRATAR UMA CONDIÇÃO RESPONSIVA A TERAPIA COM INTERFERON, E, COMPOSIÇÃO”

Campo da Invenção

Esse pedido se refere a proteínas recombinantes tendo atividades biológicas tipo-interferon humano.

Antecedentes

Nesse pedido a nomenclatura de interferon (IFN) publicada na *Nature* (1) foi adotada.

Interferons humanos (HuIFNs), os quais foram descobertos por Isaacs e Lindenmann em 1957 (2), são de uma família bem conhecida de citocinas secretadas por uma grande variedade de células eucarióticas após a exposição a vários estímulos, tais como infecção viral ou exposição a mitógenos. IFNs podem eliciar muitas alterações no comportamento celular, incluindo efeitos sobre o crescimento e diferenciação celulares e modulação do sistema imune (3-7). HuIFNs foram classificados em seis subgrupos, denominados IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , IFN- ε e IFN- κ . HuIFN- α (interferon derivado de leucócito) é produzido nas células leucocitárias humanas e, junto com pequenas quantidades de HuIFN- β (interferon derivado de fibroblasto), em células linfoblastóides. HuIFNs foram classificados ainda por suas características químicas e biológicas em duas categorias gerais, denominadas Tipo I e Tipo II. O Tipo I consiste nos subgrupos IFN- α e IFN- β assim como os subgrupos recentemente descobertos IFN- ω , IFN- ε e IFN- κ . O Tipo II tem apenas um membro: IFN- γ (interferon imune).

Os diferentes subgrupos de interferon têm características estruturais e biológicas diferentes. HuIFN- β é uma glicoproteína N-ligada (8,9) que foi purificada até homogeneidade e caracterizada. Ele é heterogêneo

em relação ao tamanho, presumivelmente devido a sua porção de carboidrato. Entretanto, há apenas um gene humano de IFN- β , o qual codifica uma proteína de 166 aminoácidos. IFN- β tem pouca homologia com IFN- α , partilhando cerca de 30 a 40% de identidade.

5 Ao contrário da singeleza do gene de IFN- β , HuIFN- α é um subgrupo que consiste em uma família multigene com essencialmente 14 genes. Variantes menores feitas de uma ou duas diferenças de aminoácidos são responsáveis pelos múltiplos alelos (10). Excluindo o pseudogene IFNAP22, existem 13 genes que codificam 13 proteínas. Cada proteína
10 compreende 165 a 166 aminoácidos. A proteína codificada pelo gene IFNA13 é idêntica à proteína IFNA1. Assim, há 12 proteínas de interferon alfa individuais: IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA14, IFNA 16, IFNA17 e IFNA21. A identidade de sequência de aminoácidos entre os subtipos de IFN- α tem geralmente 80 a 85% de
15 homologia (11).

IFN- ω maduro mostra 60% de homologia de sequência de nucleotídeos com a família da espécie IFN- α , mas é mais longo em 6 aminoácidos na sua porção C-terminal. IFN- ω é mais remotamente relacionado ao interferon- β (partilha cerca de 30% de homologia de
20 sequência). IFN- ω humano não é classificado no grupo de IFN- α por que ele é antigenicamente distinto de IFN- α e difere em sua interação com o receptor de IFN- α Tipo I (12). IFN- ω é secretado por leucócitos infectados por vírus como um componente principal de interferons de leucócitos humanos.

A proteína madura de IFN- ϵ humano contém 185 aminoácidos,
25 partilhando cerca de 33% e 37% de homologia de sequência com IFN- α 2 e IFN- β , respectivamente (13, 14). A função e as propriedades biofísicas de IFN- ϵ não foram caracterizadas significativamente em detalhes; entretanto, ele funciona como interferons de Tipo I. IFN- ϵ também pode desempenhar um papel na função reprodutora (15).

IFN- κ , uma citocina humana com 180 aminoácidos, é um interferon de Tipo I recentemente identificado. A sequência codificante de IFN- κ é ~30% idêntica a de outros interferons de Tipo I encontrados em humanos. Uma característica distintiva de IFN- κ é a expressão constitutiva detectável de seu transcrito em células não induzidas, particularmente queratinócitos. IFN- κ pode desempenhar um papel na regulação de funções imunes sistêmicas ou locais através de seu efeito sobre as células do sistema imune inato (16). Entretanto, IFN- κ exibe baixa atividade antiviral (17).

Interferon do Tipo I humano parece se ligar a duas subunidades de receptor, IFNAR-1 e -2, que estão amplamente distribuídas sobre a superfície celular de vários tipos de célula. O envolvimento do ligante leva à indução da fosforilação de tirosinas quinases TYK2 e JAK-1, que são acopladas a IFNAR-1 e -2, respectivamente. Uma vez fosforiladas, as proteínas STAT são liberadas do receptor e formam homodímeros assim como heterodímeros (18, 19). Uma vez liberados, os dímeros de STATA se associam com o Fator 9 responsivo a interferon (IRF-9), uma proteína ligante de DNA, formando um complexo chamado de fator gênico 3 estimulado por interferon (ISGF-3), que migra para o núcleo. A seguir, o complexo ISGF-3 se liga a um elemento de DNA que existe à montante de todos os genes induzíveis de IFN. Essa é a assim chamada via de transdução de sinal “clássica”.

Novos modos de ação e vias bioquímicas reguladas por IFNs do Tipo I estão sendo continuamente descobertas. Por exemplo, à jusante de PI3K na via de transdução de sinal, o fator nuclear κ B (NF- κ B) e PKC-d estão associados com efeitos antiapoptóticos observados em neutrófilos incubados com IFN- β (20).

Mais de 300 genes, chamados de genes induzidos por interferon, são responsivos ao tratamento com IFN. As proteínas de IFN mais estudadas são aquelas com propriedades antivirais. Por exemplo, a enzima da

família de 2,5-oligosintetase (OAS-1 e -2) catalisa a síntese de oligoadenilatos curtos, que se ligam e ativam RNaseL, uma enzima que cliva RNAs virais e celulares, inibindo assim a síntese de proteína. A proteína quinase (PKR) ativada por DsRNA fosforila o fator de iniciação da tradução eIF2a, resultando também na inibição das sínteses de proteína viral e celular. Mais recentemente, PKR também foi descoberto ser necessário para a ativação da transcrição do fator NF- κ B, uma personagem central na indução de citocina inflamatória, modulação imune e apoptose. As proteínas Mx (resistência ao mixovírus) inibem a replicação dos vírus de RNA prevenindo tanto o transporte de partículas virais dentro da célula quanto a transcrição de RNA viral. A adenosina desaminase específica de RNA (ADAR) converte adenosina para inosina, causando assim hipermutação de genomas de RNA virais (21).

HuIFNs possuem um amplo espectro de atividades biológicas incluindo funções antivirais, antitumorais e de imunorregulação. Os potenciais clínicos de interferons humanos têm sido amplamente explorados e estão resumidos abaixo.

Com relação às aplicações antitumorais, os HuIFNs podem mediar efeitos antitumorais tanto indiretamente pela regulação imunomodulatória e respostas antiangiogênicas quanto diretamente afetando a proliferação ou diferenciação celular de células de tumor (22). A terapia com interferon tem sido usada no tratamento de várias leucemias (23), por exemplo, leucemia de célula pilosa (24), leucemia mieloide aguda e crônica (25-27), osteossarcoma (28), carcinoma de células basais (29), glioma (30), carcinoma de célula renal (31), mieloma múltiplo (32), melanoma (33), sarcoma de Kaposi (23) e doença de Hodgkin (34). A terapia de combinação de IFN- α com citarabina (ara-C), 5-FU, hidroxiuréia e IL-2 é bem estudada, na maioria mostrando resultados significativamente melhores do que HuIFN- α sozinho (3). O tratamento sinérgico do câncer avançado com uma

combinação de HuIFNs e temozolomida também tem sido descrito (35).

Com relação a aplicações antivirais, HuIFNs têm sido usados clinicamente para terapia antiviral, por exemplo, no tratamento de AIDS (36), hepatite viral incluindo hepatite B crônica, hepatite C (37, 38), infecção por papilomavírus (39), infecção por herpes vírus (40), encefalite viral (41) e na profilaxia de rinite e infecções respiratórias (40).

HuIFNs também têm sido usados clinicamente para terapia antibacteriana (42), por exemplo, HuIFN- γ (43) e HuIFN- γ (43) em aerossol tem sido usados em pacientes com tuberculose pulmonar resistente a múltiplos fármacos (44). HuIFN- γ tem sido usado em pacientes com tuberculose cerebral resistente a múltiplos fármacos (45).

HuIFNs também tem sido usados clinicamente para terapia de imunomodulação, por exemplo, para evitar rejeição de enxerto vs. hospedeiro, ou para reduzir a progressão de doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla (46, 47) e síndrome de Sjogren (48). IFN- β está aprovado pelo FDA nos Estados Unidos para o tratamento de esclerose múltipla. Recentemente foi descrito que pacientes com esclerose múltipla têm a produção de interferons do Tipo I e interleucina-2 diminuída (49). Além disso, a terapia de imunomodulação com HuIFN- α parece ser uma terapia eficaz na leucemia mielóide crônica (CML) em pacientes recidivantes após transplante de medula óssea (50).

Com relação ao auxílio de vacinas, HuIFNs têm sido usados clinicamente como um adjuvante no tratamento de melanoma (51) e também podem ser usados como adjuvante ou coadjuvante para aumentar ou simular a resposta imune em casos de vacinação profilática ou terapêutica para muitas outras doenças (52).

HuIFN- α 2a foi o primeiro inibidor de angiogênese a ser usado em testes clínicos e era eficaz em crianças par ao tratamento de hemangiomas graves (53, 54). Outra indicação clinica é um tumor de células gigantes do

osso. Kaban et al. relataram a regressão dramática de um grande, tumor de células gigantes da mandíbula recorrente e de rápido crescimento (55).

Embora HuIFNs tenham muitas aplicações clínicas importantes, eles exibem efeitos colaterais significativos além de outras limitações. A maioria das citocinas, incluindo HuIFNs, tem meias-vidas de circulação relativamente curtas, já que eles são produzidos *in vivo* para agir localmente e transitoriamente. Como são administrados tipicamente como terapêuticos sistêmicos, os HuIFNs não precisam ser administrados com frequência e em doses relativamente grandes. Administrações parenterais frequentes são inconvenientes e dolorosas. Além disso, efeitos colaterais tóxicos associados com a administração de HuIFNs são frequentemente tão severos que algumas pessoas não toleram o tratamento. Estes efeitos colaterais são provavelmente associados com a administração sistêmica de altas dosagens. Além disso, em estudos clínicos foi descoberto que alguns pacientes produzem anticorpos para rHuIFN, o que neutraliza sua atividade biológica (56).

Claramente, o desenvolvimento de novas proteínas de interferon com potência aumentada é urgentemente necessário para várias aplicações, por exemplo, terapias anticâncer, assim como antiviral, imunoterapia, antiparasitas, antibacteriana, ou qualquer condição ou situação médica onde a atividade de interferon aumentada e/ou os efeitos colaterais reduzidos é necessária. Em geral, é muito provável que os HuIFNs desempenhem um papel importante na próxima geração de terapias antitumorais e antivirais (10).

É bem conhecido na técnica que os meios mais eficazes para melhorar as propriedades farmacêuticas de fármacos de citocina são mutar a proteína da citocina em si. Várias estratégias e técnicas para mutar peptídeos de interferon se desenvolveram ao longo do tempo. Geralmente, três estratégias são usadas atualmente para criar mutantes de HuIFN- α .

A primeira estratégia é fazer híbridos de IFN. Alguns pesquisadores tomaram vantagem da presença de sítios de clivagem de endonuclease de restrição (RE) de ocorrência natural dentro das sequências codificantes de IFN para unir fragmentos codificantes homólogos (57, 58). A
5 produção de vários de IFNs híbridos foi revista por Horisberger e Di Marco (11); este artigo fornece uma visão geral do processo de construção de tais moléculas. Exemplos específicos de métodos para construção de interferons híbridos são descritos. Alguns pesquisadores beneficiaram-se da amplificação por PCR para construir IFN- α s mutantes para assim criar fragmentos de ácido
10 nucleico especificamente desejados e então ganhar o potencial de unir novas partes de diferentes IFNs (59). A Patente U.S. No. 6.685.933 (60) também descreve técnicas de amplificação por PCR para fazer híbridos de IFN humanos. Os híbridos de interferon podem ser criados dentro de um subgrupo de interferon, tal como descrito na Patente U.S. No. 5.137.720 (61) e Patente
15 U.S. No. 6.685.933 (60) ou entre pelo menos dois grupos de classificação de interferon distintos, tal como descrito na Patente U.S. No. 6174996 (62) e Patente U.S. No. 6.685.933 (60). Além disso, os genes parentais do híbrido podem vir de uma espécie (a maioria de humanos), por exemplo, híbridos entre HuIFN- α e HuIFN- ω , ou de mais de uma espécie de animal, por
20 exemplo, híbridos entre interferon- α s de humano e murino (63).

Uma segunda estratégia para construir mutantes de interferon é usar mutagênese pontual sítio-dirigida por introduzir alterações de um ou mais nucleotídeos em moléculas de DNA de IFN (64). Recentemente, métodos de mutação sistemática e computacionais são usados como um guia
25 para a mutagênese de proteínas (65).

Uma terceira estratégia para a construção de HuIFNs Tipo I é embaralhar fragmentos de gene de IFN que são criados por digestão com RE, amplificação por PCR, síntese química ou digestão com DNase, seguido por PCR para unir aleatoriamente os fragmentos juntos e então amplificá-los. Os

produtos de PCR resultantes são de fato um conjunto de fragmentos de gene de interferon alfa rearranjados que podem ser usados para construir uma biblioteca de DNA, a partir da qual os clones de DNA com os fenótipos desejados podem ser isolados (66). Por exemplo, Chang et al descreveram um método para construir e rastrear uma biblioteca de embaralhamento de derivados de HuIFN com atividades antivirais e antiproliferativas aumentadas em células de camundongo (67).

Interferon alfacon-1 (interferon consenso) humano é um HuIFN- α recombinante de ocorrência natural com 166 aminoácidos. Ele foi gerado por determinar os aminoácidos mais conservados em cada região correspondente com base nas sequências de HuIFN- α clonadas. Ele tinha 80% de homologia de sequência ao nível de aminoácido com HuIFN- α 2b e uma atividade antiviral específica de aproximadamente 10^9 IU/mg. Interferon alfacon-1 humano foi aprovado para o tratamento de infecção crônica de HCV em pacientes de 18 anos de idade ou mais velhos com doença hepática compensada (68).

Embora algumas proteínas de interferon recombinantes sejam conhecidas na técnica anterior, há uma necessidade por novas proteínas e composições de proteínas tipo-interferon tendo atividades biológicas aumentadas.

Sumário da invenção

De acordo com a invenção, um polinucleotídeo isolado que codifica uma proteína tendo atividades biológicas tipo-interferon humano é revelada. Em uma modalidade o polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeo pelo menos 93% idêntica a SEQ ID No: 1. Em outras modalidades a sequência de nucleotídeo é pelo menos 98% idêntica a SEQ ID No: 1.

Em uma modalidade, a invenção compreende uma proteína selecionada do grupo que consiste nas proteínas que tendo cada uma

sequência de aminoácido pelo menos 85% idêntica a SEQ ID No: 2. Preferivelmente, a proteína não é de ocorrência natural e tem atividade antiviral e antiproliferativa aumentada em comparação ao interferon alfa 2b humano (HuIFN- α 2b). Por exemplo, a proteína pode ser uma atividade
 5 antiviral pelo menos 2 vezes maior do que HuIFN- α 2b e atividade antiproliferativa pelo menos 10 maior do que HuIFN- α 2b. Em modalidades particulares, a sequência de aminoácido da proteína é pelo menos 90% idêntica ou pelo menos 95% idêntica a SEQ ID No: 2.

A invenção abrange vetores recombinantes que compreende a
 10 sequência do polinucleotídeo e as células hospedeiras que contêm os vetores. A invenção também abrange fragmentos de polipeptídeo que exibem atividades biológicas tipo-interferon humano. A invenção também inclui construtos de proteína e outras composições que exibem atividades biológicas tipo-interferon, tais como conjugados que compreendem a proteína e outra
 15 porção, tal como um polímero inorgânico. A invenção ainda inclui métodos e usos da proteína e das composições para fins terapêuticos, por exemplo, como agentes antivirais ou anticâncer. A invenção também pode ser usada para o tratamento de outras condições responsivas à terapia com interferon.

Breve Descrição das Figuras

20 A Figura 1 mostra uma sequência de DNA completa que codifica uma nova proteína da invenção referida aqui como Novaferon™ (SEQ ID No:1) (A). A Figura 1 também mostra a sequência de aminoácido prevista de Novaferon (SEQ ID No:2) (B), e o alinhamento da sequência de aminoácido de Novaferon com a sequência de DNA de Novaferon (C). O
 25 primeiro aminoácido, cisteína, na proteína Novaferon madura é designado como resíduo 1.

A Figura 2 mostra o alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene de Novaferon com o gene de HuIFN- α 14 (número do Genbank: NM_002172) (A) e o alinhamento da sequência de aminoácido da proteína

Novaferon com a proteína HuIFN- α 14 (traduzida, número do Genbank: NM 002172) (B). O primeiro aminoácido, cisteína, na proteína Novaferon madura é designado como resíduo 1. Novaferon partilha aproximadamente identidade de sequência de 93% (462/498) com HuIFN- α 14 ao nível de nucleotídeo e
 5 identidade de sequência de aproximadamente 87% (144/166) ao nível de aminoácido. Nucleotídeos divergentes estão indicados por um espaço em branco na linha do meio.

A Figura 3 mostra o alinhamento da sequência de nucleotídeo do gene de Novaferon com o gene de HuIFN- α 2b (número do Genbank: NM_000605) (A) e o alinhamento da sequência de aminoácido da proteína
 10 Novaferon com a proteína HuIFN- α 2b (traduzida a partir do gene de HuIFN- α 2b com o número do Genbank: NM 000605) (B). O primeiro aminoácido, cisteína, na proteína Novaferon madura é designado como resíduo 1. Novaferon partilha identidade de sequência de aproximadamente 89%
 15 (445/498) com HuIFN- α 2b ao nível de nucleotídeos e identidade de sequência de aproximadamente 81% (135/166) ao nível dos aminoácidos. Os nucleotídeos divergentes estão indicados por um espaço em branco na linha do meio.

A Figura 4 é um gráfico mostrando a inibição antiproliferativa
 20 *in vitro* de células Daudi por Novaferon em comparação com HuIFN- α 2b.

A Figura 5 é um gráfico mostrando os efeitos antitumorais *in vivo* de Novaferon e HuIFN- α 2b em camundongos nus com xenoenxertos de câncer de próstata humano PC-3.

A Figura 6 é um gráfico mostrando os efeitos antitumorais *in vivo* de Novaferon e HuIFN- α 2b em camundongos nus com xenoenxertos de
 25 câncer de fígado humano Hep G2.

A Figura 7 é um gráfico mostrando os efeitos antitumorais *in vivo* de Novaferon e HuIFN- α 2b em camundongos nus com xenoenxertos de melanoma humano A-375.

A Figura 8 é um gráfico mostrando os efeitos antitumorais *in vivo* de Novaferon e HuIFN- α 2b em camundongos nus com xenoenxertos de câncer cólon LS 180.

5 A Figura 9 é um gráfico mostrando os efeitos antitumorais *in vivo* de Novaferon e HuIFN- α 2b em camundongos nus com xenoenxertos de leucemia humana HL 60(S).

Descrição Detalhada

Através de toda a seguinte descrição, detalhes específicos são descritos a fim de fornecer um entendimento mais completo da invenção. 10 Entretanto, a invenção pode ser praticada sem estes particulares. Em outros casos, elementos bem conhecidos não foram mostrados ou descritos em detalhes para evitar obscurecer desnecessariamente a invenção. Consequentemente, o relatório descritivo e desenhos devem ser considerados de uma forma ilustrativa e não restritiva.

15 Definição dos Termos

Antes de descrever a presente invenção em detalhes, deve ser compreendido que esta invenção não está limitada às moléculas de proteína, metodologia, protocolos, linhagens celulares, vetores e reagentes particulares descritos já que os mesmos podem variar. Também deve ser compreendido 20 que a terminologia usada aqui tem a finalidade de descrever modalidades particulares apenas, e não é pretendida para limitar o escopo da presente invenção que será limitada apenas pelas reivindicações anexas.

A fim de tornar a invenção descrita aqui mais completamente compreendida, os seguintes termos são empregados e pretendidos como sendo 25 definidos conforme indicado abaixo. Deve ser compreendido que a terminologia usada aqui tem a finalidade apenas de descrever as modalidades particulares, e não deve ser pretendida para limitar o escopo da presente invenção que é limitada apenas pelas reivindicações anexas.

A menos que definido que outra forma, todos os termos

técnicos e científicos usados aqui têm os mesmos significados que os comumente entendidos pelo versado na técnica à qual esta invenção pertence. Todas as publicações mencionadas aqui estão incorporadas por meio deste por referência com o propósito de descrever e revelar as linhagens celulares, vetores, e metodologias que são relatadas nas publicações e que poderiam ser usadas em relação à invenção. Nada aqui contido deve ser considerado como uma admissão de que a invenção não está qualificada para anteceder tais revelações pelo fato de invenção anterior.

O termo “interferon” se refere a uma família de proteínas secretadas produzidas por uma variedade de células eucarióticas mediante exposição a vários estímulos ambientais, incluindo infecção viral, ou exposição a um mitógeno. Além de ter propriedades antivirais, os interferons mostraram afetar uma grande variedade de funções celulares. Todas as unidades de interferon são expressas aqui com referência aos padrões internacionais do WHO, 94/786 (rHuIFN- α consenso) e 95/650 (rHuIFN- α 2a).

O termo “tipo-interferon” se refere às características funcionais e/ou estruturais exibidas por, ou similares a, interferons ou análogos de interferon conhecidos. Por exemplo, “atividades biológicas tipo-interferon” inclui atividades antivirais e antiproliferativas. Outros exemplos de atividades biológicas tipo-interferon são descritos aqui e poderiam ser compreendidos por um versado na técnica. O termo no plural “atividades” inclui o termo no singular “atividade”; isto é, a invenção abrange proteínas recombinantes ou outras proteínas ou construtos ou composições de proteína que exibem pelo menos uma atividade tipo-interferon.

O termo “interferon consenso” refere-se a um tipo de interferon sintético tendo uma sequência de aminoácido que é a média bruta das sequências de todos os sub-tipos de alfa interferon conhecidos. Foi relatado que o interferon consenso tem uma atividade de ativação de células

NK, antiproliferação e antiviral que qualquer subtipo de IFN- α humano natural.

O termo “isolado” conforme usado aqui se refere a moléculas, tais como DNA ou RNA, que foram removidas de seu ambiente nativo. Por exemplo, moléculas de DNA recombinantes contidas em um vetor são consideradas isoladas para os propósitos da presente invenção. Exemplos adicionais de moléculas de DNA isoladas incluem moléculas de DNA recombinantes mantidas em células hospedeiras heterólogas ou moléculas de DNA purificadas (parcialmente ou substancialmente) em solução. DNA “isolado” também inclui fragmentos de DNA de interesse, assim como ácidos nucleicos sintetizados quimicamente. Ácidos nucleicos isolados podem portanto ser produzidos de forma recombinante.

O termo “sequência de nucleotídeo” se refere a uma sequência de nucleotídeos que compreende um oligonucleotídeo, polinucleotídeo ou molécula de ácido nucleico, e fragmentos ou porções suas. No caso de uma molécula de DNA, a sequência pode compreender uma série de desoxirribonucleotídeos e no caso de uma molécula de RNA a sequência pode compreender uma série correspondente de ribonucleotídeos. O oligonucleotídeo, polinucleotídeo ou molécula de ácido nucleico pode ser de fita simples ou dupla e a sequência de nucleotídeos pode representar a fita senso ou antisenso.

Os termos “fragmento de oligonucleotídeo” ou um “fragmento de polinucleotídeo”, “porção”, ou “segmento” ou “sonda” ou “iniciador” são usados intercambiavelmente e se referem a uma sequência de resíduos de nucleotídeo que tem pelo menos cerca de 5 nucleotídeos de extensão. Preferivelmente os fragmentos podem ser usados para hibridizar a uma sequência de nucleotídeo alvo. Um iniciador serve como um ponto de início para a polimerização de nucleotídeos catalisada pela DNA polimerase, RNA polimerase, ou transcriptase reversa. Um fragmento ou segmento pode

identificar de forma única cada sequência de polinucleotídeo da presente invenção. Preferivelmente o fragmento compreende uma sequência substancialmente similar a SEQ ID NO: 1.

Os termos “proteína” ou “peptídeo” ou “oligopeptídeo” ou “polipeptídeo” se refere a moléculas sintéticas de ocorrência natural ou sintética que compreendem uma sequência de aminoácidos.

O termo “quadro aberto para leitura” ou ORF, significa uma série de triplas de nucleotídeo que codificam aminoácidos sem nenhum códon de terminação e geralmente denota uma sequência traduzível em uma proteína.

O termo “sequência codificante de proteína madura” se refere a uma sequência que codifica uma proteína ou peptídeo sem uma sequência de sinal ou líder. A proteína pode ter sido produzida pelo processamento na célula que remove qualquer sequência líder/de sinal. A proteína pode ser produzida sinteticamente ou pelo uso de apenas um polinucleotídeo codificando apenas a sequência codificante da proteína madura.

Os termos “purificado” ou substancialmente purificado” conforme usados aqui significam que a proteína indicada está presente na ausência substancial de outras macromoléculas biológicas, por exemplo, outras proteínas, polipeptídeos e semelhantes. A proteína é purificada tal que ela constitui pelo menos 95% em peso das macromoléculas biológicas presentes indicadas (mas água, tampões, e outras moléculas pequenas, especialmente moléculas apresentando um peso molecular de menos do que 1000 daltons, podem estar presentes).

O termo “veículo ou vetor de expressão recombinante” se refere a um plasmídeo ou fago ou vírus ou vetor, para expressar uma proteína a partir de uma sequência de DNA (RNA). Um carreador de expressão pode compreender uma unidade transcricional que compreende um agrupamento de (1) um elemento ou elementos genético(s) tendo um papel regulatório na

expressão gênica, por exemplo, promotores ou intensificadores (2) uma sequência codificante estrutural a qual é traduzida em mRNA e traduzida em uma proteína, e (3) sequências de iniciação e terminação de transcrição adequadas. Unidades estruturais pretendidas para uso em sistemas de expressão de levedura ou eucarióticos, incluem preferivelmente uma sequência líder que permite a secreção extracelular de proteína traduzida por uma célula hospedeira. Alternativamente, onde proteína recombinante é expressa sem uma sequência líder o de transporte, ela pode incluir um resíduo amino terminal de metionina. Este resíduo pode ou não ser subsequente

5 clivado a partir da proteína recombinante expressa para fornecer um produto final.

O termo “similaridade substancial” se refere a um ácido nucleico ou fragmento seu que tem um alto grau de identidade de sequência com outro ácido nucleico quando otimamente alinhados com o outro ácido nucleico ou sua fita complementar. A identidade ou homologia de sequência pode ser determinada usando programa de análise de sequência, por exemplo, BLASTN. Um primeiro ácido nucleico é considerado ser substancialmente similar a um segundo ácido nucleico se eles mostrarem identidade de sequência de pelo menos cerca de 85 a 95% ou mais quando otimamente alinhados. Por exemplo, para determinar identidade ou homologia de sequência entre dois ácidos nucleicos diferentes, o programa BLASTN “BLAST 2 sequências” é usado. Este programa está disponível para uso público a partir do National Center for Biotechnology Information (NCBI) na Internet (<http://http.7/www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) (69).

25 Como exemplo não limitante, tais comparações podem ser feitas usando o programa ajustado para as configurações predeterminadas. Da mesma forma, uma primeira proteína ou polipeptídeo é considerado ser substancialmente similar a uma segunda proteína ou polipeptídeo se eles mostrarem identidade de sequência de pelo menos cerca de 85% a 95% ou mais quando otimamente

alinhados e comparados usando o programa BLAST (blastp) usando a configurações predeterminadas.

Como ilustração adicional, um polinucleotídeo que tem uma sequência de nucleotídeo pelo menos, por exemplo, 95% “idêntica” a uma sequência de nucleotídeo de referência que codifica uma proteína, significa que a sequência de nucleotídeo do polinucleotídeo é idêntica à sequência de referência exceto que a sequência de polinucleotídeo pode incluir até cinco mutações pontuais por cada 100 nucleotídeos da sequência de nucleotídeo de referência que codifica a proteína. Em outras palavras, para se obter um polinucleotídeo tendo uma sequência de nucleotídeo pelo menos 95% idêntica a uma sequência de nucleotídeo de referência, até 5% dos nucleotídeos na sequência de referência podem ser deletados ou substituídos por outro nucleotídeo, ou um número de nucleotídeos de até 5% dos nucleotídeos totais na sequência de referência podem ser inseridos na sequência de referência.

Os termos “complementar” ou “complementaridade”, conforme usados aqui se referem à ligação natural de polinucleotídeos sob condições de sal e temperatura permissivas por pareamento de bases. Por exemplo, a sequência “A-G-T” se liga à sequência complementar “T-C-A”. A complementaridade entre duas moléculas de fita simples pode ser “parcial”, na qual apenas alguns dos ácidos nucleicos se ligame, ou ela pode ser completa quando existir complementaridade total entre as moléculas de fita simples. O grau de complementaridade entre fitas de ácido nucleico tem efeitos significativos sobre a eficiência e a força de hibridização entre fitas de ácido nucleicos. Isto é de importância particular em reações de amplificação, que dependem da ligação entre fitas de ácido nucleico.

O termo “transformação” significa introduzir DNA em um organismo para que o DNA seja replicável, tanto como um elemento extracromossômico, quando por integração cromossômica. O termo “transfecção” se refere à aquisição de um vetor de expressão por uma célula

hospedeira, quer quaisquer sequências codificantes sejam ou não de fato expressas.

Os termos “tratamento”, “tratar” e seus equivalentes gramaticais, são usados no sentido amplo e incluem tratamento terapêutico, prevenção, profilaxia, e melhora de certos sintomas ou condições indesejadas.

Os termos “biologicamente ativo” e “atividades biológicas” conforme usados aqui, se referem às funções regulatórias, bioquímicas, ou outras em sistemas vivos, por exemplo, similares ou idênticas às moléculas de ocorrência natural ou não-natural.

O termo “antiproliferação” e “antiproliferativo” conforme usado aqui, se refere a redução e/ou prevenção do crescimento e divisão das células, resultando na redução do número total e/ou redução da porcentagem de células alvo em qualquer uma das fases do ciclo celular. As células podem ainda ser especificadas como estando paradas em um estágio do ciclo celular particular: G1 (Gap 1), fase S (síntese de DNA), G2 (Gap 2) ou fase M (mitose). O termo “atividade anti-proliferativa” conforme usado aqui se refere à atividade de uma proteína, construto ou composição de proteína que inibe a proliferação celular, especialmente proliferativa de células neoplásicas, por exemplo, células de câncer, tanto *in vitro* como *in vivo*.

O termo “antitumor” ou “anticâncer” conforme usado aqui se refere à oposição ou prevenção da formação de tumores malignos. A “atividade antitumoral” ou “atividade anticâncer” quando usada aqui se refere à atividade de uma proteína, construto de proteína ou composição que inibe a proliferação celular, especialmente proliferação de célula neoplásica, por exemplo, de células de câncer, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

O termo “IC₅₀”, ou a “concentração inibidora da metade do máximo” representa a concentração de um inibidor, tal como uma proteína, que é necessária para inibição de 50% do crescimento celular *in vitro*.

Os termos “antiviral” e “antivírus” conforme usados aqui

referem-se ao atraso ou e/ou impedimento da infecção viral de células ou interferência na replicação viral em células *in vitro* e/ou *in vivo*, resultando em retardo ou parada da propagação viral, ou redução no número total de partículas virais. A “atividade antiviral” conforme usada aqui significa a

5 atividade de uma proteína, construto de proteína ou composição que inibe infecções virais ou interfere com a replicação viral, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Proteína Novaferon

A presente invenção se refere à preparação e caracterização de

10 uma nova proteína tipo-interferon humano, referida aqui como NovaferonTM. Conforme descrito em detalhes abaixo, a proteína Novaferon exibe atividades biológicas antivirais e antiproliferativas aumentadas em comparação ao HuIFN- α 2b de ocorrência natural conforme medido em testes *in vitro* padrões. Em particular, a proteína Novaferon mostra um aumento de 12,5 vezes na

15 atividade antiviral quando testada em um sistema de Wish-VSV, e uma melhora de cerca de 400 vezes na inibição antiproliferativa do crescimento de célula Daudi quando comparado com HuIFN- α 2b nos mesmos sistemas de teste.

Em uma modalidade, a proteína Novaferon é codificada por

20 um polinucleotídeo que consiste em 498 nucleotídeos conforme mostrado em SEQ ID No: 1 e na Figure 1(A). A proteína Novaferon madura consiste em 166 aminoácidos conforme mostrado em SEQ ID No: 2 e na Figura 1 (B). As sequências de polinucleotídeo e aminoácido e suas variantes que são abrangidas pela invenção são descritas em mais detalhes abaixo.

25 Para fins comparativos, a homologia de Novaferon com HuIFNs de ocorrência natural foi explorada pelos inventores. Buscas BLAST revelaram que Novaferon tem a maior homologia a HuIFN- α 14 tanto no nível dos nucleotídeos quando dos aminoácidos. Conforme mostrado na Figura 2, a sequência de polinucleotídeo (SEQ ID No: 1) codificando Novaferon tem

uma homologia de aproximadamente 93% (462/498) a HuIFN- α 14 e a sequência de aminoácido tem uma homologia de aproximadamente 87% (144/166) a HuIFN- α 14. Em comparação a HuIFN- α 2b, o produto de interferon humano mais amplamente usado, a homologia é de aproximadamente 89% no nível dos nucleotídeos (445/498) e de aproximadamente 81% (135/166) no nível dos aminoácidos, conforme mostrado na Figura 3.

Com relação a IFN alfacon-1 sintético (interferon consenso), Novaferon tem 91% de identidade de sequência no nível dos nucleotídeos (453/498) e aproximadamente 84% de identidade de sequência no nível dos aminoácidos (140/166).

Conforme descrito em detalhes na seção experimental abaixo, a sequência de nucleotídeos de polinucleotídeo (SEQ ID No: 1) foi selecionada a partir de uma biblioteca de embaralhamento de DNA de interferon humano. Resumidamente, a proteína Novaferon foi produzida por transfecção de células hospedeiras com um vetor recombinante contendo a sequência de polinucleotídeo completa de SEQ ID No: 1. A proteína Novaferon contida no sobrenadante da linhagem celular hospedeira foi purificada e mostrada exibir atividades biológicas tipo-interferon humano, tais como funções antivirais e antiproliferativas,

Polinucleotídeos e variantes

A nova sequência de polinucleotídeo/molécula de ácido nucleico da presente invenção consiste em 498 nucleotídeos conforme mostrado na FIG 1 (SEQ ID No: 1). Usando a informação fornecida aqui, tal como a sequência de nucleotídeos, uma molécula de ácido nucleico da presente invenção codificando uma proteína Novaferon (SEQ ID No: 2) pode ser obtida por expressão recombinante, síntese química ou pelo uso de outros procedimentos de biológica molecular usuais, tais como aqueles para mutagênese de DNA.

A invenção, além da molécula de ácido nucleico isolada (SEQ ID No: 1), também inclui moléculas de DNA tendo sequências que são diferentes da sequência de DNA descrita em SEQ ID No: 1 mas, devido à degeneração do código genético, ainda codificam a mesma ou substancialmente mesma sequência de aminoácido da proteína Novaferon (SEQ ID No: 2). Os códigos genéticos e preferências de códon espécie-específicas são bem conhecidos na técnica. Desta forma, seria de rotina para o versado na técnica gerar as variantes degeneradas de sequências de DNA a partir da sequência de DNA de SEQ ID No: 1, por exemplo, para otimizar a expressão de códons para um hospedeiro em particular (por exemplo, alterar os códons no mRNA humano para aqueles preferidos por um hospedeiro bacteriano (tal como *E. coli*).

A invenção ainda fornece uma molécula de ácido nucleico isolada que tem a sequência de nucleotídeo mostrada na FIG 1 (SEQ ID No: 1), ou uma molécula de ácido nucleico tendo uma sequência complementar à sequência de ácido nucleico em SEQ ID No: 1. A presente invenção também fornece informação sobre e se refere aos vetores recombinantes, os quais incluem as moléculas de ácido nucleico isoladas da presente invenção, e às células hospedeiras contendo os vetores recombinantes, assim como, aos métodos de fazer tais vetores e criar células hospedeiras que expressam a proteína Novaferon, e usar as células hospedeiras para a produção de Novaferon por técnicas recombinantes.

Com base na sequência de ácido nucleico da presente invenção (SEQ ID No:1, Fig. 1 (A), a invenção abrange moléculas de ácido nucleico que são substancialmente similares a ela, tais como ácidos nucleicos tendo pelo menos cerca de 85 a 95% ou mais identidade de sequência a SEQ ID No: 1 quando otimamente alinhadas. Por exemplo, em um aspecto, ácidos nucleicos tendo cerca de 93%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência à sequência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID No: 1 estão dentro

do escopo da invenção, independente de se elas codificam proteína ou polipeptídeos tendo atividades biológicas similares ao Novaferon (tais atividades incluem, mas não são limitadas a funções antivirais, antiproliferativas, e antitumorais aumentadas, em comparação com HuIFNs).

5 Tais moléculas de ácido nucleico poderiam ser usadas, por exemplo, como sondas para a detecção de mRNA em células já transfectadas com um vetor contendo a sequência de nucleotídeo da presente invenção para a produção de Novaferon. Em outras palavras, estas sequências de ácido nucleico pelo menos cerca de 93%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas à sequência
10 mostrada em SEQ ID No: 1 poderiam ser usadas como marcadores para determinar a expressão dos genes heterólogos em uma célula hospedeira.

Além disso, a invenção inclui um polinucleotídeo que compreende qualquer porção de pelo menos cerca de 30 nucleotídeos contíguos, preferivelmente pelo menos cerca de 50 nucleotídeos contíguos de
15 SEQ ID No: 1.

Mais geralmente, esta invenção inclui e cobre os fragmentos de qualquer e todas as moléculas de ácido nucleico isoladas que são idênticas à(s) sequência(s) parcial(is) da sequência de nucleotídeos mostrada na FIG. 1 (SEQ ID No: 1). Em uma modalidade tais fragmentos podem ter pelo menos
20 15 nucleotídeos de comprimento e são úteis como sondas de diagnóstico e iniciadores conforme discutido aqui. Além disso, esta invenção inclui e sobre fragmentos maiores que tem cerca de 50 nucleotídeos ou mais de extensão.

Além da sequência de ácido nucleico descrita em SEQ ID No: 1 codificando a proteína Novaferon, a presente invenção também inclui, mas
25 não é limitada, às sequências de ácido nucleico que codificam a sequência de aminoácido da proteína Novaferon completa junto com aminoácidos/peptídeo(s)/polipeptídeo(s) extra(s), por exemplo, uma sequência líder secretória adicionada.

Também incluídos na invenção são sequências de ácidos

nucleicos que têm a sequência de ácido nucleico descrita em SEQ ID No: 1 assim como sequências não codificantes adicionais, incluindo, por exemplo, mas não limitadas a, íntrons e sequências não codificantes 5' e 3', tais como as sequências transcritas não traduzidas que desempenham um papel na transcrição, processamento de mRNA (isto é, sinais de união e poliadenilação, ligação de ribossomo e estabilidade de mRNA), e sequências codificantes adicionais que codificam aminoácidos adicionais com ou sem funcionalidades.

A presente invenção ainda se refere às variantes das moléculas de ácido nucleico da presente invenção (SEQ ID No: 1), as quais codificam porções, análogos ou derivados da proteína Novaferon. As variantes podem ser obtidas por pesquisa de uma biblioteca de embaralhamento de interferon ou usando técnicas de mutagênese e/ou outras técnicas conhecidas descritas na técnica.

Conforme explicado acima, tais variantes podem incluir aquelas produzidas por inserções de nucleotídeos, deleções ou substituições. As inserções, deleções ou substituições podem envolver um ou mais nucleotídeos. Estas mutações podem ocorrer nas posições 5' e 3' terminais da sequência de nucleotídeo de referência ou em qualquer lugar entre estas posições terminais, intercaladas individualmente entre nucleotídeos na sequência de referência ou em um ou mais grupos contíguos dentro da sequência de referência. Alterações podem produzir substituições, deleções ou adições de aminoácido conservativas ou não conservativas. Especialmente preferidos entre estes estão substituições, adições e/ou deleções silenciosas, as quais não alteram as propriedades e atividades da proteína Novaferon ou suas porções. Também especialmente preferidos com relação a isto são substituições conservativas.

Um aspecto da invenção fornece uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende um polinucleotídeo que tem uma sequência

de nucleotídeo pelo menos 93% idêntica, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a um polinucleotídeo selecionado a partir do grupo que consiste em: (a) uma sequência de nucleotídeo que codifica a proteína Novaferon tendo a sequência de aminoácido completa em SEQ ID No: 2 (isto é, posições 1 a 166 de SEQ ID No: 2); e (b) uma sequência de nucleotídeo que codifica um fragmento biologicamente ativo da proteína de (a); e (c) uma sequência de nucleotídeo complementar a qualquer uma das sequências em (a) ou (b) acima.

Devido a degeneração do código genético, um versado na técnica reconhecerá imediatamente que um grande número de moléculas de ácido nucleico tendo uma sequência pelo menos cerca de 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% idênticas à sequência de ácido nucleico da sequência de ácido nucleico mostrada em FIG. 1 (SEQ ID No: 1) codificarão uma proteína tendo atividade similar ou idêntica à proteína Novaferon. De fato, já que variantes degeneradas codificam todas a mesma proteína, ficará claro para o versado na técnica mesmo sem realizar um ensaio de comparação. Ainda será reconhecido na técnica que, para tais moléculas de ácido nucleico que não são variantes degeneradas, um número razoável também codificará uma proteína tendo atividades biológicas tipo-interferon. Isto é devido ao fato de que o versado na técnica está completamente ciente de substituições de aminoácido que são tanto menos prováveis ou improváveis de afetar significativamente a função da proteína (por exemplo, substituição de um aminoácido alifático por um segundo aminoácido alifático), conforme descrito adicionalmente abaixo. Por exemplo, instruções em relação a como fazer substituições de aminoácido fenotipicamente silenciosas é fornecida por Bowie et al (70), em que os autores indicam que muitas proteínas são tolerantes a substituições de aminoácidos.

Variantes e construtos de proteína e polipeptídeo

A presente invenção abrange a proteína Novaferon de SEQ

ID:2 e variantes de proteínas ou polipeptídeo que são substancialmente similares a elas, tais como proteínas que não ocorrem naturalmente, tendo pelo menos cerca de 85 a 95% ou mais identidade de sequência de aminoácido a SEQ ID No: 2. Por exemplo, proteínas que não ocorrem naturalmente, tendo pelo menos cerca de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência à sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID No: 2 estão dentro do escopo da invenção. Adicionalmente, a proteína Novaferon da invenção pode ser modificada estruturalmente pela fusão dela com outras proteínas ou fragmentos de proteína ou outras moléculas com a finalidade de aumentar suas funções e propriedades. Exemplos incluem, mas não são limitados a fundir a mesma com outras proteínas/fragmentos de proteína para aumentar sua expressão ou para estabilizar adicionalmente a proteína Novaferon.

Em uma modalidade, a sequência de ácido nucleico codificante de Novaferon e/ou proteínas Novaferon da invenção podem ser marcadas com um marcador diferente do estrutural.; “Marcado” aqui significa que um composto da sequência de ácido nucleico (SEQ ID No: 1) ou a proteína Novaferon (SEQ ID No: 2) foi ligada com pelo menos um elemento, isótopo ou outros químicos (marcadores) para permitir a detecção do composto. Em geral, marcadores são de três classes: a) marcadores isotópicos, que podem ser radioativos ou isótopos pesados; b) marcadores imunes, que podem ser anticorpos ou antígenos; e c) corantes coloridos ou fluorescentes. Os marcadores podem ser incorporados no composto em qualquer posição.

Uma vez feita, a proteína Novaferon também pode ser modificada covalentemente. Um tipo de modificação covalente inclui tratar a proteína Novaferon com um agente de derivação que é capaz de reagir com cadeias selecionadas ou com os resíduos N- ou C-terminais da proteína Novaferon. A derivação com agentes bifuncionais é útil, por exemplo, para reticulação da proteína Novaferon a uma matriz de suporte insolúvel em água

ou superfície para uso na purificação de anticorpos anti-Novaferon ou ensaios de pesquisa. Agentes de reticulação comumente usados incluem 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxisuccinimida (por exemplo, ésteres com ácido 4-azidosalicílico), imidoésteres

5 homobifuncionais incluindo ésteres de disuccinimidila tais como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionais tais como bis-N-maleimido-1,8-octano e agentes tais como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Outras modificações da proteína Novaferon incluem:

10 desamidação dos resíduos de glutaminila e asparaginila para os resíduos de glutamila e aspartila correspondentes, respectivamente; hidroxilação de prolina e lisina; fosforilação de grupos hidroxila de resíduos de serila e treonila; metilação dos grupos amino das cadeias laterais de lisina, arginina, e histidina (71); acetilação da amina N-terminal; e amidação de qualquer grupo

15 carboxila C-terminal.

Outro tipo de modificação covalente da proteína Novaferon da presente invenção compreende alterar o padrão de glicosilação nativo da proteína. Isto pode ser obtido, por exemplo, por (1) deletar e/ou adicionar uma ou mais porções de carboidrato encontradas na sequência nativa da proteína

20 Novaferon, ou (2) adicionar e/ou deletar um ou mais sítios de glicosilação que não existem na sequência nativa da proteína Novaferon.

A adição de sítios de glicosilação à proteína Novaferon pode ser obtida por alterar a sequência de aminoácido da proteína Novaferon. A alteração pode ser feita por exemplo, pela adição de, ou substituição por, um

25 ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência nativa da proteína Novaferon (por sítios de glicosilação O-ligados). A troca da sequência de aminoácido da proteína Novaferon poderia ser obtida através de alterações no nível do DNA, particularmente por mutar a sequência de DNA que codifica a proteína Novaferon em bases de nucleotídeo pré-selecionadas para que os

códons alterados possam ser traduzidos nos aminoácidos desejados.

Outro meio de aumentar os números de porções de carboidrato na proteína Novaferon é por acoplamento químico ou enzimático de glicosídeos à proteína. Tais métodos são descritos na técnica, por exemplo, já em 1981, Aplin JD e Wriston JC Jr. Descreveram a preparação, as propriedades e aplicações de conjugados de carboidrato de proteínas e lipídios (72).

A remoção das porções de carboidrato apresentadas na proteína Novaferon pode ser realizada quimicamente ou enzimaticamente ou por substituição mutacional dos códons que codificam os resíduos de aminoácido que servem como alvos para glicosilação. Técnicas de desglicosilação química são conhecidas na técnica e descritas, por exemplo, por Edge AS et al. (73). A clivagem enzimática das porções de carboidrato em polipeptídeos pode ser obtida pelo uso de uma variedade de endo- e exoglicosidases conforme descrito por Thotakura et al (74).

Tais construtos derivatizado podem incluir porções que melhorar a solubilidade, absorção, e permeabilidade através da barreira hematoencefálica, meia-vida biológica, etc. tais porções ou modificações da proteína Novaferon podem alternativamente eliminar ou atenuar quaisquer possíveis efeitos colaterais indesejáveis da proteína e semelhantes. Porções capazes de mediar tais efeitos são reveladas, por exemplo, em Remington: The Science and Practice of Pharmacy. (75).

Outro tipo de modificação covalente de Novaferon compreende ligar a proteína Novaferon a um de uma variedade de polímeros não-proteináceos, por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, ou polioxialquilenos, por exemplo, da maneira descrita nas Patentes Americanas Nos. 4.640.835 (76); 4.496.689 (77); 4.791.192 (78) ou 4.179.337 (79).

Além disso, a proteína Novaferon da presente invenção também pode ser modificada de modo a formar moléculas quiméricas

compreendendo uma proteína Novaferon fundida a outro polipeptídeo ou sequência de aminoácido heteróloga. Em uma modalidade, tal molécula quimérica compreende um composto de fusão de uma proteína Novaferon com um polipeptídeo sinalizador que fornece um epítopo ao qual um anticorpo anti-sinalizador pode ser ligar seletivamente. O sinalizador de epítopo é geralmente colocado na terminação amino ou carboxila da proteína Novaferon. A presença de tais formas sinalizadas de epítopos de uma proteína Novaferon pode ser detectada usando um anticorpo contra o polipeptídeo do sinalizador. Ainda, o fornecimento do sinalizador de epítopo permite que a proteína Novaferon seja facilmente purificada por purificação de afinidade usando um anticorpo anti-sinalizador ou outro tipo de matriz de afinidade que se ligue ao sinalizador de epítopo. Em uma modalidade alternativa, a molécula quimérica pode compreender um composto de fusão de uma proteína Novaferon com uma imunoglobulina ou uma região/fragmento particular de uma imunoglobulina. Por exemplo, para formar uma forma bivalente da molécula quimérica, a proteína Novaferon poderia ser fundida à região Fc de uma molécula de IgG.

Vários polipeptídeos sinalizadores e seus respectivos anticorpos são bem conhecidos na técnica. Exemplos incluem sinalizadores de poli-histidina (poli-his) ou poli-histidina-glicina (poli-his-gly); o polipeptídeo de sinalizador de HA de flu e seu anticorpo 12CA5 (80); o sinalizador de c-myc e os anticorpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 para eles (81); e o sinalizador de glicoproteína D (gD) de Herpes Simples e seu anticorpo (82). Outros polipeptídeos sinalizadores incluem o peptídeo-Flag (83); o sinalizador de peptídeo do epítopo de tubulina (84) e da proteína 10 do gene T7 (85).

Além disso, a proteína Novaferon da presente invenção pode ser produzida por procedimentos sintéticos químicos conhecidos daqueles versados na técnica. Por exemplo, polipeptídeos de até cerca de 80 a 90

resíduos de aminoácido de comprimento podem ser produzidos em um sintetizador de peptídeo disponível comercialmente modelo 433A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA EUA). Além disso, peptídeos de maior extensão sintetizados quimicamente de até 120 bp estão disponíveis comercialmente, por exemplo, por Bio-synthesis, Inc. Lewisville, TX EUA). Desta forma, conforme será facilmente apreciado, a proteína Novaferon de extensão completa madura pode ser produzida sinteticamente (por exemplo, em fragmentos que podem ser então ligados juntos).

Portanto, a proteína Novaferon da presente invenção (SEQ ID No: 2) inclui todas as preparações de proteína e polipeptídeo e construtos que têm a mesma sequência de aminoácido revelada em SEQ ID No: 2, independente de estas proteínas e derivados de proteínas Novaferon terem sido produzidas por procedimentos quimicamente sintéticos, e/ou por técnicas recombinantes a partir de células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas ou outras células ou hospedeiros, incluindo, mas não limitadas a células de bactérias, leveduras, plantas, insetos e mamíferos. Dependendo dos hospedeiros empregados em um método de produção recombinante, as proteínas da presente invenção podem ser glicosiladas ou não-glicosiladas, peguiladas ou não-peguiladas. Além disso, as proteínas da invenção também podem incluir um resíduo de metionina inicial modificado em alguns casos como um resultado de processos mediados pelo hospedeiro. Desta forma, é bem conhecido na técnica que a metionina N-terminal codificada pelo códon de iniciação da tradução geralmente é removida, com alta eficiência, de quaisquer proteínas após a tradução em todas as células eucarióticas. Embora a metionina N-terminal na maioria das proteínas também seja eficientemente removida na maioria dos procariotos, para algumas proteínas este processo de remoção procariótico é ineficaz, dependendo na natureza do aminoácido ao qual a metionina N-terminal está ligada covalentemente.

Produção

A presente invenção também se refere aos vetores recombinantes que consistem das moléculas de DNA isoladas da presente invenção, às células hospedeiras que são manipuladas/transfectadas geneticamente com os vetores recombinantes, e à produção da proteína Novaferon ou seus fragmentos por técnicas recombinantes. O vetor pode ser, por exemplo, um plasmídeo, um fago, um vetor viral ou retroviral. Vetores retrovirais pode ser competentes para replicação ou defeituosos para replicação. No último caso, a propagação viral geralmente ocorrerá apenas nas células hospedeiras complementares. Exemplos descrevendo em detalhes a produção de Novaferon são descritos abaixo.

Vetores preferidos para a expressão da proteína Novaferon da presente invenção incluem, mas não são limitados, aos vetores que compreendem regiões de controle cis-atuantes eficazes para expressão em um hospedeiro operacionalmente ligado ao polinucleotídeo a ser expresso. Fatores trans-atuantes apropriados são fornecidos pelo hospedeiro, por um vetor complementar ou pelo vetor em si pela introdução no hospedeiro.

A sequência de ácido nucleico revelada na presente invenção (SEQ ID No: 1) pode ser operacionalmente ligada a um promotor apropriado. “Promotor” aqui significa qualquer sequência de ácido nucleico capaz de se ligar a RNA polimerase e iniciar uma transcrição de um exon (geralmente à jusante (3’)) da sequência codificante para a proteína Novaferon em mRNA. Um promotor bacteriano tem uma região de iniciação da transcrição que está geralmente colocada na terminação 5’ da sequência codificante. Essa região de iniciação da transcrição inclui, tipicamente, um sítio de ligação à RNA polimerase e um sítio de iniciação da transcrição. Sequências que codificam enzimas da via metabólica fornecem sequências promotoras particularmente úteis. Exemplos incluem sequências promotoras derivadas de enzimas que metabolizam açúcar, tais como galactose, lactose e maltose e sequências derivadas de enzimas biossintéticas, tal como triptofano. Promotores de

bacteriófago também podem ser usados e são conhecidos na técnica. Além disso, promotores sintéticos e promotores híbridos também são úteis; por exemplo, o promotor *tac* é um híbrido das sequências promotoras *trp* e *lac*. Adicionalmente, um promotor bacteriano pode incluir promotores que ocorrem naturalmente de origem não bacteriana que tem a habilidade de se ligar à RNA polimerase bacteriana e iniciar a transcrição. Os promotores bacterianos preferidos incluem, mas não são limitados aos promotores de *E. coli* *lacI*, *trp*, *phoA* e *lacZ*, os aos promotores T3 e T7, ao promotor *gpt*, aos promotores lambda PR, PL e o promotor *trp*.

Promotores eucarióticos têm uma região de iniciação da transcrição, que está geralmente colocada proximal à terminação 5' da sequência codificante e um TATA box geralmente localizado 25 a 30 pares de bases (bp) à montante do sítio de iniciação da transcrição. Acredita-se que o TATA box dirige a RNA polimerase II para iniciar a síntese de RNA no sítio correto. Um promotor de mamífero também contém um elemento promotor à montante (elemento intensificador), localizado tipicamente dentro de 100 a 200 pares de bases à montante de TATA box. Um elemento promotor à montante determina a taxa na qual a transcrição é iniciada e pode atuar em qualquer orientação. De uso particular como promotores de mamíferos são os promotores de genes virais de mamífero, desde que os genes virais sejam geralmente altamente expressos e tenham uma ampla gama de hospedeiros. Exemplos incluem o promotor precoce de SV40, o promotor LTR de vírus de tumor de mama de camundongo. Promotores de célula animal preferidos incluem, mas não são limitados ao promotor precoce principal de adenovírus, promotor de vírus do herpes simples e promotor de CMV. Entre os promotores eucarióticos conhecidos adequados nesse aspecto estão o promotor precoce imediato de CMV, o promotor alfa do fator 1 de alongamento (EF1A), o promotor de timidina quinase de HSV, os promotores precoce e tardio de SV40 e os promotores de LTRs retrovirais, tais como

aqueles do vírus do sarcoma de Rous (“RSV”). Sequências promotoras preferidas para expressão em levedura incluem o promotor induzível GAL1/10, os promotores do gene da álcool desidrogenase, enolase, glicoquinase, glicose-6-fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, hexoquinase, fosfofrutoquinase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato quinase, e de fosfatase ácida.

Vetores para propagação e expressão também incluem geralmente um ou mais marcadores selecionáveis. Tais marcadores podem ser adequados para amplificação ou os vetores podem conter marcadores adicionais para esse propósito. Nesse aspecto, os vetores de expressão contêm preferivelmente um ou mais genes marcadores selecionáveis para fornecer uma característica fenotípica para a seleção das células hospedeiras transfectadas, embora aqueles versados na técnica reconheçam que certos sistemas de marcadores selecionáveis possam ser fornecidos em vetores separados. Marcadores preferidos incluem, por exemplo, genes de resistência a ampiclina (Amp), tetraciclina (Tet) ou higromicina (HYG) para cultura em *E. coli* e outras bactérias. Marcadores selecionáveis de levedura incluem ADE2, HIS4, LEU2, TRP1, e ALG7 que conferem resistência à tunicamicina; o gene da neomicina fosfotransferase, que confere resistência à G418; e o gene CUP1, que permite que a levedura cresça na presença de íons de cobre. Marcadores selecionáveis em célula animal incluem o gene de diidrofolato redutase (DHFR), genes de resistência à neomicina (Neo) ou higromicina (HYG).

Além disto, vetores para propagação e expressão comumente contêm um ou mais sítios de iniciação da transcrição, terminação e, na região transcrita, um sítio de ligação ao ribossomo para tradução. A porção codificante dos transcritos expressa pelos construtos inclui preferivelmente um códon de iniciação da tradução no início e um códon de terminação (UAA, UGA ou UAG) apropriadamente posicionado no final da sequência de

DNA a ser traduzida. A seleção de promotores, terminadores, marcadores selecionáveis, vetores e outros elementos é uma questão de planejamento de rotina dentro do nível de habilidade comum da técnica. Vários de tais elementos estão descritos na literatura e estão disponíveis através de fornecedores comerciais.

Os seguintes vetores estão comercialmente disponíveis e são preferidos para uso em bactérias: pBV220 (86) e seus derivados de Shanghai Sangon; série pQE da Qiagen; vetores pET da Qiagen; vetores pBS, vetores Phagescript, vetores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A da Stratagene; e ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 de Pharmacia. Entre os vetores eucarióticos preferidos estão vetores pCI da Promega, vetores pcDNA de Invitrogen, pSV2CAT, pOG44, pXT1 e pSG de Stratagene; e pSVK3, pBPV, pMSG e pSVL de Pharmacia. Esses vetores estão listados apenas como exemplos para demonstrar que vários vetores comercialmente disponíveis e bem conhecidos estão disponíveis para aqueles versados na técnica para uso na produção de proteína Novaferon descrita na presente invenção por métodos genéticos/recombinantes.

Em certas modalidades preferidas nesse aspecto, os vetores fornecem meios para expressão específica. Tal expressão específica pode ser expressão induzível ou expressão apenas em certos tipos de células ou pode ser ambas, induzível e específica para célula. Entre os vetores induzíveis particularmente preferidos estão os vetores que podem ser induzidos a expressar por fatores ambientais que são fáceis de manipular, tais como temperatura e aditivos nutrientes. Uma variedade de vetores adequados para essa aplicação, incluindo vetores de expressão constitutiva e induzível para uso em hospedeiros procarióticos e eucarióticos, é bem conhecida e empregada rotineiramente por aqueles versados na técnica.

O vetor que contém a sequência de DNA descrita na SEQ ID NO:1, por exemplo, assim como um promotor apropriado e outras sequências

de controle apropriadas, pode ser introduzido usando uma variedade de técnicas conhecidas, em uma célula hospedeira apropriada adequada para expressão de uma proteína desejada. Representantes de tais hospedeiros adequados incluem células bacterianas, tais como células de *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*; células de levedura, tais como *Pichia pastoris*; células de inseto, tais como células de *Drosophila* S2 e *Spodoptera* Sf9; células de mamífero, tais como CHO e COS; e células de planta. Hospedeiros para uma grande variedade de construtos de expressão são bem conhecidos e aqueles versados na técnica serão capazes de, com a informação descrita na presente invenção, selecionar prontamente um hospedeiro para expressar a proteína Novaferon descrita na SEQ ID No: 2.

Células hospedeiras podem ser manipuladas geneticamente para incorporar polinucleotídeos que codificam Novaferon e expressar proteínas Novaferon da presente invenção. Por exemplo, polinucleotídeos que codificam Novaferon podem ser introduzidos nas células hospedeiras usando técnicas de transfecção conhecidas. Tais métodos estão descritos em vários manuais de laboratório padronizados, tais como aqueles discutidos por Kingston (87). Polinucleotídeos que codificam Novaferon podem ser introduzidos/transfectados sozinhos ou com outros polinucleotídeos. Tais outros polinucleotídeos podem ser introduzidos independentemente, co-introduzidos ou introduzidos juntamente com os polinucleotídeos que codificam Novaferon descrito na SEQ ID No: 1.

Por exemplo, polinucleotídeos que codificam Novaferon da invenção podem ser transfectados para células hospedeiras junto com um polinucleotídeo separado que codifica um marcador selecionável para co-transfecção e seleção do marcador em células de mamíferos. Alternativamente, polinucleotídeos que codificam Novaferon podem ser incorporados em um vetor que contém uma sequência de DNA que codifica um marcador selecionável para induzir a propagação nas células hospedeiras.

As células hospedeiras manipuladas transfectadas com os vetores que contêm o polinucleotídeo que codifica Novaferon podem ser cultivadas em meios nutrientes convencionais que podem ser modificados especificamente para ativar promotores, selecionar transformantes ou
5 amplificar os genes alvo. Condições de cultura tais como temperatura, pH, etc., são ajustadas e adequadas para as células hospedeiras selecionadas expressar a proteína Novaferon da presente invenção.

Sinais de secreção adequados podem ser incorporados e co-expressos com a proteína Novaferon para promover a secreção do
10 polipeptídeo de proteína traduzido na luz do retículo endoplasmático, no espaço periplasmático ou no meio extracelular.

Purificação

Um tipo de célula hospedeira adequado é geralmente selecionado para a expressão da proteína alvo recombinante, dependendo da
15 natureza da proteína alvo e da consideração de outras condições, tais como custos de produção, se facilmente ampliável, tamanho da produção industrial, etc. Os clones das células transfectadas que expressam a proteína alvo com o maior rendimento são então selecionados e o clone final com a expressão ótima é denominado de linhagem celular de expressão da proteína alvo e
20 usado para a produção da proteína alvo. A linhagem celular que expressa a proteína alvo é cultivada em um meio contendo vários nutrientes. Para o crescimento ótimo das células e/ou expressão ótima da proteína alvo, vários agentes ou condições são usadas para induzir o promotor seletivo incorporado com a sequência de cDNA da proteína alvo no vetor transfectado. Se o tipo de
25 célula hospedeira/sistema de expressão é de bactéria, as células cultivadas são coletadas do meio, tipicamente por centrifugação. Os corpos das células coletadas são rompidos por meios físicos ou químicos e os extratos brutos coletados, que contêm a proteína alvo sintetizada, são retidos para purificação posterior da proteína. Os métodos aplicados para o rompimento das células

microbianas incluem, mas não são limitados a séries de congelamento-descongelamento, sonicação, rompimento mecânico ou uso de agentes que lisam as células. Tais métodos são bem conhecidos por aqueles versados na técnica.

5 Os inventores usaram a bactéria *E. coli* como a célula hospedeira para a expressão da proteína Novaferon recombinante. Como descrito abaixo, *E. coli* foi transfectada com o vetor que continha a sequência de polinucleotídeos que codifica Novaferon e uma cepa de *E. coli* que teve a expressão ótima da proteína Novaferon foi selecionada para a produção da
10 proteína Novaferon. Uma vez sintetizada, a proteína pode ser retida no citoplasma como grânulos insolúveis ou pode ser secretada no citoplasma de forma solúvel. No primeiro caso, os grânulos são recuperados após a lise dos corpos celulares e desnaturada usando, por exemplo, isotiocianato de guanidina ou uréia. O re-enovelamento do polipeptídeo desnaturado/proteína
15 Novaferon é então obtido pela diluição do desnaturado com uma solução diluída em excesso ou pela diálise contra uma solução de uréia e uma combinação de glutathione reduzida e oxidada, seguido pela diálise contra uma solução salina tamponada. No último caso, a proteína pode ser diretamente recuperada, sem desnaturação, do espaço periplasmático na forma solúvel e
20 funcional após o rompimento das células coletadas. Por evitar os procedimentos de desnaturação e re-enovelamento, a proteína Novaferon solúvel não é danificada e não contém moléculas de proteína deformadas ou mal enoveladas.

Os inventores descobriram que uma porção significativa da
25 proteína Novaferon sintetizada produzida na linhagem celular de *E. coli* foi secretada no citoplasma. Essa porção foi purificada como descrito abaixo.

Ensaio de Atividade e Usos Médicos

Como indicado acima, a proteína Novaferon mostra homologia de sequência com vários membros da família do interferon, em particular com

a proteína de interferon traduzida pelo mRNA de HuIFN- α 14 (FIG.2). HuIFN- α mostrou ter uma ampla faixa de atividades biológicas incluindo atividades antiviral, anti-proliferativa e de imunomodulação (10).

Com tal homologia à HuIFN- α , Novaferon é esperada exibir

5 funções biológicas similares como HuIFN- α , incluindo mas não se limitando a inibição de proliferação de tumor, atividades anti-virais, ativação de célula NK e modulação do sistema imune. De importância particular não é apenas a retenção de propriedades funcionais semelhantes às de HuIFN- α mas também a potência aumentada dessas funções biológicas da proteína Novaferon em

10 comparação com HuIFN- α . Para verificar e determinar a potência de suas propriedades funcionais, as atividades biológicas da proteína Novaferon foram então determinadas usando os ensaios clássicos e de rotina *in vitro* designados para detectar as propriedades antivirais e anti-proliferativas. Como descrito na seção experimental abaixo, a potência *in vivo* das propriedades

15 anti-proliferativas da proteína Novaferon foi ainda observada em modelos animais de vários tipos de câncer humana e comparada com HuIFN- α assim como um agente químico anti-câncer em alguns experimentos.

Vários ensaios adequados para determinar as atividades de HuIFN são bem conhecidos na técnica. Os inventores empregaram os

20 sistemas de ensaio baseados em célula *in vitro* para determinar as atividades anti-virais e anti-proliferativas. Os mesmos ensaios *in vitro* foram usados para todos os procedimentos e experimentos relacionados com a presente invenção, que incluíram, mas não se limitaram ao rastreamento da biblioteca de embaralhamento de gene de interferon Tipo I humano, seleção de

25 Novaferon das proteínas expressas da biblioteca de embaralhamento de gene de interferon Tipo I humano e determinação das atividades biológicas da proteína Novaferon recombinante pura.

Existem muitos ensaios que medem as atividades anti-virais de amostras/agentes de teste pela observação do grau de resistência de células a

vírus (88). Três bioensaios principais foram usados para medir as atividades antivirais de HuIFN e seus híbridos. Eles são classificados de acordo com os métodos de determinação de vários aspectos do vírus nas células cultivadas.

5 O ensaio para determinar a inibição de efeitos citopáticos induzidos por vírus mede o grau de redução de efeitos citopáticos líticos induzidos por vírus nas células cultivadas com pré-tratamento com IFN. Esse ensaio pode ser realizado em placas de 96 poços (89) e tem sido amplamente usado para HuIFN- α já que ele fornece um método simples para rastrear um grande número de amostras.

10 A inibição da formação de placa de vírus é outro método de quantificar as atividades anti-virais de HuIFN em culturas de tecido. Os resultados de um ensaio de redução de placa são independentes da multiplicidade da infecção. Além disso, uma redução de 50% na formação de placa é mensurável com alta precisão. Usando o vírus onipresente da
15 estomatite vesicular (VSV) para induzir a formação de placa, por exemplo, pode-se determinar o perfil de atividade de espécies interligadas de um IFN recombinante em particular pelo rastreamento de numerosas linhagens celulares de diferentes espécies de animais (90).

O terceiro ensaio é baseado na determinação da redução do
20 rendimento do vírus. A produção de vírus é medida, geralmente durante um único ciclo de crescimento celular, pela quantidade de vírus liberado. Esse ensaio é particularmente útil para testar as atividades anti-virais de IFN contra vírus que não causam efeitos citopáticos ou que não constroem placas nas culturas de célula alvo. Nesse teste, entretanto, a multiplicidade de infecção
25 afeta o grau aparente de proteção induzida por uma concentração fixa de IFN (91).

As atividades antivirais de Novaferon foram medidas por um ensaio de inibição de efeito citopático usando células WISH e o vírus da estomatite vesicular (VSV). As atividades anti-virais foram determinadas e

calibradas pelo uso de amostras de referência padronizadas de padrões internacionais da OMS: 95/650 (rHuIFN- α 2a) e 94/786 (rHuIFN- α consenso). Uma unidade de atividade antiviral é definida como a quantidade de proteína necessária para se obter 50% de inibição dos efeitos citopáticos de VSV sobre células cultivadas. Como descrito posteriormente abaixo, a atividade da proteína Novaferon foi de $2,5 \times 10^9$ IU/mg, que é cerca de 12,5 vezes maior do que aquela de HuIFN- α 2b. Esses testes demonstram que as propriedades anti-virais de Novaferon são extremamente aumentadas em comparação com HuIFN- α 2b. Essa potência contra o vírus aumentada, exibida pela proteína Novaferon, fornece a base para uma predição de efeitos anti-virais aumentados *in vivo* em humanos. Baseado na natureza de HuIFNs, é razoável esperar um perfil anti-vírus muito amplo para Novaferon. Em outras palavras, Novaferon deve ser mais potente contra um amplo espectro de vírus do que HuIFNs naturais. A potencia anti-vírus aumentada de Novaferon pode ser traduzida em melhores efeitos anti-vírus ou melhores efeitos terapêuticos em tratamento clínico para pacientes com várias doenças virais.

Como explicado acima, os IFNs também inibem a proliferação celular e exibem potentes efeitos anti-tumorais através de uma variedade de mecanismos. Vários testes anti-proliferação *in vitro* foram estabelecidos usando sistemas de cultura celular e estão bem descritos na técnica. A proliferação celular nesses ensaios pode ser medida pela contagem do número de células; bioensaio com cristal violeta (92, 93); quimiosensibilidade a corante vermelho neutro (94-96); incorporação de nucleotídeos radiomarcados (97); incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) no DNA de células proliferativas (98); uso de sais de tetrazólio (99, 100).

A linhagem celular linfoblastóide humana Daudi é muito sensível ao efeito anti-proliferativo de HuIFN- α e seu crescimento em culturas em suspensão facilita a quantificação de seus números de células (101). Essa linhagem celular tem sido usada para medir a atividade anti-

proliferativa de HuIFN- α e híbridos por muitos anos (102). Outras linhagens celulares também são usadas para testar a atividade anti-proliferativa de um agente de teste.

As atividades anti-proliferativas da proteína Novaferon foram observadas *in vivo* pela observação da inibição do crescimento da massa tumoral pela administração de Novaferon a modelos com animais com vários tipos de xenoinxertos de tumor humano. Os efeitos anti-tumor *in vivo* de Novaferon foram comparados com HuIFN- α 2b e também em alguns modelos de xenoinxerto com agente químico anti-tumor.

Como descrito em detalhes abaixo, os inventores descobriram que a atividade anti-proliferativa de Novaferon *in vitro*, medida pelo uso do método com a linhagem celular padronizada Daudi, era 400 vezes mais potente do que HuIFN- α 2b natural, que exibe provavelmente, as atividades anti-proliferativas mais potentes entre todos os HuIFNs naturais. A potência anti-proliferativa aumentada de Novaferon foi ampla e universal, já que ela exibiu mais potência ou inibição aumentada, do que HuIFN- α 2b natural em todas as linhagens celulares de câncer humano testadas *in vitro* pelos inventores. Isso indica que a inibição potente de câncer humano por Novaferon não é seletiva. Apesar da extensão de suas atividades anti-proliferativas aumentadas contra todos os tipos de linhagens celulares de câncer humano testadas ter variado, Novaferon tem o potencial para ser um amplo agente anti-câncer em tratamento clínico. Essa é uma vantagem significativa sobre agentes químicos anti-câncer, anticorpos monoclonais e outros agentes anti-câncer específicos para o alvo.

Os experimentos com modelo de xenoinxerto em animal descritos abaixo estabeleceram ainda que:

(1). Os efeitos anti-proliferativos *in vivo* de Novaferon eram muito aumentados ou mais potentes em comparação com HuIFN- α 2b natural.

(2). Os efeitos anti-proliferativos *in vivo* de Novaferon, em

doses muito menores, foram melhores do que o agente químico testado, 5-Fluorouracil (5-FU) no mesmo modelo de xenoenxerto.

5 (3). Novaferon foi capaz de alcançar 90% de inibição do crescimento do câncer em modelos de xenoenxerto, mas não induziu perda de peso, alterações de atividade e outros efeitos colaterais negativos nos animais tratados, o que foi um nítido contraste com a perda de peso significativa e redução de atividade nos animais tratados com 5-FU.

10 Esses resultados indicam que as propriedades anti-proliferativas *in vitro* e *in vivo* de Novaferon são muito intensificadas, comparando com HuIFN- α 2b natural. A potência anti-proliferativa aumentada de Novaferon é traduzida em inibição efetiva (>90%) do crescimento de tumor humano em um modelo animal com camundongo e essa inibição parece funcionar muito amplamente para todos os tipos de cânceres humanos testados e melhor do que o agente químico anti-câncer clássico, 5-FU. Esses
15 resultados também indicam que a potente inibição do crescimento de célula cancerosa de Novaferon é muito específica contra a célula cancerosa, mas não contra as células normais como confirmado pela observação de alimentação e comportamento ativo normais e ausência de perda de peso em animais tratados com Novaferon. Assim, Novaferon tem o potencial de funcionar em
20 todos ou na maioria dos cânceres humanos.

Em uma modalidade preferida, a(s) molécula(s) completa(s) ou parcial(is) da proteína Novaferon (SEQ ID No: 2), feita(s) por tecnologias recombinantes usando a sequência de polinucleotídeo de SEQ ID No. 1 ou sintetizada(s) quimicamente, poderia(m) ser aplicada(s) ao tratamento e/ou
25 prevenção de qualquer e/ou todos os tumores e cânceres de origem humana ou de origem não-humana, em humanos e/ou espécies não humanas. Estes tumores, por exemplo, incluem mas não são limitados a, sarcoma osteogênico, mieloma múltiplo, doença de Hodgkin, linfoma nodular fracamente diferenciado, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielóide aguda, carcinoma

de mama, melanoma, papiloma, e carcinoma nasofaríngeo, câncer de cólon, câncer de fígado e melanoma.

Em uma modalidade preferida, a(s) molécula(s) completa(s) ou parcial(is) da proteína Novaferon (SEQ ID No: 2), feita(s) por tecnologias recombinantes usando a sequência de polinucleotídeo de SEQ ID No. 1 ou sintetizada(s) quimicamente, poderia(m) ser aplicada(s) ao tratamento e/ou prevenção de qualquer e/ou todas as doenças virais em humanos e/ou espécies não-humanas. Exemplos das infecções virais suscetíveis incluem, mas não são limitadas, a encefalomiocardite viral, influenza e outras infecções virais do trato respiratório raiva e outras zoonoses virais e infecções por arbovírus, assim como ceratite por herpes simples, conjuntivite hemorrágica aguda, varicela zoster, e hepatite B e C, SARS e gripe das aves, síndrome da imunodeficiência humana (AIDS, HIV).

Em uma modalidade preferida, a(s) molécula(s) completa(s) ou parcial(is) da proteína Novaferon (SEQ ID No: 2), feita(s) por tecnologias recombinantes usando a sequência de polinucleotídeo de SEQ ID No. 1 ou sintetizada(s) quimicamente, poderia(m) ser aplicada(s) ao tratamento e/ou prevenção de qualquer e/ou todas as desordens relacionadas ao sistema imune em humanos. Exemplos das desordens imunes, incluem, mas não são limitadas a artrite reumática, esclerose múltipla, e diabetes da síndrome de Sjogren. A proteína Novaferon também pode ser aplicada para evitar rejeição de enxerto vs. Hospedeiro.

Em uma modalidade preferida, a(s) molécula(s) completa(s) ou parcial(is) da proteína Novaferon (SEQ ID No: 2), feita(s) por tecnologias recombinantes usando a sequência de polinucleotídeo de SEQ ID No. 1 ou sintetizada(s) quimicamente, poderia(m) ser aplicada(s) ao tratamento e/ou prevenção, como um imunoadjuvante, para qualquer e/ou todas as doenças da angiogênese. Exemplo de doenças de angiogênese incluem mas não são limitadas a hemangiomas, neovasculatura induzida por tumor, degeneração

macular relacionada com a idade e retinopatia diabética.

A proteína Novaferon, sozinha ou junto com quaisquer outras proteínas/matérias de carreador ou outros construtos, pode ser administrada a humanos e/ou espécies não humanas, em quaisquer preparações/formulações farmacêuticamente aceitáveis em quaisquer vias/métodos de administração/liberação, que incluem mas não são limitados a ingestão oral, inalação, pulverização intranasal, injeção intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intralesional ou subcutânea.

Preparações/formulações farmacêuticas contendo a proteína Novaferon como o ingrediente ativo poderiam ser feitas por incorporar um carreador sólido ou líquido apropriado, nas formas de líquidos, sólidos, semi-sólidos, e/ou quaisquer outras formas clinicamente aceitáveis, tais como comprimidos, pílulas, pós, soluções ou suspensões líquidas, lipossomos, supositórios, soluções injetáveis ou para infusão. As preparações/formulações contendo Novaferon poderiam ser feitas pelo uso de carreadores, materiais e métodos convencionais que são descritos na técnica ou geralmente aceitos pela prática da indústria farmacêutica. As preparações/formulações contendo Novaferon também poderiam ser feitas pelo uso de métodos não convencionais, que não foram descritos na técnica nem usados pela indústria farmacêutica.

Por exemplo, as formulações parenterais são geralmente fluidos injetáveis que consistem nos materiais farmacêuticamente e fisiologicamente aceitáveis tais como água, salina fisiológica, outras soluções salinas balanceadas, dextrose aquosa, glicerol etc. Além disso, os fluidos injetáveis poderiam conter também além da proteína Novaferon, outras proteínas como carreadores, tais como preparações de albumina sérica humana ou plasma. As preparações/formulações farmacêuticas também podem conter quantidades menores de substâncias auxiliares atóxicas, tais como agentes umectantes ou emulsificantes, conservantes e agentes

tamponantes do pH (por exemplo, acetato de sódio ou monolaurato de sorbitano). Métodos de formulação são bem conhecidos na técnica e são revelados, por exemplo, em Remington: The science and Practice of Pharmacy. Pharmaceutical Sciences (75).

5 As preparações/formulações de proteína Novaferon particulares poderiam ser determinadas pelas aplicações e/ou métodos de administração clínicos pretendidos, e poderiam ser feitos por qualquer versado na técnica usando técnicas conhecidas. Por exemplo, além de fluidos injetáveis, formulações tópicas e orais podem ser empregadas. Preparações
10 tópicas podem incluir, mas não são limitadas a colírios, unguentos, e sprays. Formulações orais incluem mas não são limitadas às formas de líquido (por exemplo, xaropes, soluções ou suspensões), ou sólido (por exemplo, pós, pílulas, comprimidos ou cápsulas). Para preparações/formulações sólidas, carreadores sólidos atóxicos incluem, mas não são limitados aos graus
15 farmacêuticos de manitol, lactose, amido ou estearato de magnésio. Procedimentos e/ou métodos reais de fazer estas preparações/formulações são conhecidos, ou ficarão claros, para os versados na técnica (75).

 As preparações/formulações farmacêuticamente aceitáveis da proteína Novaferon podem ser administradas a humanos e/ou espécies não
20 humanas em uma variedade de formas, que incluem, mas não são limitadas a, liberação oral, subcutânea, intravenosa, intranasal, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, retal, ou intraocular, e no tratamento de feridas, aplicada diretamente no local.

 As concentrações/quantidades da proteína Novaferon nas
25 preparações/formulações podem variar de >0 a 1,0 molar e/ou >0 a 100% (peso/peso) dependendo da prática clínica. As doses exatas, intervalos de administração e a duração do tratamento de cada e/ou todas as preparações/formulações de Novaferon será determinada por teste clínicos, pelas condições de doença, pelo estado do paciente, e por fornecedores de

cuidados com a saúde. Em uma modalidade preferida, devido à degradação da proteína, à liberação sistêmica versus localizada, e à taxa de síntese de novas proteínas, assim como idade, peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, momento de administração, interação com fármacos, e severidade da condição, etc, ajustes da administração de proteína Novaferon incluindo, mas não sendo limitados às doses individuais e/ou totais, intervalos de administração, a duração do tratamento, e os cursos necessários de tratamento podem ser necessários, serão determináveis com experimentação de rotina por aqueles versados na técnica.

Em uma modalidade preferida, a meia vida dentro da circulação da proteína Novaferon após a administração aos corpos de humanos e/ou espécies não humanas pode ser alterada. As mudanças incluem, mas não são limitadas à extensão ou ao encurtamento da meia-vida de Novaferon *in vivo*. A extensão da meia-vida *in vivo* da proteína Novaferon pode ser obtida de várias formas, as quais incluem, mas não são limitadas a:

(1) Formação de complexo entre uma molécula de Novaferon e um anticorpo monoclonal. Tal anticorpo poderia preferivelmente conectar-se à proteína Novaferon em locais que não prejudicam materialmente suas funções terapêuticas (103).

(2) Complexo de fusão de Novaferon com outras proteínas/polipeptídeos. A molécula Novaferon pode ser fundida recombinantemente a outras proteínas/polipeptídeos, tal como um fragmento da região constante de uma imunoglobulina (Fc) (104).

(3) Conjugação da proteína Novaferon. Por exemplo, a proteína Novaferon pode ser conjugada com polímeros não antigênicos, tais como polietileno glicol ou porções de polialquileno glicol relacionadas (105 a 108).

Em outras modalidades preferidas, um composto terapêutico poderia ser conjugado a um anticorpo, preferivelmente um anticorpo de

proteína Novaferon. O composto terapêutico pode ser um agente citotóxico. Neste método, os agentes citotóxicos podem ser direcionados, pela ligação do anticorpo conjugado para as moléculas de Novaferon, para o tecido ou células tumorais, destruindo e reduzindo assim o número de células afetadas para obter uma redução nos sintomas do câncer. Agentes citotóxicos incluem, mas não são limitados a, fármacos citotóxicos, toxinas ou fragmentos ativos de tais toxinas, e radioquímicos. Toxinas adequadas e seus fragmentos correspondentes incluem cadeia A de difteria, cadeia A de exotoxina, cadeia A da glicina, cadeia A da abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina e semelhantes.

Em uma modalidade preferida, a sequência de extensão completa, as sequências parciais, e/ou a sequência regulatória da sequência de polinucleotídeo que codifica Novaferon (SEQ ID No: 1) pode ser usada em administração relacionada com terapia gênica por qualquer versado na técnica. A aplicação antisense, baseada na sequência de polinucleotídeo codificante da proteína Novaferon (SEQ ID No: 1) também pode ser usada como terapia gênica (isto é, para incorporação no genoma) ou como composições antisense, conforme será observado por aqueles versados na técnica.

Em aplicações de terapia gênica, os genes são introduzidos nas células para se obter síntese *in vivo* das proteínas-alvo codificadas por estes genes. A terapia gênica convencional atinge efeitos terapêuticos sustentados por um único tratamento ou administração repetida de DNA ou mRNA terapeuticamente eficaz. Por outro lado, RNAs e DNAs antisense também podem ser usados como agentes terapêuticos para bloquear a expressão de certos genes *in vivo*. Já foi mostrado que oligonucleotídeos antisense curtos podem ser liberados dentro de células onde agem como inibidores (109).

Em uma modalidade preferida, a sequência de polinucleotídeo codificante de proteína Novaferon (SEQ ID No: 1), com extensão completa

ou parcial, pode ser usada como vacinas de DNA. Vacinas de DNA nu são geralmente conhecidas na técnica (110). Métodos para as aplicações do gene codificante de Novaferon (SEQ ID No: 1), de extensão completa ou parcial, copo vacinas de DNA, são bem conhecidos daqueles versados na técnica, e
 5 incluem, mas não são limitados a colocar o gene ou porção do gene de Novaferon sob o controle de um promotor para a expressão do comprimento total ou parcial da proteína Novaferon em humanos e/ou espécies não humanas.

Exemplos

10 Os seguintes exemplos servem para descrever mais completamente a maneira de usar a invenção acima descrita, assim como para descrever os melhores modos contemplados para realizar vários aspectos da invenção. É entendido que esses exemplos não servem de modo algum para limitar o verdadeiro escopo dessa invenção, mas de preferência são
 15 apresentados com propósitos ilustrativos. Todas as referências citadas aqui estão expressamente incorporadas por referência em sua totalidade.

Exemplo 1. Amplificação por PCR de genes de IFN- α humano a partir de cDNAs de leucócito humano

mRNA total foi extraído de leucócitos humanos do sangue
 20 periférico. A preparação de cDNA foi pré-formada usando o kit Advantage™ RT-for-PCR Kit (Clontech, Mountain View, CA, EUA) e um iniciador de síntese de cDNA (oligo dT18) de acordo com as recomendações do fabricante.

A amplificação de cDNAs de IFN- α humano foi feita pela
 25 tecnologia de PCR em um termociclador MJ PTC, usando as seguintes condições: 2,5 μ l de tampão de amplificação *pfx* 10x (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,75 μ l de dNTPs a 10 mM, 0,5 μ l de MgSO₄ a 25 mM, 0,25 μ l de *Platinum pfx DNA Polymerase* (2,5 U/ μ l; Invitrogen, Carlsbad, CA, US), 0,75 μ l de cDNA, 0,75 μ l de iniciador 5' (10 μ M; IFNaO5: 5'-TGGTGCTCAGCT

(A/G)CAAGTC-3'),(SEQ ID No:3), 0,75 µl de mistura de iniciador 3' (1,7 µM cada;

IFNaO3-1 : 5 '-AATC ATTTCC ATGTTG(A/G) ACC AG-3' (SEQ ID No:4);

IFNaO3-2: 5 '-AATCATTTCCCGGTTGTACCAG-S '(SEQ ID No:5);

IFNaO3-3: 5 '-AATCATTTCCATGTTGAAACAG-SXSEQ ID NO:6);

IFNaO3-4: 5 '-AATCATTTCAAGATGAGCCCAG-S-(SEQ ID NO:7);

IFNaO3-5: 5 '-AATGATTTTCATGTTGAACCAG-S-(SEQ ID NO:8);

IFNaO3-6: 5'-AATCATTT(C/G)(C/G)ATGTTGAACCAG-3"(SEQ ID No:9);

IFNaO3-7: S'-GATCATTTCCATGTTGAATGAG-SXSEQ ID NO: 10);
IFNaO3-8: 5'-GAGTCGTTTCTGTGTTGGATCAG-SXSEQ ID NO: 11).

Os produtos de PCR amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, removidos, purificados em gel e foram clonados no vetor pCRII-TOPO ou pCR-4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento automático foi realizado em uma mistura Prism Ready Reaction Dye Termination em um seqüenciador automático ABI (PE Applied Biosystems, CA, EUA).

Já que não foram encontrados insertos desejados para as sequências codificantes de IFNa6, IFNa7 e IFNa16 nos clones acima, os PCRs foram conduzidas novamente sob as condições acima com exceção dos iniciadores tipo-específicos. Para amplificação específica de IFNa6, os iniciadores 5' e 3' foram IFNaO5: 5'- TGGTGCTCAGCT(A/G)CAAGTC-3' (SEQ ID NO:3) e IFNaO3-8: 5' GAGTCGTTTCTGTGTTGGATCAG-3' (SEQ ID No:11), respectivamente. Para amplificação específica de IFNa7, os iniciadores 5' e 3' foram IFNa7UO: 5"- ATGCCCCTGTCCTTTTCTTTAC-3' (SEQ ID No: 12) e uma mistura de molaridade igual de IFNaO3-5 e IFNaO3-6, respectivamente. Para amplificação específica de IFNa16, os

iniciadores 5' e 3' usados foram IFNa7UO e IFNaO3-7: 5'-GATCATTTCATGTTGAATGAG-3' (SEQ ID No: 10). Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pCRII-TOPO ou pCR-4-TOPO e sequenciados como acima.

5 Todos os genes clonados de IFN-alfa Tipo I humano foram alinhados individualmente com as sequências de DNA do Genebank. Os números de acesso de nucleotídeos do GeneBank para esses genes referidos aqui são: NM_024013(IFN- α 1), NM_000605 (IFN- α 2), NM_010504 (IFN- α 4), NM_010505 (IFN- α 5), NM_008335 (IFN- α 6), NM_008334 (IFN- α 7),
10 NM_008336 (IFN- α 8), NM_002171 (IFN- α 10), NM_002172 (IFN- α 14), NM_002173 (IFN- α 16), NM_021268 (IFN- α 17), NM_002175 (IFN- α 21).

Exemplo 2. Construção de bibliotecas de embaralhamento de plasmídeos que carregam HuIFN Tipo I

15 Para construir plasmídeos carregando a sequência codificante de um dos IFN- α s Tipo I, 15 pares de oligonucleotídeos com sítios de restrição de BamHI e EcoRI foram sintetizados (Genentech, São Francisco do Sul, CA, EUA), baseados na região codificante de cDNA individual para proteínas IFN Tipo I humanas maduras. Os números de acesso de nucleotídeo do GeneBank para essas proteínas referidas aqui são: NM_024013 (IFN- α 1),
20 NM_000605 (IFN- α 2), NM_010504 (IFN- α 4), NM_010505 (IFN- α 5), NM_008335 (IFN- α 6), NM_008334 (IFN- α 7), NM_008336 (IFN- α 8), NM_002171 (IFN- α 10), NM_002172 (IFN- α 14), NM_002173 (IFN- α 16), NM_021268 (IFN- α 17), NM 002175 (IFN- α 21). Os iniciadores e plasmídeos
25 construídos no Exemplo 1 como moldes foram usados em uma PCR padronizada (111). Os produtos resultantes foram clivados com endonucleases de restrição (REs) BamHI e EcoRI e clonados no vetor de expressão de *E. coli* pBVB, que é um plasmídeo de expressão derivado de pBV220 (86) contendo um sítio de BamHI e um sítio de EcoRI em sua região de clonagem múltipla. Esses construtos finais foram todos verificados por

análise de sequência de DNA (PE Applied Biosystems, EUA).

Os fragmentos de DNA contendo a ORF de IFN foram amplificados por PCR usando um par de oligonucleotídeos, BVF4: 5'-AGGGCAGCATTCAAAGCAG-3' (SEQ ID No: 13) e BVR3: 5'-TCAGACCGCTTCTGCGTTCTG-3' (SEQ ID No: 14), e pelo uso de plasmídeos carregando HuIFN Tipo I previamente construídos. Os produtos resultantes foram misturados em quantidades iguais e submetidos à digestão por DNase I e ligação por PCR de acordo com o procedimento descrito por Stemmer (112).

Os produtos de PCR unidos foram ainda amplificados por um par de iniciadores internos: BVF: 5'-GAAGGCTTTGGGGTGTGTG-3' (SEQ ID No: 15) e BVR: 5'-AATCTTCTCTCATCCGC-3' (SEQ ID No: 16), seguido por digestão com BamHI e EcoRI e clonados de novo no vetor de expressão de *E. coli* pBVB clivado com as REs BamHI e EcoRI. Esses construtos finais foram todos verificados por análise de sequência de DNA. Os plasmídeos carregando os genes embaralhados de HuIFN- α foram transformados em células de *E. coli* competentes DH5 α .

Em todos os procedimentos de PCR acima, ou amplificação por PCR ou ligação por PCR, foi usada DNA polimerase regular (New England Biolab, MA, EUA) ao invés de DNA polimerase de alta fidelidade.

Exemplo 3. Seleção de bibliotecas de embaralhamento

Células de *E. coli* DH5 α recentemente transformadas foram cultivadas durante a noite em uma placa de LB a 37°C. Colônias isoladas foram individualmente selecionadas e inoculadas em 100 μ l de meio LB contendo 50 μ g/ml de ampicilina em placas de 96 poços. As colônias foram agitadas a 250 rpm a 30°C. Após serem cultivadas durante a noite, 10 μ l de culturas bacterianas foram inoculadas em duplicata em 100 μ l de meio LB contendo 50 μ g/ml de ampicilina em placas de 96 poços. As placas originais (assim chamadas de placas estoque) foram temporariamente armazenadas a

4°C. As células nas placas duplicadas foram cultivadas a 30°C até que OD600 atingiu 0,4 e foram então induzidas por 42°C. Após 4 horas de indução pelo calor, as culturas de bactéria foram diretamente levadas para um congelador a -80°C para iniciar o ciclo de congelamento-descongelamento. Após 2 ciclos de congelamento-descongelamento, a suspensão de bactérias/lisado foi diluída até a concentração desejada e exposta a cultura de célula de Daudi para um teste anti-proliferação (101) ou cultura de célula Wish para um teste antiviral (113).

Em cada ciclo de etapas de seleção, 20.000 colônias foram selecionadas primariamente e cerca de 100 colônias com as maiores atividades anti-proliferativa e antiviral foram selecionadas para teste de confirmação posterior. As culturas bacterianas selecionadas em placas-estoque foram estriadas sobre placas LB contendo 50µg/ml de ampicilina. Colônias isoladas foram cultivadas durante a noite a 37°C, retiradas e inoculadas em 1 ml de meio LB contendo 50 µg/ml de ampicilina em tubos de teste. As bactérias em tubos foram cultivadas durante a noite a 30°C com agitação a 250 rpm. Então, 40 µl de bactérias cultivadas foram inoculados em um de outro conjunto de tubos contendo 1 ml de LB com ampicilina (50 µg/ml). As amostras foram então submetidas às etapas de expressão por indução, coleta de cultura celular, tratamento com ciclos de congelamento e descongelamento e teste anti-proliferativo ou antiviral conforme descrito acima em relação às etapas de seleção primária.

Em cada ciclo das etapas de seleção, cerca de 20 colônias com a atividade anti-proliferativa e antiviral mais elevada foram escolhidas após teste de confirmação para fazer plasmídeos e seus insertos foram seqüenciados automaticamente. Os insertos tendo uma sequência de DNA única foram ainda amplificados com o uso de um par de iniciadores de PCR BVBF: 5'-ACCATGAAGGTGACGCTC-3' (SEQ ID No: 17).; e BVR: 5'-AATCTTCTCTCATCCGC-3' (SEQ ID No:16), que são sequências

flanqueadoras à montante e à jusante dos sítios de clonagem múltipla do vetor pBVB respectivamente. Os produtos de PCR amplificados foram usados no próximo ciclo de construção da biblioteca de embaralhamento.

5 Cinco ciclos de etapas de seleção foram realizados com base no aumento da atividade anti-proliferativa e da antiviral.

Exemplo 4. Expressão e purificação de proteína recombinante Novaferon em *E. coli*.

10 A proteína Novaferon (SEQ ID NO:2) foi expressa em *E. coli*. O quadro de leitura da SEQ ID NO:1 com a adição artificial do códon de iniciação ATG foi clonada no vetor induzível por temperatura pBVB sob o controle do promotor λ PRPL (114). O plasmídeo de expressão de Novaferon, pBVBNF, foi transformado em células DH5 α . Colônias isoladas foram retiradas individualmente e inoculadas em 2 ml de meio LB contendo 50 μ g/ml de ampicilina e incubadas a 30°C por 8 horas. Depois, os 2 ml das

15 bactérias cultivadas foram ainda incubados com 50 ml de meio contendo 50 μ g/ml de ampicilina durante a noite a 30°C com agitação. Na manhã seguinte, as bactérias cultivadas durante a noite foram semeadas em uma proporção de 1:10 ~ 1:20 em um grande volume de meio LB contendo 50 μ g/ml de ampicilina e incubadas a 30°C com agitação. Quando as culturas

20 atingiram a fase semi-logarítmica de crescimento ($A_{550} = 0,5$ a $0,6$) a temperatura de incubação foi rapidamente elevada para 42°C e mantida por 4 horas a fim de induzir a expressão de Novaferon. Após 4 horas de indução pelo calor, as células bacterianas foram centrifugadas e lavadas com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM) 3 vezes e

25 então armazenadas a -80°C antes de proceder a purificação.

A maioria das moléculas da proteína Novaferon eram solúveis no sistema de produção de *E. coli* descrito aqui, embora elas fossem superexpressas no citoplasma. Assim, as células foram rompidas por digestão com lisozima em tampão de lise Cell Lysis (Tris-Cl (pH 8.0), EDTA 1 mM

(pH 8.0), NaCl 100 mM (115). O lisado foi ainda sonificado a fim de romper as células intactas remanescentes e moléculas ligadas de DNA. Então, o lisado foi centrifugado.

As moléculas da proteína solúvel Novaferon nos sobrenadantes foram sequencialmente purificadas por cromatografia hidrofóbica, de troca de íon e filtração em gel. Primeiro, os sobrenadantes foram carregados e passados através da coluna Phenyl Sepharose 6 Fast Flow Column (GE Healthcare, EUA). A seguir, as frações contendo a proteína Novaferon foram aplicadas à coluna POROS 50 D (Applied Biosystems, EUA). Em terceiro lugar, as frações contendo as moléculas de Novaferon foram submetidas à purificação por POROS 50 HSColumn (Applied Biosystems, EUA) e, finalmente, as moléculas de Novaferon coletadas foram purificadas ainda por HiLoad 26/100 Superdex 75pg (Amersham, EUA).

A pureza da proteína Novaferon pura foi verificada por análise com SDS-PAGE 15%. A proteína recombinante Novaferon pura mostrou-se como uma única banda com um peso molecular (MW) de 19 a 20 KDa. A análise de espectrometria de massa indicou que a pureza da molécula de Novaferon purificada era de >98% e o peso molecular era de 19313 dalton, que era idêntico ao peso molecular previsto de 19315 dalton de sua sequência de aminoácidos.

Exemplo 5. Expressão e purificação de HuIFN- α 2b recombinante em *E. coli*

O plasmídeo de expressão de HuIFN- α 2b, pBV2b, contendo a região codificante de cDNA para a proteína madura de HuIFN- α 2b (número de acesso de nucleotídeo do GeneBank NM 000605), que está sob o controle do promotor λ PRPL induzível pelo calor. A expressão de HuIFN- α 2b foi realizada seguindo os protocolos descritos por Joseph S e David WR (116).

O plasmídeo de expressão, pBV2bF, foi transformado em células DH5- α . Colônias isoladas foram retiradas individualmente e

inoculadas em 2 ml de meio LB contendo 50 µg/ml de ampicilina e incubadas a 30°C por 8 horas. Então, os 2 ml de bactérias cultivadas foram ainda incubados com 50 ml de meio contendo 50 µg/ml de ampicilina durante a noite a 30°C com agitação. Na manhã seguinte, a cultura de bactérias foi
5 semeada em uma proporção de 1:10 ~ 1:20 em um grande volume de meio LB contendo 50 µg/ml de ampicilina e incubadas a 30°C com agitação. Quando as culturas atingiram a fase semi-logarítmica de crescimento ($A_{550} = 0,5-0,6$) a temperatura de incubação foi rapidamente elevada para 42°C e mantida por 4 horas a fim de induzir a expressão de HuIFN- α 2b. Após 4 horas
10 de indução pelo calor, as células bacterianas foram centrifugadas e lavadas com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM) 3 vezes e então armazenadas a -80°C antes de proceder a purificação.

A proteína HuIFN- α 2b era expressa insolúvelmente no sistema de expressão de *E. coli* descrito aqui e assim, os procedimentos de
15 recuperação do corpo de inclusão e lavagem foram conduzidos de acordo com os protocolos descritos em Molecular Cloning (115). Resumidamente, as células bacterianas coletadas foram re-suspensas em tampão Cell Lysis I (Tris-Cl (pH 8.0), EDTA 1 mM (pH 8.0), NaCl 100 mM) e lisadas com lisozima e sonicação. Os corpos de inclusão foram lavados 3 vezes com
20 tampão Cell Lysis II gelado (tampão de lise celular I suplementado com Triton X-100 a 0,5% (v/v)).

Os corpos de inclusão recuperados foram rompidos pela suspensão em guanidina 7N em temperatura ambiente com agitação por 4 horas. Após uma centrifugação por 15 minutos a 4°C, a proteína desnaturada
25 foi re-enovelada em tampão Borex 0,15 M pH 9,5 por 48 horas a 4°C. O pH foi ajustado para 7,4 com HCl na última etapa de re-enovelamento.

A solução contendo HuIFN- α 2b re-enovelada foi então purificada por cromatografia de troca de íon, hidrofóbica e filtração em gel. Primeiro, a solução foi aplicada e passada através da coluna Phenyl Sepharose

6 Fast Flow Column (GE Healthcare, EUA). A seguir, as frações contendo HuIFN- α 2b foram aplicadas a POROS 50 D Column (Applied Biosystems, EUA). Em terceiro lugar, as frações contendo HuIFN- α 2b foram submetidas à purificação por POROS 50 HSColumn (Applied Biosystems, EUA).
5 Finalmente, as moléculas de HuIFN- α 2b coletadas foram purificadas ainda por HiLoad 26/100 Superdex 75pg (Amersham, EUA). A proteína HuIFN- α 2b pura mostrou-se como uma única banda na análise com SDS-PAGE 15% e sua pureza da era >98% como confirmada por Espectrometria de Massa.

Exemplo 6. Determinação da atividade antiviral de

10 Novaferon

A atividade antiviral foi determinada usando o sistema WISH-VSV como descrito nos protocolos clássicos descritos por Armstrong JA (113). No primeiro dia, células WISH (ATCC, No. de catálogo CCL 25) foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 14.000
15 células/poço e incubadas a 37°C. 24 horas mais tarde, Novaferon diluída seriadamente 2 vezes, HuIFN- α 2b, padrões internacionais de IFN humano da OMS ou meio de cultura puro foram adicionados em cada poço e incubados a 37°C por outras 24 horas. No terceiro dia, o meio foi removido e substituído por meio contendo 1000 PFU de Vírus da Estomatite Vesicular (VSV, ATCC,
20 No. de catálogo VR-1421). As células foram incubadas de novo por 24 horas a 37°C e foram então lavadas com 0,85% de NaCl para remover as células mortas. Depois, as placas da cultura foram imersas em solução fixadora de corante (cristal violeta 0,5%, formalina 5% (V/V), etanol 50% (V/V) e NaCl 0,85%) por 1 hora. A solução fixadora de corante foi então decantada e as
25 microplacas foram enxaguadas abundantemente com água corrente e deixadas secar. As células coradas foram dissolvidas por 0,2 ml de 2-metoxietanol. As placas foram lidas a 550 nm em um Model Opsys MR (Thermo Labsystems, EUA) para o bioensaio de cristal violeta.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as

amostras de Novaferon e HuIFN- α 2b foram testadas na mesma placa. As atividades anti-virais de Novaferon e HuIFN- α 2b preparadas aqui foram testadas em paralelo e as unidades anti-virais (unidade internacional ou IU) foram determinadas com relação aos modelos internacionais da OMS, 94/786 (rHuIFN- α consenso) e 95/650 (rHuIFN- α 2a) que foram adquiridos do National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, EUA).

A atividade antiviral medida da proteína Novaferon purificada contra VSV em WISH foi de $2,5 \times 10^9$ IU/mg enquanto que a atividade antiviral de HuIFN- α 2b foi de $2,0 \times 10^8$ IU/mg. Esses dados indicam que a atividade antiviral da proteína Novaferon é cerca de 12,5 vezes mais forte do que a de HuIFN- α 2b.

Exemplo 7. Atividade anti-proliferativa de Novaferon

O ensaio de atividade anti-proliferativa foi realizado basicamente conforme descrito por Evinger e Pestka (101).

A. Cultura celular de linhagens celulares tumorais humanas

As linhagens celulares tumorais humanas foram adquiridas de diferentes organizações (Tabela 1, abaixo), especialmente, ATCC (American Type Culture Collection, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, EUA), DSMZ (German National Resource Centre for Biological Material, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemanha), JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources-Cell Bank, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japão).

Tabela 1. Linhagens Celulares de Tumor Humano

Linhagens celulares	Tumores	Códigos	Organizações*
A-375	Melanoma	CRL1619	ATCC
IGR-1	Melanoma	Acc 236	DSMZ
IGR-37	Melanoma	Acc 237	DSMZ
IPC-298	Melanoma	Acc 251	DSMZ
HCT-8	Adenocarcinoma colorretal	CCl-244	ATCC
SW1116	Adenocarcinoma colorretal	CCL-233	ATCC
LS180	Adenocarcinoma colorretal	CL-187	ATCC

DLD-1	Adenocarcinoma colorretal	CCL-221	ATCC
LS 174T	Adenocarcinoma colorretal	CL-188	ATCC
Hep G2	Carcinoma hepatocelular	HB-8065	ATCC
Hep 3B	Carcinoma hepatocelular	HB-8064	ATCC
HuH-7	Hepatoma	0403	JCRB
PLC/PRF/5	Hepatoma	CRL-8024	ATCC
HL 60(S)	Linfocítica	0163	JCRB
Daudi	Linfoma de Burkitt	CCL-213	DSMZ
L-428	Linfoma de Hodgkin	Acc 197	DSMZ
DU 145	Carcinoma de próstata	HTB-81	ATCC
PC-3	Carcinoma de próstata	Acc 465	DSMZ
MKN-1	Adenocarcinoma gástrico	0252	JCRB
KYSE 30	Carcinoma de esôfago	0188	JCRB
A 549	Carcinoma de pulmão	CCL-185	ATCC
HeLa	Adenocarcinoma de cérvix	CCL-2	ATCC
C-33A	Carcinoma de cérvix	HTB-31	ATCC

* DSMZ: German National Resource Centre for Biological Material (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) Alemanha

ATCC: American Type Culture Collection, EUA

JCRB: Japanese Collection of Research Bioresources-Cell Bank, Japão

Todas as células usadas no teste de atividade anti-proliferativa foram cultivadas a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram cultivadas de acordo com o manual de cultivo de cada célula, em meio de crescimento basal, tal como DMEM, MEM, F12K e 1640 ou 1640 mais F 12 (todos da Gibco BRL, EUA), suplementados com 5 a 20% de soro fetal bovino FBS inativado pelo calor da Gibco BRL, EUA. O meio de crescimento basal para cada linhagem celular está listado na Tabela 2 abaixo. Todas as linhagens celulares foram examinadas diariamente em placas de cultura sob um microscópio invertido. As células foram coletadas e usadas para experimentos na sua fase de crescimento logarítmico com as viabilidades excedendo 90% conforme determinado por exclusão com corante azul de trypan. As contagens e viabilidades celulares foram examinadas em um hematocitômetro padrão.

Tabela 2. Métodos de Cultivo e de Medida de Linhagens Celulares de Tumor Humano

Linhagens celulares	Meio de Cultura	Células/poço	Métodos de medida
IGR-1	DMEM	5000	bioensaio com cristal violeta
IGR-37	DMEM	2000	bioensaio com cristal violeta
IPC-298	1640	2000	bioensaio com cristal violeta

HCT-8	1640	500	bioensaio com cristal violeta
LS 180	MEM	3000	bioensaio com cristal violeta
DLD-1	1640	1500	bioensaio com cristal violeta
Hep G2	MEM	1000	bioensaio com cristal violeta
Hep 3B	MEM	800	bioensaio com cristal violeta
HuH-7	DMEM	4000	bioensaio com cristal violeta
PLC/PRF/5	MEM	6000	bioensaio com cristal violeta
KYSE 30	1640+F12	1000	bioensaio com cristal violeta
DU 145	MEM	1000	bioensaio com cristal violeta
PC-3	1640	2000	bioensaio com cristal violeta
MKN-1	1640	2000	bioensaio com cristal violeta
A 549	F12K	400	bioensaio com cristal violeta
SW1116	1640	1000	bioensaio com cristal violeta
LS 174T	MEM	4000	bioensaio com cristal violeta
HeLa	MEM	500	bioensaio com cristal violeta
C-33A	MEM	1000	bioensaio com cristal violeta
A-375	DMEM	200	bioensaio com cristal violeta
HL-60(S)	1640	800	contagem celular direta
Daudi	1640	400	contagem celular direta
L-428	1640	800	contagem celular direta

B. Procedimento para ensaio anti-proliferativo

As linhagens celulares em fase logarítmica de crescimento foram cuidadosamente suspensas em meio aquecido (36°C) em uma densidade de 2×10^3 a 6×10^4 células/ml (variando com a linhagem celular, vide Tabela 2). 100 µl de suspensão celular foram semeadas em cada poço de uma placa de 96 poços, seguido pela incubação por 6 a 8 horas a 37°C. Então, volumes iguais (100 µl) de Novaferon ou HuIFN- α 2b diluídos em meio de cultura foram adicionados aos poços em triplicata. As placas foram agitadas gentilmente por 4 a 5 segundos para misturar os conteúdos e incubadas à 37°C por 6 dias. As amostras de Novaferon e HuIFN- α 2b foram testadas na mesma placa a fim de garantir a comparabilidade.

Dois métodos foram usados para determinar os números de células em um poço de célula e para calcular as atividades anti-proliferativas de Novaferon e HuIFN- α 2b de acordo com os números de células.

Um método de contagem celular direta foi usado para determinar o número de células da suspensão celular. Após 6 dias de cultura, as culturas de suspensão celular foram diluídas com azul de trypan (concentração final: 0,02%) e o número de células foi diretamente contado

usando um hematocítômetro.

O método do bioensaio com cristal violeta foi usado para determinar o número de células das células aderentes (93). Após 6 dias de cultura, as células mortas foram removidas pela pipetagem de PBS para cima e para baixo nas culturas celulares. Depois, os poços foram preenchidos com solução fixadora de corante para corar as células vivas por 1 hora. A solução fixadora de corante continha cristal violeta 0,5%, formalina 5% (V/V), etanol 50% (V/V) e NaCl 0,85% em água destilada. Então, as microplacas foram enxaguadas abundantemente com água morna e deixadas secar. As células coradas foram dissolvidas em 0,2 ml de 2-metoxietanol. A densidade óptica a 550 nm (OD_{550}) (Modelo de leitor de placa Opsys, Thermo Labsystems, EUA) foi medida e usada como o indicador relativo de número de células.

A taxa de inibição do crescimento foi calculada pela seguinte fórmula: taxa de inibição % = $(1 - (E - B) / (C - B)) \times 100$, onde E era o número de células ou o valor da OD_{550} nos poços tratados com Novaferon ou HuIFN- $\alpha 2b$ no dia 6; B era o número de células ou OD_{550} nos poços não tratados no dia 6.

A taxa de inibição foi expressa em conjunto com as concentrações do composto. A IC_{50} de Novaferon ou HuIFN- $\alpha 2b$ foi estimada usando uma faixa de concentrações da amostra. Os dados foram ajustados numa curva Sigmoidal (117) com inclinação da curva um: $Y = \min + (\text{Máx} - \min) / 1 + 10^{(IC_{50} - X)}$ onde X é o log das concentrações de fármaco; Y é a taxa de inibição; Mín ou Máx é o platô da taxa de inibição mínima ou máxima. A IC_{50} de vários compostos contra um alvo em particular pode ser comparada, onde uma IC_{50} muito pequena indica um composto mais potente.

As concentrações de Novaferon e HuIFN- $\alpha 2b$ e as taxas correspondentes de inibição do crescimento celular para a linhagem celular Daudi são apresentadas na Fig. 4. Baseado nesses dados, a IC_{50} de Novaferon e HuIFN- $\alpha 2b$ para inibir o crescimento da célula Daudi foi calculada como 0,0174 pmol e 6,9550 pmol. Então, a IC_{50} de Novaferon é cerca de 1/400

daquela de HuIFN- α 2b, representando um aumento de aproximadamente 400 vezes da potencia anti-proliferativa de Novaferon em comparação com HuIFN- α 2b.

As atividades anti-proliferativas de Novaferon foram avaliadas e comparadas com aquelas de HuIFN- α 2b em 23 linhagens de célula de tumor, incluindo 4 linhagens celulares derivadas de melanoma (A-375, IGR-1, IGR-37, IPC-298), 5 linhagens celulares de adenocarcinoma colorretal (HCT-8, SW1116, LS 180, DLD-1, LS174T), 4 linhagens celulares de câncer de fígado (Hep G2, Hep 3B, HuH-7, PLC/PRF/5), 3 linhagens celulares de linfoma (HL-60(S), Daudi, L-428), 2 linhagens celulares de carcinoma de próstata (DU 145, PC-3), 2 linhagens celulares de câncer cervical (HeLa, C-33A), 1 linhagem celular de adenocarcinoma gástrico (MKN 1), 1 linhagem celular de câncer de pulmão (A 549) e uma linhagem celular de câncer de esôfago (KYSE 30). Novaferon exibiu atividades anti-proliferativas muito mais fortes do que aquelas de HuIFN- α 2b contra todas as linhagens celulares de câncer testadas. A extensão do aumento de potência variou nas diferentes linhagens celulares de câncer e variou entre 16 a 1134 vezes (Tabela 3, abaixo).

Tabela 3. Valores de IC₅₀ de Novaferon e HuIFN- α 2b e o número de vezes de aumento da inibição da célula de tumor por Novaferon em relação a HuIFN- α 2b

Linhagens celulares	IC ₅₀ (pmol)		Número de vezes Novaferon/HuIFN- α 2b
	HuIFN- α 2b	Novaferon	
PLC/PRF/5	0,0407	0,0025	16
A549	4,27	0,2202	19
DU 145	0,1319	0,0036	36
HepG2	0,1718	0,004	43
HuH-7	0,1474	0,0026	58
Hep3B	4,3934	0,0758	58
IPC-298	0,0516	0,0007	70
LS174T	0,0165	0,0002	74
IGR-37	0,6017	0,0055	109
PC-3	1,8777	0,0146	128
HeLa	0,2364	0,0017	141
C-33A	2,5242	0,0176	143
MKN 1	0,233	0,0011	207

HCT-8	2,9479	0,0139	212
SW 1116	0,2278	0,001	222
DLD-I	0,3977	0,0014	282
HL-60(S)	0,5855	0,0019	306
LS 180	0,7579	0,0022	350
Daudi	6,955	0,0174	400
KYSE 30	18,0134	0,0264	683
A-375	1,4134	0,0019	733
IGR-I	6,6718	0,0076	876
L-428	17,2789	0,0152	1134

Exemplo 8. Experimentos em modelo de tumor *in vivo*

A. Cultura celular e modelos de xenoenxerto de tumor humano *in vivo*

A linhagem celular de câncer de cólon (LS 180), linhagem celular de melanoma (A-375) e a linhagem celular de câncer de fígado (Hep G2) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). A linhagem celular de câncer de próstata (PC-3) foi obtida do German National Resource Centre for Biological Material (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen, Alemanha). A linhagem celular linfocítica (HL 60(S)) foi adquirida do Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB, Japão). Todas as células foram cultivadas de acordo com suas instruções (vide Tabela 1). Resumidamente, LS 180 e Hep G2 foram cultivadas em meio MEM. A-375 foi cultivada em DMEM, Ambos os meios foram suplementados com soro fetal bovino 10% (FBS), glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, aminoácidos não essenciais 0,1 mM e piruvato de sódio 1,0 mM. Células PC-3 e HL 60(S) foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com FBS 10%, 100 U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina. Todas as células foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

Modelos de xenoenxerto de câncer humano foram estabelecidos usando os métodos descritos por Beverly et al (118). Células de câncer que crescem em fase log foram coletadas de placas de cultura de tecido, lavadas e re-suspensas em salina tamponada com fosfato (PBS, pH

7.5, 20 mM). Foram gerados xenoenxertos de tumor subcutâneo em camundongos Balb/c nus atímicos pela injeção de 6×10^6 células/0,3ml (PC-3, HepG2), 4×10^6 células/0,3ml (LS 180), 2×10^7 células/0,3ml (HL 60(s)) ou 8×10^6 células/0,3ml (A-375), subcutaneamente em ambos os lados da região do flanco. Para cada modelo de tumor *in vivo*, no dia 6 após a inoculação da célula tumoral, camundongos apresentando o tumor (volume de tumor é de cerca de 100 mm^3) foram divididos em 7 ou 8 grupos, aleatoriamente, com número igual de animais em cada grupo e o tratamento foi começado.

Novaferon e HuIFN- α 2b foram formulados com solução de PBS. As injeções diárias de PBS sozinho, e várias doses de Novaferon ou HuIFN- α 2b duraram 30 dias no total (PC-3, HepG2, A-375), 28 dias (LS 180) ou 21 dias (HL 60(s)) desde o dia do agrupamento dos camundongos. Para o tratamento com 5-FU, 30 mg/kg de 5-FU foram administrados i.v. uma vez a cada dois dias para um total de 5 vezes. Os grupos e as doses de tratamento estão resumidos abaixo:

Grupo 1 (Controle): PBS diariamente.

Grupo 2 (dose baixa de Novaferon): 1,25 $\mu\text{g/kg}$ diariamente.

Grupo 3 (dose média de Novaferon): 12,5 $\mu\text{g/kg}$ diariamente.

Grupo 4 (dose alta de Novaferon): 125 $\mu\text{g/kg}$ diariamente.

Grupo 5 (dose baixa de HuIFN- α 2b): 1,25 $\mu\text{g/kg}$ diariamente.

Grupo 6 (dose média de HuIFN- α 2b): 12,5 $\mu\text{g/kg}$ diariamente.

Grupo 7 (dose alta de HuIFN- α 2b): 125 $\mu\text{g/kg}$ diariamente.

Grupo 8 (5-FU): 30 mg/kg, administração i.v. uma vez a cada

2 dias por 5 vezes.

Uma vez começado o tratamento, os tumores foram medidos com um calibrador uma vez por semana. Os volumes do tumor foram calculados usando a seguinte fórmula: $\text{volume} = 0.5 \times (\text{largura})^2 \times (\text{comprimento})$. Os camundongos foram sacrificados no dia da

descontinuação do tratamento (dia 30 após o início do tratamento). Os tumores sólidos foram isolados, fotografados e medidos.

A taxa de inibição do crescimento foi calculada usando a seguinte fórmula: taxa inibitória = $[1 - T/C] \times 100\%$, onde T é o peso médio do tumor nos grupos tratados com Novaferon, HuIFN- $\alpha 2b$ ou 5-FU; C é o peso médio do tumor no grupo de controle após o tratamento.

B. Modelo de xenoenxerto de câncer de próstata humano

Xenoenxertos de PC-3 de câncer de próstata foram tratados com injeção s.c. de 1,25, 12,5 e 125 $\mu\text{g/kg}$ de Novaferon por 30 dias. Novaferon exibiu forte inibição, dependente da dose, do crescimento do tumor de PC-3 ($p < 0,05$). Como mostrado na Fig. 5 e na Tabela 4 abaixo, o crescimento do tumor de PC-3 nos grupos tratados com Novaferon foi acentuadamente suprimido quando comparado com o grupo de controle em tratamento com PBS. Por exemplo, o peso médio da massa tumoral do xenoenxerto de PC-3 no grupo tratado com Novaferon (125 $\mu\text{g/kg}$), $0,091 \pm 0,081$ g, estava significativamente reduzido, quando comparado com animais de controle, $1,948 \pm 0,567$ g ($P < 0,001$) (Tabela 4). Em outras palavras, o tratamento de 30 dias com 125 $\mu\text{g/kg}$ obteve 95,3% de inibição do crescimento do tumor de PC-3 (Tabela 4).

Tabela 4. Peso do tumor e taxas de inibição do crescimento de xenoenxertos de PC-3 de câncer de próstata humano tratados com Novaferon e HuIFN- $\alpha 2b$ (n=10)

Grupo	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	Peso do tumor (média $\pm$ SD)	Taxa de Inibição (%)
Controle	-	$1,948 \pm 0,567$	-
Dosagem baixa de Novaferon	1,25	$1,266 \pm 0,457^*$	35,0
Dosagem média de Novaferon	12,5	$0,759 \pm 0,574^{***}$	61,0
Dosagem alta de Novaferon	125	$0,091 \pm 0,081^{***} @@@$	95,3
Dosagem baixa de HuIFN- $\alpha 2b$	1,25	$1,284 \pm 0,862$	34,1
Dosagem média de HuIFN- $\alpha 2b$	12,5	$0,790 \pm 0,391^{***}$	59,4
Dosagem alta de HuIFN- $\alpha 2b$	125	$0,476 \pm 0,271^{***}$	75,6

Nota: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$: comparado ao grupo de controle, @@@ $p < 0,001$: comparado ao grupo com dose alta de HuIFN- $\alpha 2b$

Camundongos Balb/c nus foram tratados diariamente com

injeção s.c. de Novaferon (1,25µg/kg, 12,5µg/kg ou 125µg/kg) por 30 dias depois que 6×10^6 células PC-3 vivas foram introduzidas subcutaneamente nos camundongos. Os resultados foram expressos como média de volume do tumor (mm^3). A Fig. 5 mostrou que todas as três doses de Novaferon exibiram

5 inibição, dependente da dose, do crescimento de tumor de PC-3 em comparação com o grupo de controle com PBS ($p < 0,05$). 125 µg/kg de Novaferon induziram inibição mais acentuada ou quase completa do crescimento de tumor de PC-3 do que aquela de HuIFN- μ 2b na mesma dose (95,3% vs 75,6%, $p < 0,01$) (Tabela 4).

10 É interessante observar que o tratamento mais prolongado com Novaferon ou HuIFN- α 2b resultou em diferenças muito maiores na inibição de crescimento do tumor nos grupos tratados com dose alta (125µg/kg). O volume médio da massa de tumor de PC-3 no grupo tratado com Novaferon era de $107,9 \pm 68,7 \text{ mm}^3$ contra $620,7 \pm 296,6 \text{ mm}^3$ no grupo tratado com

15 HuIFN- α 2b dia 28 ($P < 0,01$) e $122,1 \pm 100,7 \text{ mm}^3$ contra $691,9 \pm 428,3 \text{ mm}^3$ no dia 30 ($P < 0,01$). Esse também foi o caso quando o peso médio do tumor foi considerado após o término da observação ($0,091 \pm 0,081 \text{ g}$ no grupo com dose alta de Novaferon contra $0,476 \pm 0,271 \text{ gramas}$ no grupo com dosagem alta de HuIFN- α 2b, $P < 0,001$). Isso sugeriu que o tratamento prolongado com

20 Novaferon nessa dose pode exibir inibição melhor ou completa do crescimento de tumor de PC-3 nesse modelo de xenoenxerto.

C. Modelo de xenoenxerto de câncer de fígado humano

A atividade anti-tumoral de Novaferon *in vivo* também foi avaliada no modelo de xenoenxerto de câncer de fígado Hep G2. Novaferon

25 exibiu inibição eficaz, dependente da dose, do crescimento de tumor de Hep G2 comparado com o grupo de controle ($P < 0,001$). Os volumes tumorais médios nos grupos tratados com Novaferon (injeção s.c. diariamente de 1,25, 12,5 ou 125 µg/kg por 30 dias) foram $783,2 \pm 270,0$, $459,3 \pm 414,3$, e $104,6 \pm 56,5 \text{ mm}^3$, respectivamente, em comparação com $2125,8 \pm 743,1 \text{ mm}^3$ no

grupo de controle com PBS. O tratamento de 30 dias com 125 µg/kg de Novaferon obteve a inibição mais alta de Hep G2 (96,6%), o que foi significativamente melhor do que com 125 µg/kg de HuIFN-α2b (89,2%, $P<0.01$). O tratamento prolongado com Novaferon nessa dose mostrou a

5 tendência de inibição até melhor ou completa. O peso médio do tumor na final do período de observação era de $0,074 \pm 0,083$ g com 125 µg/kg no grupo tratado com Novaferon, significativamente menor do que aquele com 125 µg/kg do grupo tratado com HuIFN-α2b ($0,235 \pm 0,199$ gramas, $P<0,001$) (Tabela 5, abaixo).

10 Camundongos Balb/c nus foram tratados com injeção s.c. diariamente de Novaferon (1,25µg/kg, 12,5µg/kg e 125µg/kg) por 30 dias após 6×10^6 células Hep G2 vivas terem sido introduzidas subcutaneamente nos camundongos. Os resultados foram expressos como volume médio do tumor (mm^3). A Fig. 6 mostrou que todas

15 as três doses de Novaferon exibiram inibição dependente da dose do crescimento de tumor de Hep G2 em comparação com o grupo de controle com PBS ($P<0,001$). 125 µg/kg de Novaferon induziram inibição muito mais acentuada, ou quase completa, do crescimento de tumor de Hep G2 do que aquela de HuIFN-α2b na mesma dose (96,6% vs 89,2%, $P<0,05$).

20 (Tabela 5)

Tabela 5. Peso do tumor e taxas de inibição do crescimento de xenoinxertos de célula Hep G2 de câncer de fígado humano tratados com Novaferon e HuIFN-α2b (n=10)

Grupo	Dose (µg/kg)	Peso do tumor (média ±SD)	Taxa de Inibição (%)
Controle	-	$2,179 \pm 0,578$	-
Dosagem baixa de Novaferon	1,25	$0,797 \pm 0,397^{***}$	63,4
Dosagem média de Novaferon	12,5	$0,321 \pm 0,300^{***}$	85,3
Dosagem alta de Novaferon	125	$0,074 \pm 0,083^{***}@$	96,6
Dosagem baixa de HuIFN-α2b	1,25	$1,070 \pm 0,587^{**}$	50,9
Dosagem média de HuIFN-α2b	12,5	$0,531 \pm 0,287^{***}$	75,6
Dosagem alta de HuIFN-α2b	125	$0,234 \pm 0,199^{***}$	89,2

Nota: ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, comparado ao grupo de controle. @ $p<0,01$ comparado com o grupo com alta dosagem de HuIFN-α2b

D. Modelo de xenoenxerto de melanoma humano

A atividade anti-tumor de Novaferon *in vivo* foi avaliada ainda no modelo de xenoenxerto de melanoma maligno A-375. A linhagem celular A-375 (Número ATCC: CL 1619) era derivada de um tumor sólido maligno humano. Novaferon exibiu inibição eficaz, dependente da dose, do crescimento de tumor de A-375 comparado com o grupo de controle ($P<0,001$). As taxas de inibição nos grupos tratados com Novaferon (injeção s.c. diariamente de 1,25, 12,5 ou 125µg/kg por 28 dias) foram de 40,1%, 75,0% e 82,8%, respectivamente, em comparação com o grupo de controle com PBS ($P<0,001$) (Tabela 6, abaixo). O tratamento de 30 dias com 125µg/kg de Novaferon obteve a inibição mais alta de A-375 (82,8%), o que foi significativamente melhor do que aquela de 125µg/kg de HuIFN- α 2b (69,9%, $P<0,001$).

De forma interessante, Novaferon exibiu inibição mais eficaz do crescimento de melanoma de célula A-375 do que o agente quimioterapêutico, 5-FU (Tabela 6). No dia 30, por exemplo, os pesos médios do tumor nos grupos tratados com 12,5 µg/kg ou 125 µg/kg de Novaferon eram $0,763 \pm 0,187$ ($P<0,01$) e $0,527 \pm 0,149$ ($P<0,001$) gramas, enquanto que o peso médio do tumor do grupo tratado com 5-FU, 30 mg/kg, era de $1,004 \pm 0,105$ gramas (Tabela 6). Isso indica que Novaferon pode ser mais eficaz para o tratamento de melanoma humano A-375 do que 5-FU.

Camundongos Balb/c nus foram tratados com a injeção s.c. de Novaferon diariamente (1,25µg/kg, 12,5µg/kg e 125µg/kg) por 28 dias após 8×10^6 células A-375 serem introduzidas subcutaneamente nos camundongos. Os resultados são expressos como média do volume do tumor (mm³). A Fig. 7 mostrou que todas as três doses de Novaferon exibiram inibição dependente da dose do crescimento de tumor de A-375 em comparação com o grupo de controle com PBS ($P<0,001$). 125µg/kg de Novaferon induziram inibição do

Após o tratamento de 28 dias, 12,5 µg/kg de Novaferon inibiram o crescimento de xenoinxertos de câncer com LS 180 similarmente a 5-FU (30 mg/kg) em termos de pesos médios do tumor ($0,815 \pm 0,221$ gramas vs $0,758 \pm 0,227$ gramas). 125µg/kg de Novaferon inibiram o crescimento do tumor de LS 180 significativamente melhor do que 30mg/kg de 5-FU, (92,5% vs 81,8%, $P<0,001$) (Tabela 7 e Fig 8). Essas observações foram extremamente interessantes, considerando a rotina de aplicação clínica de 5-FU na quimioterapia padronizada para pacientes com câncer de cólon. A melhor supressão por Novaferon do crescimento do tumor LS 180 em modelo animal indica que Novaferon tem potencial para funcionar como um agente eficaz anti-câncer do cólon em um tratamento clínico.

Camundongos Balb/c nus foram tratados com uma injeção de Novaferon diariamente (1,25µg/kg, 12,5µg/kg e 125µg/kg) por 28 dias após 4×10^6 células LS 180 serem introduzidas subcutaneamente nos camundongos. Os resultados foram expressos como volume médio do tumor (mm^3). A Fig. 8 mostrou que todas as três doses de Novaferon exibiram inibição dependente da dose do crescimento do tumor de LS 180 em comparação com o grupo de controle com PBS ($P<0,001$). 125µg/kg de Novaferon induziram inibição do crescimento do tumor LS 180 mais forte do que aquela por HuIFN- $\alpha 2b$ na mesma dose (92,5% vs 82,3%, $P<0,001$) (Tabela 7). Ambas as doses de 1,25µg/kg e 12,5µg/kg de Novaferon obtiveram supressão similar (75,0% e 80,5%, respectivamente) do crescimento do tumor em comparação com 5-FU (81,8%) (Tabela 7, Figura 8). Entretanto, 125g µ g/kg de Novaferon exibiram inibição muito melhor do crescimento de tumor LS 180 do que aquela com 5-FU (92,5% vs 81,8%, $P<0,001$).

Tabela 7. Peso do tumor e taxas de inibição do crescimento de xenoinxertos de célula LS 180 de câncer de cólon humano tratados com Novaferon e HuIFN- $\alpha 2b$ ($n=10$)

Grupo	Dose (µg/kg)	Peso do tumor ($X \pm SD$)	Taxa de Inibição (%)
Controle	-	$4,170 \pm 3,409$	-

Dosagem baixa de Novaferon	1,25	1,043 ± 0,433***	75,0
Dosagem média de Novaferon	12,5	0,815 ± 0,221***	80,5
Dosagem alta de Novaferon	125	0,314±0,086***&&&@@@	92,5
Dosagem baixa de HuIFN- α 2b	1,25	1,225 ± 0,565***	70,6
Dosagem média de HuIFN- α 2b	12,5	1,076 ± 0,442***	74,2
Dosagem alta de HuIFN- α 2b	125	0,740 ± 0,310***	82,3
5-FU	30.000	0,758 ± 0,227***	81,8

Nota: *** $p < 0,001$, comparado ao grupo de controle; @@@ $p < 0,001$, comparado com dosagem alta de HuIFN- α 2b; &&& $p < 0,001$ comparado com o grupo de 5-FU

F. Modelo de xenoenxerto de leucemia humana

A atividade anti-tumoral de Novaferon *in vivo* também foi avaliada no modelo de xenoenxerto de leucemia linfocítica HL 60(S). Novaferon exibiu inibição efetiva, dependente da dose, do crescimento do tumor de HL 60 (S) comparada com o grupo de controle ($P < 0,001$). As taxas de inibição dos grupos tratados com Novaferon (injeção s.c. diariamente de 1,25, 12,5 ou 125 $\mu\text{g/kg}$ por 28 dias) foram de 43,8%, 55,2% e 80,4%, respectivamente comparadas com o grupo de controle com PBS ($P < 0,001$, Tabela 8 abaixo). O tratamento de 21 dias com 125 $\mu\text{g/kg}$ de Novaferon obteve a maior inibição do crescimento do tumor HL 60(S) (80,4%), o que foi significativamente melhor do que com 125 $\mu\text{g/kg}$ de HuIFN- α 2b (69,8%, $P < 0,05$).

Camundongos Balb/c foram tratados com uma injeção s.c. de Novaferon diariamente (1,25 $\mu\text{g/kg}$, 12,5 $\mu\text{g/kg}$ e 125 $\mu\text{g/kg}$) por 21 dias após 2×10^7 células HL 60(S) vivas terem sido introduzidas subcutaneamente nos camundongos. Os resultados foram expressos como volume médio do tumor (mm^3). A Fig. 9 mostrou que todas as três doses de Novaferon exibiram inibição dependente da dose do crescimento do tumor de HL 60(S) em comparação com o grupo de controle com PBS ($P < 0,001$). 125 $\mu\text{g/kg}$ de Novaferon induziram inibição do crescimento do tumor HL 60(S) mais forte do que aquela por HuIFN- α 2b na mesma dose (80,4% vs 69,8%, $P < 0,05$) e inibição similar quando comparado com 5-FU (Figura 9, Tabela 8).

Tabela 8. Peso do tumor e taxas de inibição do crescimento de xenoenxertos de célula HL 60(S) de leucemia humana tratados com Novaferon e HuIFN-

$\alpha 2b$ ($n=10$)

Grupo	Dose ($\mu\text{g/kg}$)	Peso do tumor ($X \pm \text{SD}$)	Taxa de Inibição (%)
Controle	-	$3,723 \pm 0,750$	-
Dosagem baixa de Novaferon	1,25	$2,091 \pm 0,653^{***}$	43,8
Dosagem média de Novaferon	12,5	$1,668 \pm 0,665^{***}$	55,2
Dosagem alta de Novaferon	125	$0,729 \pm 0,332^{***@}$	80,4
Dosagem baixa de HuIFN- $\alpha 2b$	1,25	$2,401 \pm 0,698^{***}$	35,5
Dosagem média de HuIFN- $\alpha 2b$	12,5	$1,870 \pm 0,660^{***}$	49,8
Dosagem alta de HuIFN- $\alpha 2b$	125	$1,124 \pm 0,397^{***}$	69,8
5-FU	30.000	$0,893 \pm 0,289^{***}$	76,0

Nota: $***p < 0,001$, comparado ao grupo de controle; @ $p < 0,05$, comparado com o grupo com dosagem alta (125) de HuIFN- $\alpha 2b$

G. Condição geral dos camundongos durante o tratamento com Novaferon

Os camundongos com os vários enxertos de cânceres humanos foram atentamente observados durante o período de tratamento com Novaferon, HuIFN- $\alpha 2b$ ou 5-FU. Diferente dos grupos tratados com 5-FU, os camundongos em todos os grupos tratados com Novaferon ou HuIFN- $\alpha 2b$ comiam e se comportavam normalmente e não tiveram perda de peso. Os camundongos tratados com 5-FU mostraram alterações típicas na alimentação e comportamento e perda de peso. Essas observações indicam que apesar de mostrar potência anti-câncer similar ou maior do que 5-FU nos modelos de xenoenxerto em animal, Novaferon pode ser mais específico no sentido da inibição de célula cancerosa e ter muito menos efeitos sobre as células normais e/ou funções fisiológicas. Esses podem ser traduzidos em melhor tolerância e efeitos terapêuticos superiores em aplicações humanas.

Como ficará claro para aqueles versados na técnica à luz da descrição precedente, várias alterações e modificações são possíveis na prática da invenção sem se afastar do espírito e escopo dessa. Consequentemente, o escopo da invenção deve ser considerado de acordo com a substância definida pelas reivindicações anexas.

REFERÊNCIAS

1. Interferon nomenclature. *Nature*. 1980; 286 (5769): 110
2. Isaacs A and Lindenmann J. Production of virial interfering substance. US Pat No: 369922. October 17. 1972
- 5 3. Jonasch E and Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist*. 2001; 6(1):34-55
4. Lengyel P. Biochemistry of interferons and their actions. *Annu Rev Biochem*. 1982; 51 :251-282
- 10 5. Gresser I and Tovey MG. Antitumor effects of interferon. *Biochim Biophys Acta*. 1978; 516(2):231-247
6. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(4):778-809
7. Theofilopoulos AN, et al. Type I interferons (alpha/beta) in
15 immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:307-336
8. Uze G, et al. Alpha and beta interferons and their receptor and their friends and relations. *J Interferon Cytokine Res*. 1995; 15(1): 3-26
9. Knight E Jr. Interferon: purification and initial
20 characterization from human diploid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976; 73(2):520-523
10. Pestka S, et al. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*. 2004; 202:8-32
11. Horisberger MA and Di Marco S. Interferon-alpha hybrids. *Pharmacol Ther*. 1995; 66(3):507-534
- 25 12. Horton HM, et al. Antitumor effects of interferon-omega: *in vivo* therapy of human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res*. 1999; 59(16):4064-4068
13. Hardy MP, et al. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics*. 2004; 84(2):331-345.

14. Chen J. et al. Human interferon- ϵ : a type I interferon. Pat US No: 6569420. 27 de maio de 2003

15. Pestka S, et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004, 22:929-979

5 16. Nardelli B, et al. Regulatory effect of IFN- α , a novel type I IFN, on cytokine production by cells of the innate immune system. *J. Immunol.* 2002; 169(9):4822-4830

17. LaFleur DW, et al. Interferon- α , a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276(43):
10 39765-39771

18. Subramaniam PS, Johnson HM. The IFNAR1 subunit of the type I IFN receptor complex contains a functional nuclear localization sequence. *FEBS Lett.* 2004; 578(3):207-210

19. Goodbourn S, et al. Interferons: cell signalling, immune
15 modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol.* 2000; 81(Pt 10):2341-2364

20. Wang K, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis by type 1 IFN depends on cross-talk between phosphoinositol 3-kinase, protein kinase C- δ , and NF- κ B signaling pathways. *J Immunol.* 2003; 171 (2): 1035-
20 1041

21. Katze MG Interferon, PKR, virology, and genomics: what is past and what is next in the new millennium? *J Interferon Cytokine Res.* 2002; 22(3):283-286

22. Chawla-Sarkar M, et al. Apoptosis and interferons: role of
25 interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis.* 2003; 8(3):237-249

23. Kirkwood J. Cancer immunotherapy: the interferon- α experience. *Semin Oncol.* 2002; 29(3 Suppl 7): 18-26

24. Hofmann V, et al. Hairy cell leukemia: an interferon

deficient disease? *Cancer Treat Rev.* 1985; Suppl B: 33-37

25. Stone RM, et al. Recombinant human gamma interferon administered by continuous intravenous infusion in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Oncol.* 1993; 16(2):159-

5 163

26. Talpaz M, et al. Human leukocyte interferon to control thrombocytosis in chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med.* 1983; 99(6):789-792

27. Talpaz M, et al. Changes in granulocyte-monocyte colony-forming cells among leukocyte-interferon-treated chronic myelogenous leukemia patients. *Exp Hematol.* 1986; 14(7):668-671

28. Strander H, et al. Long-term adjuvant interferon treatment of human osteosarcoma. A pilot study. *Acta Oncol.* 1995; 34(6):877-880

29. Dogan B, et al. Intralesional alfa-2a interferon therapy for basal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 1995; 91(2):215-219

30. Fetell MR, et al. Intratumor administration of beta-interferon in recurrent malignant gliomas. A phase I clinical and laboratory study. *Cancer.* 1990; 65(1):78-83

31. Muss HB. The use of interferon in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 1991; 27 (Suppl 4):S84-87

32. Peest D, et al. Cytokine therapy in multiple myeloma. *Br. J Haematol.* 1996; 94(3):425-432

33. Ikic D, et al. Local interferon therapy for melanoma patients. *Int. J Dermatol.* 1995; 34(12):872-874

34. Rybak ME, et al. Interferon therapy of relapsed and refractory Hodgkin's disease: Cancer and Leukemia Group B Study 8652. *J Biol. Response Mod.* 1990; 9(1): 1-4

35. Kaufmann R, et al. Temozolomide in combination with interferon-alpha versus temozolomide alone in patients with advanced

metastatic melanoma: a randomized, phase III, multicenter study from the Dermatologic Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2005; 23(35):9001-9007

36. Lane HC. The role of alpha-interferon in patients with
5 human immunodeficiency virus infection. *Semin Oncol.* 1991; 18 (Supl 7):46-52

37. Woo MH and Brunakis TG. Interferon alfa in the treatment of chronic viral hepatitis B and C. *Ann. Pharmacother.* 1997; 31(3):330-337

38. Gibas AL. Use of interferon in the treatment of chronic
10 viral hepatitis. *Gastroenterologist.* 1993; 1(2): 129- 142

39. Levine LA, et al. Treatment of subclinical intraurethral human papilloma virus infection with interferon alfa-2b. *Urology.* 1996; 47(4):553-557

40. Ho M. Interferon for the treatment of infections. *Annu Rev*
15 *Med.* 1987; 38:51 -59

41. Wintergerst U and Belohradsky BH. Acyclovir monotherapy versus acyclovir plus beta-interferon in focal viral encephalitis in children. *Infection.* 1992; 20(4):207-212

42. Bogdan C, et al. The role of type I interferons in non-viral
20 infections. *Immunol Rev.* 2004; 202:33-48

43. Condos R, et al. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet.* 1997; 349(9064): 1513-1515

44. Giosue S, et al. Aerosolized interferon-alpha treatment in
25 patients with multi-drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw.* 2000; 11(1):99-104

45. Raad I, et al. Use of adjunctive treatment with interferon-gamma in an immunocompromised patient who had refractory multidrug-resistant tuberculosis of the brain. *Clin Infect Dis.* 1996; 22:572-574

46. Fernandez O. et al. Treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis with natural interferon beta: a multicenter, randomized clinical trial. *Mult. Scler.* 1995; Suppl 1 :S67-69;

5 47. Freedman MS, et al. Randomized study of once-weekly interferon beta-1a therapy in relapsing multiple sclerosis: three-year data from the OWIMS study. *Mult Scler.* 2005; 11(1):41-45

48. Shiozawa S, et al. Single-blinded controlled trial of low-dose oral IFN-alpha for the treatment of xerostomia in patients with Sjogren's syndrome. *J Interferon Cytokine Res.* 1998; 18(4):255-262

10 49. Wandinger KP, et al. Diminished production of type-I interferons and interleukin-2 in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1997; 149(1):87-93

15 50. Steegmann JL, et al. Interferon alpha for chronic myeloid leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23(5):483-488

51. Kirkwood JM, et al. High dose Interferon alfa 2b significantly prolongs relapse free survival compared with GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: Results of Intergroup Trial E1694/S9512/C509081. *J Clin Oncol* 2001; 19:2370-2380

20 52. Bonnem EM. alpha Interferon: the potential drug of adjuvant therapy: past achievements and future challenges. *Eur J Cancer.* 1991; 27 Suppl 4:S2-6

53. Folkman J. Successful treatment of an angiogenic disease. *N Engl J Med.* 1989; 320: 1211-1212

25 54. Clifford JL, et al. Retinoids and interferons as antiangiogenic cancer drugs. In: Teicher BA, ed. *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy.* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 1999; 355-370

55. Kaban LB, et al. Antiangiogenic therapy of a recurrent giant cell tumor of the mandible with interferon alfa-2a. *Pediatrics.* 1999;

103:1145-1149

56. Sleijfer S, et al. Side effects of interferon-alpha therapy. Pharm World Sci. 2005; 27(6):423-431

57. Bell L. et al. Structure and properties of modified Interferons. US Pat No: 4914033. April 3. 1990

58. Meyer F. et al. Hybrid Interferons. US Pat No: 5071761. December 10. 1991

59. Streuli M, et al. Target cell specificity of two species derived from them. Proc Natl Acad Sci USA. 1981; 78(5): 2848-2852

60. Zoon K. et al. interferon alpha hybrids. US Pat No: 6685933. February 3. 2004

61. Gangenii JD. Antiviral combination, and method of treatment. US Pat No: 5137720 August 11. 1992

62. Johnson HM. et al. Hybrid interferon tau/tau>pe I interferon polypeptides US Pat No: 6174996. Januan' 16. 2001

63. Raj, NB, et al. Synthesis, antiviral activity, and conformational characterization of mouse-human a-interferon hybrids. J Biol Chem. 1988; 263(18):8943-8952

64. Mark DF, et al. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81 (18): 5662-5666

65. Bentzien J. et al. Recombinant interferon-beta mutants. Pat US No: 6514729. 4 de fevereiro de 2003

66. Stemmer WPC. Methods for *in vitro* recombination. US Pat No: 5605793. 25. de fevereiro de 1997

67. Chang CC, et al. Evolution of a cytokine using DNA family shuffling. Nat Biotechnol. 1999; 17(8):793-797

68. Blatt LM, et al. The biologic activity and molecular characterization of a novel synthetic interferon-alpha species, consensus interferon. J interferon cytokine Res. 1996; 16:489-499

69. Tatusova TA and Madden TL. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol Lett. 1999; 174(2): 247-250

70. Bowie JU, et al. Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino acid Substitutions. Science 1990; 247(4948): 1306-1310

71. Creighton TE. Posttranslational covalent modification of polypeptide chains. In Proteins: Structure and Molecular Properties. Ed by Creighton TE. W. H. Freeman & Co. 1993; pp. 78-99. San Francisco, US

72. Aplin JD and Wriston JC Jr. Preparation, properties, and applications of carbohydrate conjugates of proteins and lipids. CRC Crit Rev Biochem. 1981; 10(4):259-306

73. Edge AS, et al. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. Anal Biochem. 1981; 118(1): 131 -137

74. Thotakura NP and Bohl OP. Enzymatic deglycosylation of glycoproteins. Meth Enzymol. 1987; 138:350-359

75. Peck GE, et al. Pharmaceutical manufacturing. In Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 21^a ed. Editado por University of the Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams and Wilkins. 2006, páginas 691 a 1094. PA, EUA

76. Shimizu K. et al. Plasminogen activator derivatives Pat US No: 4640835. 3. de fevereiro de 1987

77. Mitra G. Covalent attached complex of alpha-1 - proteinase inhibitor with a water soluble polymer. Pat US No: 4496689. 29 de janeiro de 1985

78. Nakagawa Y. et al. Chemically modified protein with polyethyleneglycol Pat US No: 4791 192. 13 de dezembro de 1988

79. Davis F. et al. Non-immunogenic polypeptides Pat US No: 4179337. 18 de dezembro de 1979

80. Field J, et al. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol.* 1988; 8(5):2159-2165

5 81. Evan GI, et al. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol.* 1985; 5(12):3610-3616

82. Paborsky LR, et al. Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen. *Protein Eng.* 1990; 3(6):547-553

10 83. Einhauer A and Jungbauer A. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods.* 2001; 49(1-3):455-465

84. Skinner H, et al. Use of the Glu-Glu-Phe C-terminal epitope for rapid purification of the catalytic domain of normal and mutant ras GTPase-activating proteins. *J Biol Chem.* 1991; 266(22):14163-14166

15 85. Lutz-Freyermuth C, et al. Quantitative determination that one of two potential RNA-binding domains of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein complex binds with high affinity to stem-loop II of U1 RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87(16):6393-6397

20 86. Zhang ZQ. et al. Construction and application of a high level expression vector containing P_RP_L promoter. *Chinese J of Virol.* 1990; 2: 18-23

87. Kingston RE, et al. Introduction of DNA into mammalian cells. In *Current Protocols In Molecular Biology* editado por Ausubel FM, et al. 2003; páginas: 9.0.1 -9.15.20, John Wiley & Sons, Inc. EUA

25 88. McNeill TA. Interferon assay. *J Immunol Methods.* 1981; 46(2):121-127

89. Rubinstein S, et al. Convenient assay for interferon. 1. *Viral.* 1981; 37: 755-758

90. Horisberger MA and de Staritzky K. A recombinant human

interferon- α B/D hybrid with a broad hostrange. J Gen Virol. 1987; 68:945-948

91. Stitz L and Schellekens H. Influence of input multiplicity of infection on the antiviral activity of interferon. J Gen Virol. 1980; 46:205-210

92. Yeo EY, et al. Effect of short-term ethanol on the proliferative response of Swiss 3T3 cells to mitogenic growth factors, Exp MoI Med. 2000; 32: 161-169

93. Vignesh RC, et al. Effect of ethanol on human osteosarcoma cell proliferation, differentiation and mineralization. Toxicology. 2006; 220(1):63-70

94. Cavanaugh PF Jr, et al. A semi-automated neutral red based chemosensitivity assay for drug screening. Investigational New Drugs. 1990; 8(4):347-354

95. Raines EW and Ross R. Purification of human platelet-derived growth factor. Methods Enzymol. 1985; 109:749-773

96. Wahl AF, et al. Gene expression of human DNA polymerase alpha during cell proliferation and the cell cycle. MoI Cell Biol. 1988; 8(11):5016-5025

97. Cook JA and Mitchel JB. Viability measurements in mammalian cell systems. Anal Biochem. 1989; 179(1):1-7

98. Porstmann T, et al. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. J Immunol Methods. 1985; 82(1):169-179

99. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65(1-2):55-63

100. Scudiero DA, et al. Evaluation of a soluble

tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988; 48(17):4827-4833

101. Evinger M and Pestka S. Assay of growth inhibition in lymphoblastoid cell cultures. *Methods Enzymol.* 1981; 79(Pt B):362-368

5 102. Meister A, et al. Biological activities and receptor binding of two human recombinant interferons and their hybrids. *J Gen Virol.* 1986; 67(Pt 8): 1633-43)

103. Frincke J. et al. Interferon antibod} compositions having an extended serum half-life. Pat US No: 5055289. 8 de outubro 1991

10 104. Chang T and Yu L. Hybrid w ith interferon-beta. and an immunoglobulin Fc joined by a peptide linker. Pat US No: 5908626. 1 de junho 1999

105. Nieforth KA, et al. Use of an indirect pharmacodynamic stimulation model of MX protein induction to compare *in vivo* activity of
15 interferon alfa-2a and a polyethylene glycol-modified derivative in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 1996; 59(6):636-646

106. Ekwuribe NN. Conjugation-stabilized therapeutic agent compositions, deliver} and diagnostic formulations comprising same, and method of making and using the same. US Pat No: 568181 1. October 28.
20 1997

107. Gilbert CW and Cho M-O. Interferon polymer conjugates. Pat US No: 571 1944. 27 de janeiro de 1998

108. Greenwald R and Gilbert CW. Interferon polymer conjugates and process for preparing the same. Pat US No: 5738846. 14 de
25 abril de 1998

109. Letsinger RL, et al. Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency vírus in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86(17): 6553-6556

110. Brower V. Naked DNA vaccines come of age. *Nat Biotechnol.* 1998; 16(13):1304-1305

111. Coen DM. The polymerase chain reaction. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Editado por Ausubel FM. 2001, página:
5 15.01 -15.7.8. Jhn Wiley & Sons, Inc. US

112. Stemmer WP. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(22): 10747-10751

113. Armstrong JA. Cytopathic effect inhibition assay for
10 interferon: microculture plate assay. *Methods Enzymol.* 1981; 78(pt A): 381 - 387

114. Sambrook J and Russell DW. in *Molecular Cloning*. 2001; páginas: 15.25-15.35, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, US

115. Sambrook J and Russell DW. in *Molecular Cloning*. 2001; páginas: 15.51-15.52, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque, EUA
15

116. Sambrook J and Russell DW. in *Molecular Cloning*. 2001; páginas: 15.25-15.29 and 15-49-15-53, Cold Spring Harbor Laboratory
20 Press, Nova Iorque, EUA

117. Chou TC, et al. Reversal of anticancer multidrug resistance by the ardeemins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(14): 8369-8374

118. Corbell T, et al. *in vivo* methods for screening and
25 preclinical testing: use of rodent solid tumors for drug discovery, in *Anticancer Drug Development Guide: preclinical screening, clinical trails, and approval*. Editado por Teicher BA and Andrews PA. 2004; páginas: 79-124. Humana Press, New Jersey, EUA

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Novagenetics Inc.

<120> PROTEÍNAS TIPO INTERFERON HUMANO RECOMBINANTES

<130> N240 0005/TWB

<160> 17

<170> PatentIn versão 3.4

<210> 1

<211> 498

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada

<400> 1

tgtaatctgt ctcaaaccça cagcctgggt agcaagagga ccttgatgct cctggcgag	60
atggggaaaa tctccctttt ctctgcctg aaggacagac atgactttga atttcccag	120
gaggaatttg atggcaacca gttccagaaa gctcaagcca tctctgtcct ccatgagctg	180
atccagcaga ccttcaatct cttcagcaca aaggaatcat ctgctgcttg ggatgagggc	240
ctcctagaca aattccgcac cgaactctac cggcagctaa atgacttgga agcctgtatg	300
atgcaggagg ttgggggtgga agagactccc ctgatgaatg cggactccat cctggctgtg	360
aagaaatact tccaaagaat cactctttat ctgatggaga agaaatacag cccttggtgcc	420
tgggaggttg tcagagtaga aatcatgaga tcctctcttt tttcaacaaa cttgcaaaaa	480
agattaaggg ggaaggat	498

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de aminoácido quimicamente sintetizada

<400> 2

Cys Asn Leu Ser Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Lys Arg Thr Leu Met				
1	5	10	15	

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Arg Gly Lys Asp
 165

<210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada

<400> 3
 tggtgctcag ctrcaagtc 19

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada

<400> 4
 aatcatttcc atgttgracc ag 22

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada
 <400> 5
 aatcatttcc cggttggtacc ag 22

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada
 <400> 6
 aatcatttcc atgttgaaac ag 22

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada
 <400> 7
 aatcatttca agatgagccc ag 22

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada
 <400> 8
 aatgattttc atgttgaacc ag 22

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada
 <400> 9
 aatcatttss atgttgaacc ag 22

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada
 <400> 10

gatcattttcc atgttgaatg ag 22

<210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada

<400> 11
 gagtcgtttc tgtgttgat cag 23

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada

<400> 12
 atgcccctgt ctttttcttt ac 22

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada

<400> 13
 agggcagcat tcaaagcag 19

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada

<400> 14
 tcagaccgct tctgcgttct g 21

<210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada

<400> 15
 gaaggctttg ggggtgtgtg 19

<210> 16
<211> 17
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada

<400> 16
aatctttctct catccgc 17

<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Sequência de nucleotídeo quimicamente sintetizada

<400> 17
accatgaagg tgacgctc 18

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de codificar uma proteína tendo atividades biológicas tipo-interferon humano, em que o dito polinucleotídeo é selecionado do grupo que consiste nos polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos pelo menos 93% idêntica a SEQ ID NO:1.

2. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita sequência é pelo menos 95% idêntica a SEQ ID NO:1.

3. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a dita sequência é pelo menos 98% idêntica a SEQ ID NO:1.

4. Polinucleotídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a dita proteína não é de ocorrência natural.

5. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a dita proteína tem atividades anti-virais e anti-proliferativas intensificadas em comparação com o interferon alfa 2b humano (HuIFN- α 2b).

6. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita proteína tem atividade antiviral pelo menos 2 vezes maior do que HuIFN- α 2b.

7. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita proteína tem atividade anti-proliferativa pelo menos 10 vezes maior do que HuIFN- α 2b.

8. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de compreender o polinucleotídeo como definido na reivindicação 1.

9. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de conter o vetor recombinante como definido na reivindicação 8.

10. Proteína de ocorrência não natural que exibe atividades biológicas tipo-interferon humano, caracterizada pelo fato de que a dita proteína é selecionada do grupo que consiste nos proteínas que compreendem uma sequência de aminoácidos pelo menos 85% idêntica a SEQ ID NO:2.

5 11. Proteína de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a dita sequência é pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO:2.

12. Proteína de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a dita sequência é pelo menos 95% idêntica a SEQ ID NO:2.

10 13. Proteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem atividades anti-virais e anti-proliferativas intensificadas em comparação com HuIFN- α 2b.

14. Proteína de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem atividade antiviral pelo menos 2 vezes maior do que HuIFN- α 2b.

15 15. Proteína de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem atividade antiviral pelo menos 5 vezes maior do que HuIFN- α 2b.

20 16. Proteína de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem atividade antiviral pelo menos 10 vezes maior do que HuIFN- α 2b.

17. Proteína de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem atividade anti-proliferativa pelo menos 10 vezes maior do que HuIFN- α 2b.

25 18. Proteína de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem atividade anti-proliferativa pelo menos 50 vezes maior do que HuIFN- α 2b.

19. Proteína de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem atividade anti-proliferativa pelo menos 100 vezes maior do que HuIFN- α 2b.

20. Proteína de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem atividade anti-proliferativa pelo menos 200 vezes maior do que HuIFN- α 2b.

5 21. Proteína de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a dita proteína é recombinante.

22. Proteína de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem um peso molecular de aproximadamente 19315 daltons.

10 23. Proteína de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de compreender opcionalmente um resíduo de metionina na terminação N.

15 24. Proteína que não ocorre naturalmente, caracterizada pelo fato de compreender uma sequência que difere em 0 a 25 aminoácidos da SEQ ID NO:2, em que a dita proteína exibe atividades biológicas tipo-interferon humano.

25. Proteína de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem atividades antiviral e anti-proliferativa intensificadas em comparação com HuIFN- α 2b.

20 26. Proteína de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem atividade antiviral pelo menos 2 vezes maior do que HuIFN- α 2b.

27. Proteína de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a dita proteína tem atividade anti-proliferativa pelo menos 10 vezes maior do que HuIFN- α 2b.

25 28. Proteína de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que a dita proteína é um análogo de interferon.

29. Proteína de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que a dita proteína é recombinante.

30. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de compreender um

fragmento da proteína como definida na reivindicação 10, em que o dito fragmento exibe as ditas atividades biológicas tipo-interferon humano.

5 31. Construto de proteína, caracterizado pelo fato de compreender a proteína como definida na reivindicação 10 acoplada a outra porção, em que o dito construto exibe as ditas atividades biológicas tipo-interferon humano.

32. Construto de proteína de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a dita proteína é glicosilada.

10 33. Construto de proteína de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a dita porção é um polipeptídeo.

34. Construto de proteína de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a dita porção não é um polipeptídeo.

35. Construto de proteína de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a dita porção é uma molécula de polímero.

15 36. Construto de proteína de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a dita molécula de polímero é um polietileno glicol linear ou ramificado.

37. Construto de proteína de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a dita porção é uma molécula marcadora.

20 38. Composição, caracterizado pelo fato de compreender a proteína como definida na reivindicação 10 e um carreador, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

39. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de codificar a proteína como definida na reivindicação 10.

25 40. Uso da proteína como definida na reivindicação 10, caracterizado pelo fato de ser como um agente antiviral.

41. Uso da proteína de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de ser como um agente anti-proliferativo.

42. Uso da proteína de acordo com a reivindicação 10,

caracterizado pelo fato de ser como um agente anti-câncer.

43. Uso da proteína de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de ser como um agente de imunomodulação.

5 44. Método para tratar câncer, caracterizado pelo fato de compreender a administração a um indivíduo necessitado de terapia de uma quantidade terapêuticamente eficaz da proteína como definida na reivindicação 10.

10 45. Método para tratar uma doença viral, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um indivíduo necessitado de terapia uma quantidade terapêuticamente eficaz da proteína como definida na reivindicação 10.

46. Método de acordo com a reivindicação 44 ou 45, caracterizado pelo fato de que o dito indivíduo é um ser humano.

15 47. Método de acordo com a reivindicação 44 ou 45, caracterizado pelo fato de que a dita proteína é administrada junto com um carreador, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

20 48. Método para tratar uma condição responsiva a terapia com interferon, caracterizado pelo fato de compreender a administração a um indivíduo necessitado de tratamento de uma quantidade terapêuticamente eficaz da proteína como definida na reivindicação 10.

25 49. Método de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que a dita proteína é terapêuticamente eficaz em relação a uma ampla faixa de diferentes tipos de câncer, o dito câncer sendo selecionado do grupo que consiste de melanoma, adenocarcinoma colorretal, carcinoma hepatocelular, hepatoma, linfoma, carcinoma de próstata, adenocarcinoma gástrico, carcinoma de esôfago, carcinoma de pulmão, adenocarcinoma de cérvix e carcinoma de cérvix.

50. Proteína de ocorrência não natural que exibe atividades biológicas tipo-interferon humano, caracterizada pelo fato de que a dita

proteína tem uma sequência de aminoácidos pelo menos 95% idêntica a SEQ ID NO:2 e em que a dita proteína tem atividades antiviral e anti-proliferativa intensificadas em comparação com HuIFN- α 2b.

5 51. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de codificar a proteína como definida na reivindicação 50.

52. Composição, caracterizada pelo fato de compreender a proteína como definida na reivindicação 50.

10 53. Proteína que tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 ou um fragmento da mesma, caracterizada pelo fato de exibir atividades biológicas tipo-interferon humano.

54. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de codificar a proteína como definida na reivindicação 53.

55. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo que consiste dos polinucleotídeos de SEQ ID NOS: 3 a 17.

A

SEQ ID NO:1

TGTAATCTGTCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAAGAGGACCTTGATGCTCCTGGCGCAGATGGGGAAAATC
 TCCCTTTTCTCCTGCCTGAAGGACAGACATGACTTTGAATTTCCCCAGGAGGAATTTGATGGCAACCAGTTC
 CAGAAAAGCTCAAGCCATCTCTGTCTCCATGAGCTGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGAA
 TCATCTGCTGCTTGGGATGAGGGCCTCCTAGACAAATTCCGCACCGAACTCTACCGGCAGCTAAATGACTTG
 GAAGCCTGTATGATGCAGGAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCCTGATGAATGCGGACTCCATCCTGGCTGTG
 AAGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTTTATCTGATGGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTC
 AGAGTAGAAATCATGAGATCCCTCTCTTTTCAACAAACTTGCAAAAAGATTAAGGGGGAAGGAT

B

SEQ ID NO:2

CNLSQTHSLGSKRTLMLLAQMGKISLFSLKDRHDFEFPQEEFDGNQFQKA
 QAISVLHELIQQTFFNLSTKSSAAWDEGLLDKFRTELYRQLNDLEACMMQ
 EVGVEETPLMNADSLAVKKYFQRITLYLMEKKYSPCAWEVVRVEIMRSL
 FSTNLQKRLRGKD

C

DNA	1	TGTAATCTGTCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAAGAGGACCTTGATGCTC
Proteína	1	C N L S Q T H S L G S K R T L M L
DNA	52	CTGGCGCAGATGGGGAAAATCTCCCTTTTCTCCTGCCTGAAGGACAGACAT
Proteína	18	L A Q M G K I S L F S C L K D R H
DNA	103	GACTTTGAATTTCCCCAGGAGGAATTTGATGGCAACCAGTTCCAGAAAGCT
Proteína	35	D F E F P Q E E F D G N Q F Q K A
DNA	154	CAAGCCATCTCTGTCTCCATGAGCTGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTC
Proteína	52	Q A I S V L H E L I Q Q T F N L F
DNA	205	AGCACAAAGGAATCATCTGCTGCTTGGGATGAGGGCCTCCTAGACAAATTC
Proteína	69	S T K E S S A A W D E G L L D K F
DNA	256	CGCACCGAACTCTACCGGCAGCTAAATGACTTGGAAGCCTGTATGATGCAG
Proteína	86	R T E L Y R Q L N D L E A C M M Q
DNA	307	GAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCCTGATGAATGCGGACTCCATCCTGGCT
Proteína	103	E V G V E E T P L M N A D S I L A
DNA	358	GTGAAGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTTTATCTGATGGAGAAGAAATAC
Proteína	120	V K K Y F Q R I T L Y L M E K K Y
DNA	409	AGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTCAGAGTAGAAATCATGAGATCCCTCTCT
Proteína	137	S P C A W E V V R V E I M R S L S
DNA	460	TTTTCAACAAACTTGCAAAAAGATTAAGGGGGAAGGAT
Proteína	154	F S T N L Q K R L R G K D

Fig. 1

A

Novaferon 1 TGTAATCTGTCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAAGAGGACCTTGATGCTCCTGGCGCAG
 |||||
 IFN α 14 126 TGTAATCTGTCTCAAACCCACAGCCTGAATAACAGGAGGACTTTGATGCTCATGGCACAA
 Novaferon 61 ATGGGGAAAATCTCCCTTTTCTCCTGCCTGAAGGACAGACATGACTTTGAATTTCCCCAG
 ||| |||
 IFN α 14 186 ATGAGGAGAATCTCTCCTTTCTCCTGCCTGAAGGACAGACATGACTTTGAATTTCCCCAG
 Novaferon 121 GAGGAATTTGATGGCAACCAGTTCCAGAAAGCTCAAGCCATCTCTGTCCTCCATGAGCTG
 |||||
 IFN α 14 246 GAGGAATTTGATGGCAACCAGTTCCAGAAAGCTCAAGCCATCTCTGTCCTCCATGAGATG
 Novaferon 181 ATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGAATCATCTGCTGCTTGGGATGAGGGC
 || |||||
 IFN α 14 306 ATGCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGAACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACC
 Novaferon 341 CTCCTAGACAAAATTC CGCACC GAACTCTACCGGCAGCTAAATGACTTGGAAGCCTGTATG
 ||||| ||||| || ||||| || |||||
 IFN α 14 366 CTCCTAGAAAAATTTACATTGAACTTTTCAGCAAATGAATGACCTGGAAGCCTGTGTG
 Novaferon 301 ATGCAGGAGGTTGGGGTGGAAGAGACTCCCCTGATGAATGCGGACTCCATCCTGGCTGTG
 || |||||
 IFN α 14 426 ATACAGGAGGTTGGGGTGGAAGAGACTCCCCTGATGAATGAGGACTCCATCCTGGCTGTG
 Novaferon 361 AAGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTTTATCTGATGGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCC
 |||||
 IFN α 14 486 AAGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTTTATCTGATGGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCC
 Novaferon 421 TGGGAGGTTGTCAGAGTAGAAATCATGAGATCCCTCTCTTTTTCAACAAACTTGCAAAAA
 |||||
 IFN α 14 546 TGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCCTTCTCTTTTTCAACAAACTTGCAAAAA
 Novaferon 481 AGATTAAGGGGGAAGGAT 498
 |||||
 IFN α 14 606 AGATTAAGGAGGAAGGAT 623

B

Novaferon 1 CNLSQTHSLGSKRTLMLLAQMGKISLFSLKDRHDFEPQEEFDGNQFQK
 IFN α 14 24NNR.....M...RR..P.....
 Novaferon 51 AQAISVLHELIIQTFNLFSTKESSAAWDEGLLDKFRTELYRQLNDLEACM
 IFN α 14 73MM.....N.....T..E..YI..FQ.M.....V
 Novaferon 101 MQEVGVEETPLMNADSILAVKKYFQRITLYLMEKKYSPCAWEVVRVEIMR
 IFN α 14 123 I.....E.....A....
 Novaferon 151 SLSFSTNLQKRLRGKD 166
 IFN α 14 173R.. 189

Fig. 2

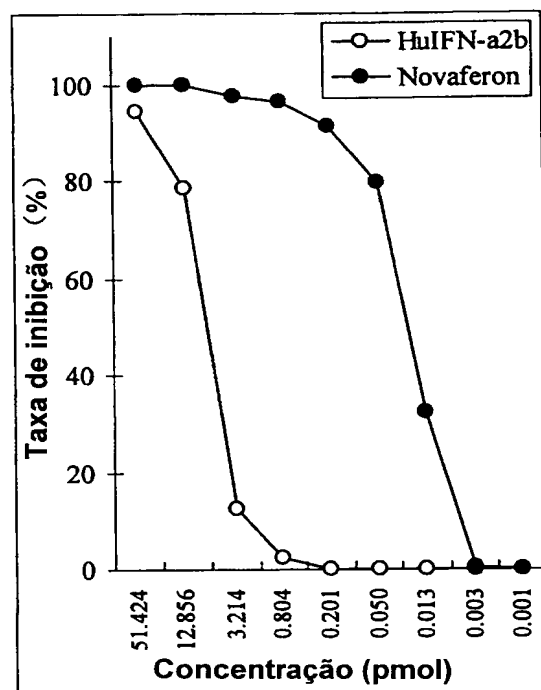
A

Novaferon	1	TGTAATCTGTCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAAGAGGACCTTGATGCTCCTGGCGCACAG
IFN α 2b	138	TGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAG
Novaferon	61	ATGGGGAAAATCTCCCTTTTCTCCTGCCTGAAGGACAGACATGACTTTGAATTTCCCCAG
IFN α 2b	198	ATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCGCCAG
Novaferon	121	GAGGAATTTGATGGCAACCAGTTCCAGAAAGCTCAAGCCATCTCTGTCTCCATGAGCTG
IFN α 2b	258	GAGGAGTTTG---GCAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCCTCCATGAGATG
Novaferon	181	ATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGAATCATCTGCTGCTTGGGATGAGGGC
IFN α 2b	315	ATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACC
Novaferon	241	CTCCTAGACAAATTCCGCACCGAACTCTACCGGCAGCTAAATGACTTGGAAGCCTGTATG
IFN α 2b	375	CTCCTAGACAAATTCTACACTGAACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTG
Novaferon	301	ATGCAGGAGGTTGGGGGTGGAAGAGACTCCCCTGATGAATGCGGACTCCATCCTGGCTGTG
IFN α 2b	435	ATACAGGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTG
Novaferon	361	AAGAAATACTTCCAAGAATCACTCTTTATCTGATGGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCC
IFN α 2b	495	AGGAAATACTTCCAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCC
Novaferon	421	TGGGAGGTTGTCTAGAGTAGAAATCATGAGATCCCTCTCTTTTTTCAACAACTTGCAAAAA
IFN α 2b	555	TGGGAGGTTGTCTAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAA
Novaferon	481	AGATTAAGGGGGAAGGAT 498
IFN α 2b	615	AGTTTAAGAAGTAAGGAA 632

B

Novaferon	1	CNLSQTHSLGSKRTLMLLAQMKGISLFSCLKDRHDFEFPQEEDGNQFQK
IFN α 2b	1	.D.P.....R.....RR.....F.....
Novaferon	50	AQAISVLHELIIQQTFNLFSTKESSAAWDEGLLDKFRTELYRQLNDLEACM
IFN α 2	49	.ET.....E...Q.....K.....E....F....Y.....CV
Novaferon	100	MQEVGVEETPLMNADSI LAVKKYFQRITLYLMEKKYSPCAWEVVRVEIMR
IFN α 2b	99	I.G...T.....KE.....R.....K.....A....
Novaferon	150	SLSFSTNLQKRLRGKD 166
IFN α 2b	149	.F.L.....ES..S.E 165

FIG. 3

**Fig. 4**

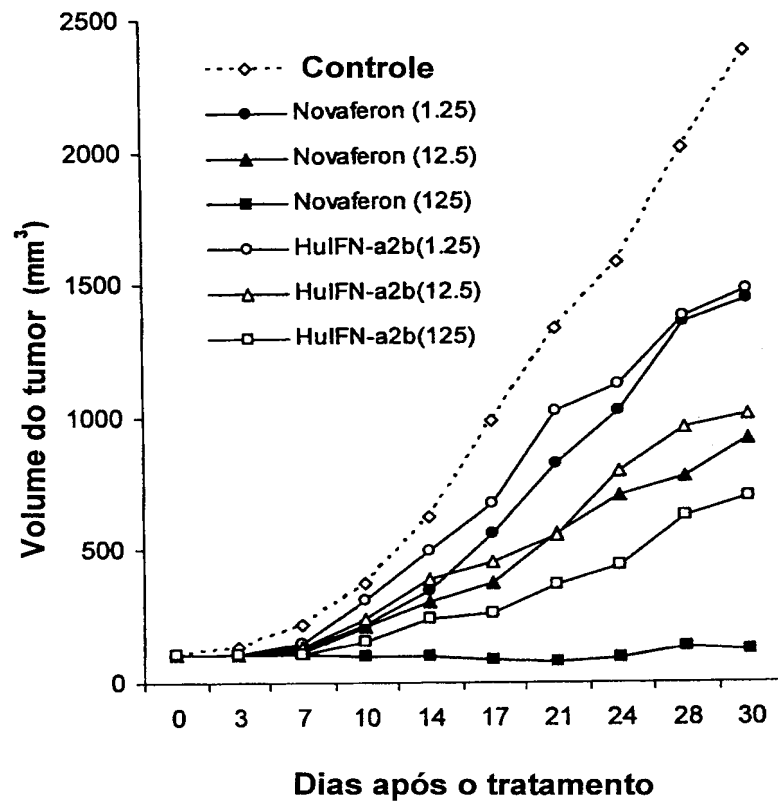


Fig. 5

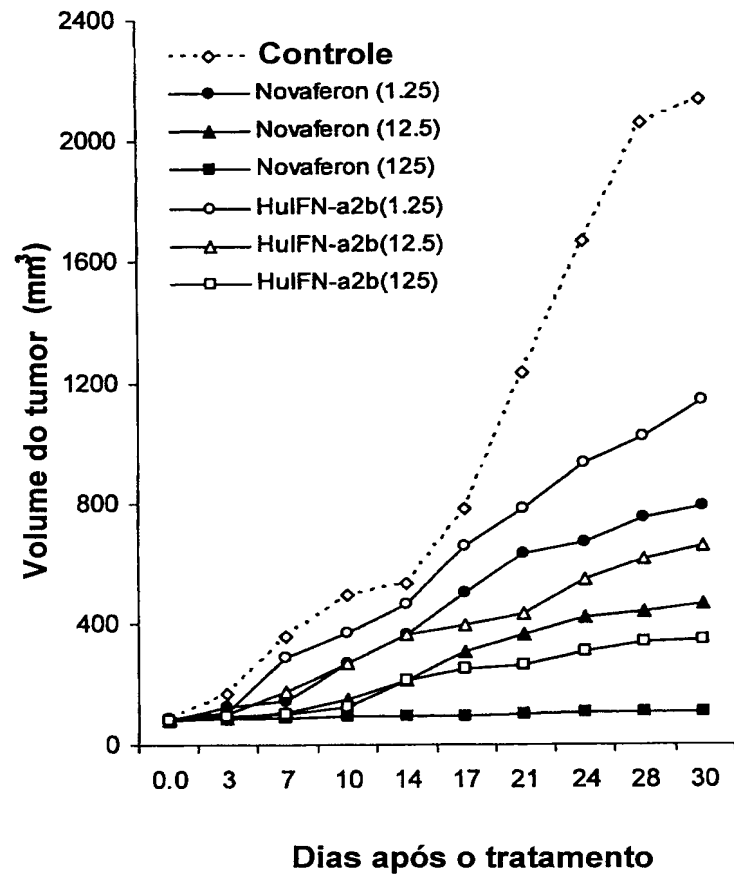


Fig. 6

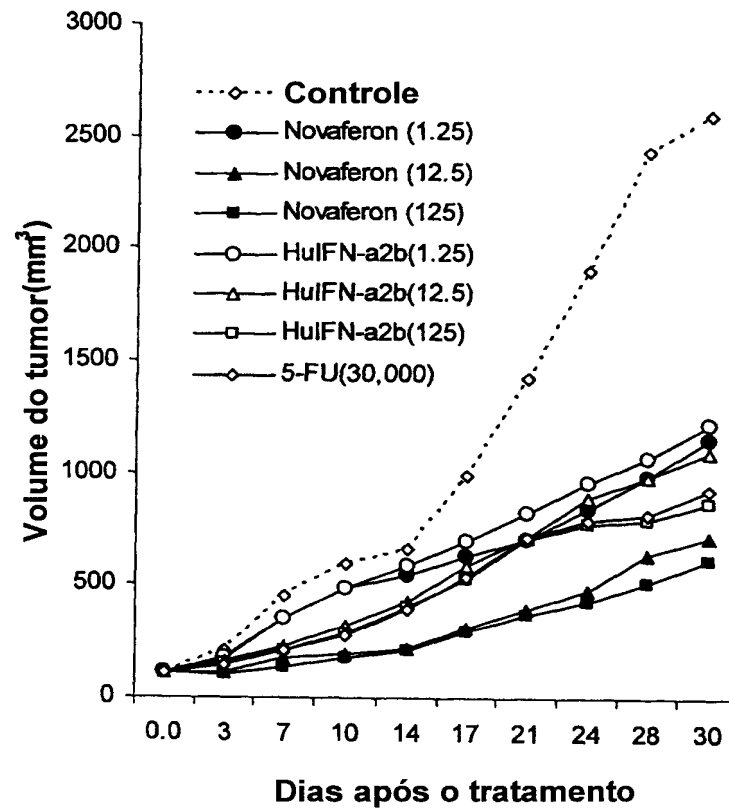


Fig. 7

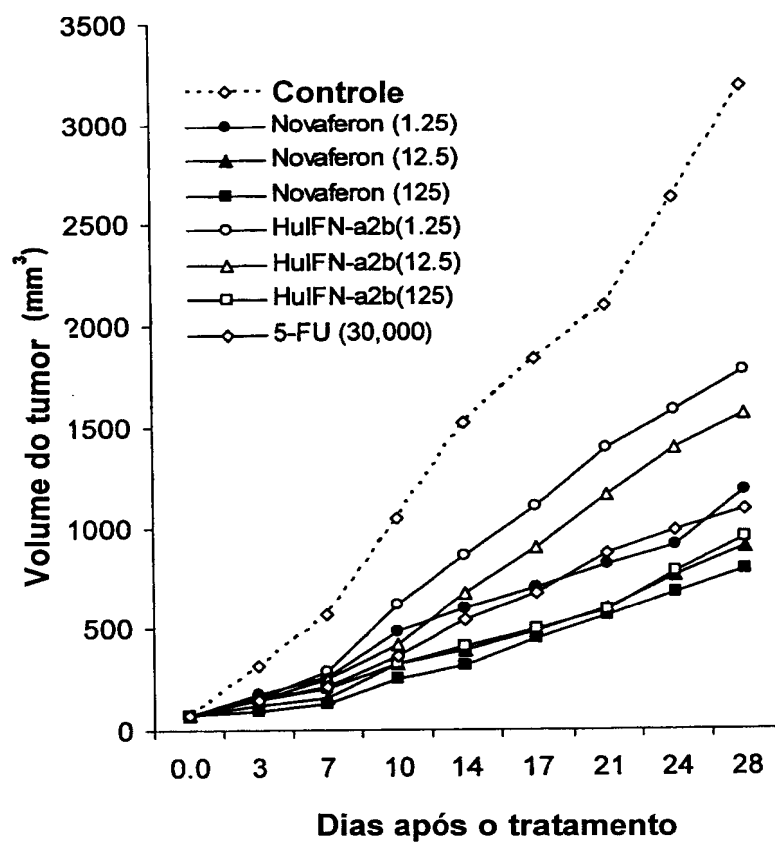


Fig. 8

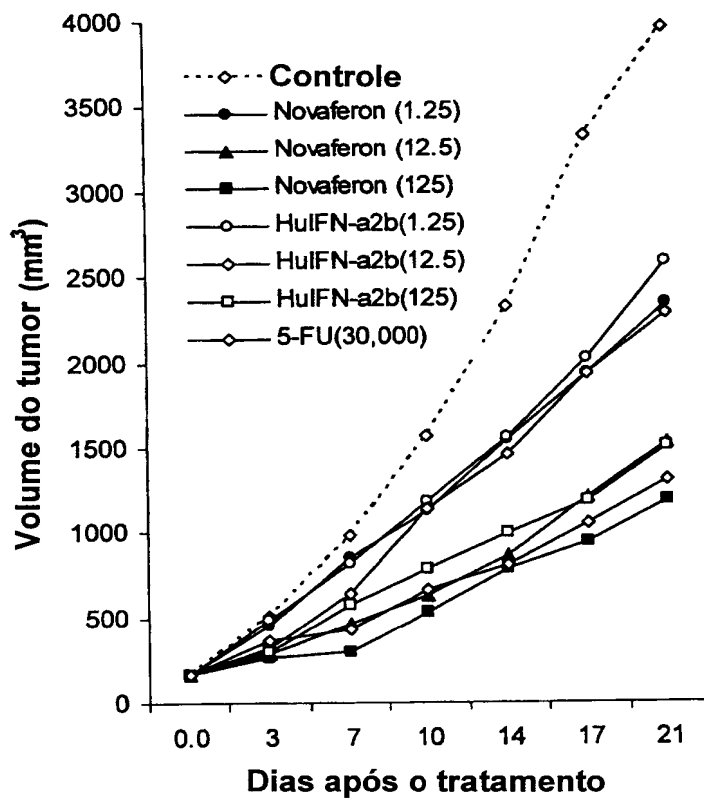


Fig. 9

RESUMO

“POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR RECOMBINANTE, CÉLULA HOSPEDEIRA, PROTEÍNA, CONSTRUTO DE PROTEÍNA, USO DA PROTEÍNA, MÉTODOS PARA TRATAR CÂNCER, PARA TRATAR
5 UMA DOENÇA VIRAL, PARA TRATAR UMA CONDIÇÃO RESPONSIVA A TERAPIA COM INTERFERON, E, COMPOSIÇÃO”

Este pedido se refere a proteínas tipo-interferon humano recombinantes. Em uma modalidade uma proteína recombinante criada pela tecnologia de embaralhamento de gene é descrita tendo atividades anti-virais
10 e anti-proliferativas aumentadas em comparação com o interferon alfa 2b humano (HuIFN α 2b). A invenção abrange um polinucleotídeo que codifica a proteína e vetores recombinantes e células hospedeiras que compreendem o polinucleotídeo. Preferivelmente o polinucleotídeo é selecionado do grupo de polinucleotídeos tendo, cada, uma sequência pelo menos 93% idêntica a SEQ
15 ID No: 1 e a proteína selecionada do grupo de proteínas tendo, cada, uma sequência de aminoácido pelo menos 85% idêntica à SEQ ID No: 2;. As proteínas e as composições que compreendem as proteínas podem ser usadas para tratamento de condições que respondem à terapia com r tais como doenças virais e câncer.