República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0517932-7 B1

(22) Data do Depósito: 02/11/2005

(45) Data de Concessão: 19/10/2021

(54) Título: MUTEÍNA HUMANA DE BETA-INTERFERON, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA ANIMAL, MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE REFERIDA MUTEÍNA E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREEDENDO A MESMA

(51) Int.Cl.: C07K 14/565.

(30) Prioridade Unionista: 02/11/2004 KR 10-2004-0088196.

(73) Titular(es): ABION INC..

(72) Inventor(es): YOUNG KEE SHIN; JI TAI KIM; MOON KYOUNG SO; JONG MIN LEE; JI-HYE YANG; JI UK YOO; TAE HO BYUN; HAN KYU OH; HO CHUL YOON; JI SOO AHN; KYUNG SONG; JAE HO JIN.

(86) Pedido PCT: PCT KR2005003665 de 02/11/2005

(87) Publicação PCT: WO 2006/049423 de 11/05/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/05/2007

(57) Resumo: MUTEÍNA HUMANA DE BETA-INTERFERON. A presente invenção refere-se a uma muteína humana de beta-interferon. Em particular, a presente invenção se refere à muteína humana de beta-interferon dotada de uma ou duas cadeias adicionais de açúcar comparado com o beta-interferon natural de origem humana.

“MUTEÍNA HUMANA DE BETA-INTERFERON, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA ANIMAL, MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE REFERIDA MUTEÍNA E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREEDENDO A MESMA”

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a uma muteína de interferon beta humano. Particularmente, a presente invenção refere-se à muteína de interferon beta humano, que tem uma ou duas cadeias adicionais de açúcares, em comparação com interferon beta humano.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Interferon (IFN), um membro de citocinas, apresenta atividade antiviral, suprime a proliferação celular e regula a resposta imunológica natural. Interferon beta (IFN-f3) é uma proteína esférica que tem 5 hélices e um peso molecular de 22 queda, que torna-se 18 queda quando removida sua cadeia de açúcares (Arduini et ai., Protein Science 8:1867-1877 (1999)).

[003] Interferon beta foi estudado ativamente quanto a suas aplicações clínicas, e particularmente, ele foi o centro das atenções como agente lenitivo, aliviador, ou tratador para sintomas de esclerose múltipla (Goodkin et al., "Multiple sclerosis: Treatment options for patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis", 1999).

[004] Além da esclerose múltipla, foi relatado que interferon beta apresenta diversas atividades imunológicas, tal como atividade antiviral, inibição do crescimento celular ou atividade contra crescimento, linfotoxicidade crescente, atividade imunorreguladora, indução ou supressão de proliferação de células-alvo, ativação de macrófagos, produção crescente de citocinas, aumento do efeito de citotoxicidade de células T, aumento de células exterminadoras naturais e, portanto, ele é usado eficazmente para tratar câncer, distúrbios auto-imunes, infecções virais, doenças relacionadas ao HIV, hepatite C, artrite reumatóide, e similares (Pilling et al., Eur. J Immunol.

29:1041- 1050 (1999); Young et al., Neurology 51:682-689 (1998); Cirelli et al., "Major therapeutic uses of interferons", Clin. Immunother, 3:2787 (1995)).

[005] O interferon beta humano é um tipo de glicoproteína, ligado a uma ou mais cadeias de açúcares, e tal cadeia de açúcar desempenha um papel importante na atividade das glicoproteínas.

[006] Portanto, há um instante no qual a atividade de uma glicoproteína toma-se aumentada quando uma cadeia de um açúcar é introduzida adicionalmente dentro dela.

[007] A publicação PCT nº WO 96/25498 e a patente nº US 5.618.698 descreveram que as atividades das glicoproteínas hTPO e hEPO são aumentadas introduzindo uma ou mais cadeias de açúcares.

[008] A presente invenção revelou uma muteína de interferon beta humano, que tem atividade ou capacidade aumentada ou melhorada introduzindo uma cadeia de um açúcar no interferon beta natural humano, como um ponto de vista descrito acima.

[009] Consequentemente, em uma modalidade da presente invenção, fornece-se uma muteína de interferon beta humano, que tem atividade ou capacidade aumentada ou melhorada introduzindo uma cadeia de um açúcar no interferon beta natural humano.

[0010] Outros objetivos ou modalidades de acordo com a presente invenção são fornecidos abaixo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0011] Em uma modalidade preferida, a presente invenção refere-se a uma muteína de interferon beta humano.

[0012] Como a muteína de interferon beta humano da presente invenção assume a forma de introduzir uma ou mais cadeias de açúcares adicionais no interferon beta natural humano, ela apresenta atividade antiviral melhorada ou aumentada, atividade supressora do crescimento celular, capacidade imunorreguladora e meia-vida in vivo prolongada (vide Figuras 7 a 10).

[0013] Como descrito nos exemplos que se seguem, no caso de expressar o polipeptídeo que está tendo seu 27º aminoácido substituído, a arginina (R) no interferon beta natural humano, tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, por treonina (T) ou serina (S) ou tendo adicionada a sequência glicina-asparagina-isoleucina-valina (G-N-I-T-V) na extremidade do terminal C do interferon beta natural humano em uma célula animal, a presente invenção pode preparar uma muteína do interferon beta humano, tendo atividade ou capacidade melhorada ou aumentada, em comparação com o interferon beta natural humano, introduzindo uma ou mais cadeias de açúcares adicionais ligadas a N no interferon beta natural.

[0014] A presente invenção fundamenta-se nesses resultados experimentais.

[0015] A muteína do interferon beta humano com atividade ou capacidade aumentada ou melhorada em comparação com o interferon beta natural humano caracteriza-se pela inclusão da sequência glicina-asparagina-isoleucina-valina (G-N-1-T-V) na extremidade do terminal C na sequência de aminoácidos do interferon beta natural humano, ou uma muteína do interferon beta natural humano, tendo uma cadeia de um açúcar ligada a N na posição da sequência.

[0016] O termo "muteína de interferon beta natural humano", como aqui utilizado, inclusive nas reivindicações, significa todos polipeptídeos portadores de uma parte ou a totalidade da sequência de aminoácidos derivada do interferon beta natural humano, mantendo a atividade do interferon beta humano.

[0017] O termo "atividade do interferon beta humano", como aqui utilizado, significa uma ou mais atividades suficientes para definir um polipeptídeo como interferon beta humano dentre as atividades anteriormente conhecidas, apresentadas pelo interferon beta humano. Tais atividades incluem atividade para lenir, aliviar ou tratar esclerose múltipla, atividade antiviral, inibição do crescimento celular, atividade contra

crescimento, atividade antiproliferativa, aumento da linfocitotoxicidade, aumento da atividade imunorreguladora, indução ou supressão da proliferação de células-alvo, aumento da produção de citocinas, aumento do efeito citotóxico de células T, aumento de células exterminadoras naturais, atividade para prevenir ou tratar câncer, prevenir ou tratar distúrbios auto-imunes, prevenir ou tratar infecções virais, prevenção ou tratamento de doenças relacionadas ao HIV, prevenção ou tratamento de hepatite C, e prevenção ou tratamento de artrite reumatóide.

[0018] Além disso, o termo "polipeptídeo portador de uma parte ou a totalidade da sequência de aminoácidos derivada do interferon beta natural humano", como aqui utilizado, significa um polipeptídeo que contém a totalidade da sequência de aminoácidos do interferon beta natural humano, representada por SEQ ID NO: 1, ou uma parte essencial dela, ou um polipeptídeo substancialmente similar a tal polipeptídeo.

[0019] O termo "polipeptídeo que inclui uma parte essencial da sequência de aminoácidos inteira de SEQ ID NO: 1", como aqui utilizado, significa um polipeptídeo que apresenta atividade relativamente menor do que o interferon beta natural humano, que tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, mas contém uma parte da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, mas ainda possui a atividade de interferon beta humano.

[0020] Além disso, o termo "polipeptídeo substancialmente similar à sequência de aminoácidos inteira de SEQ ID NO: 1 ou uma parte essencial dela", como aqui utilizado, significa um polipeptídeo que apresenta atividade relativamente menor do que o interferon beta natural humano, que tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, mas contém a sequência de aminoácidos inteira de SEQ ID NO: 1 ou uma parte essencial dela, que tem um ou mais aminoácidos substituídos, mas que ainda possui a atividade do interferon beta humano.

[0021] Por exemplo, o polipeptídeo que inclui uma parte essencial da sequência de aminoácidos inteira de SEQ ID NO: 1, pode ser um polipeptídeo no qual foi deletada a sua extremidade do terminal N e/ou do terminal C no polipeptídeo, tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Além disso, o polipeptídeo substancialmente similar à sequência de aminoácidos inteira de SEQ ID NO: 1 ou uma parte essencial dela é exemplificado por um polipeptídeo que tem um ou mais aminoácidos substituídos, onde o aminoácido que entrou no seu lugar é quimicamente equivalente ao aminoácido original antes da substituição. Por exemplo, no caso de um aminoácido hidrofóbico, tal como alanina, é preferível substituir por outro aminoácido hidrofóbico, tal como glicina, ou um aminoácido hidrofílico adicional, tal como valina, leucina ou isoleucina, além do aminoácido original.

[0022] Algumas vezes, como a extremidade do terminal N, a extremidade do terminal C ou o aminoácido que entrou no lugar de um outro, podem influenciar um modelo essencial para a atividade do interferon beta humano, há casos nos quais o polipeptídeo que teve sua extremidade do terminal N e/ou do terminal C deletada, ou tendo um aminoácido substituído, não apresenta qualquer atividade do interferon beta humano. Contudo, confirmando se um polipeptídeo derivado da sequência de aminoácidos de SEQ 1D NO: 1 tem uma ou mais atividades dentre 5 as atividades descritas acima, e/ou através de um método bem conhecidos nessa técnica referente à identificação de interferon beta humano, baseado no hora de uma data de depósito da presente invenção, classificar e detectar um polipeptídeo ativo a partir de polipeptídeos inativos está dentro da amplitude do conhecimento dos versados nessas técnicas.

[0023] A descrição acima sendo considerada coletiva- mente, a muteína de interferon beta humano da presente invenção pode ser definida como um dos seguintes polipeptídeos, que contêm uma sequência glicina-asparagina-isoleucina-treonina na sua extremidade do

terminal C, têm uma cadeia de um açúcar ligada em N na posição da sequência e apresentam a atividade do interferon beta humano:

(a) um polipeptídeo que contém a sequência de aminoácidos inteira de SEQ ID NO: 1;

(b) um polipeptídeo que inclui uma parte essencial da sequência de aminoácidos de SEQ 1D NO: 1; e

(c) um polipeptídeo substancialmente similar ao polipeptídeo (a) ou (b).

[0024] Portanto, deve-se entender que a muteína do interferon beta humano da presente invenção é um polipeptídeo que possui uma atividade do interferon beta humano, que contém uma sequência glicina-asparagina-isoleucina-treonina na sua extremidade do terminal C, e tem uma cadeia de um açúcar ligada em N nessa posição da sequência.

[0025] Similarmente, embora a muteína do interferon beta humano da presente invenção seja definida e entendida como todos polipeptídeos que apresentam a atividade de interferon beta humano, que contêm uma sequência glicina-asparagina-isoleucina-treonina nas suas extremidades do terminal C, e têm uma cadeia de um açúcar ligada em N nessa posição da sequência, a muteína de interferon beta humano preferida da presente invenção é um polipeptídeo que contém uma sequência glicina-asparagina- isoleucina-treonina na sua extremidade do terminal C do interferon beta natural humano, tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 e tem uma cadeia de um açúcar ligada em N na posição da sequência.

[0026] Além disso, a muteína de interferon beta humano preferida da presente invenção é um polipeptídeo substancial- mente similar ao polipeptídeo que contém a sequência de aminoácidos inteira de SEQ ID NO: 1 ou uma parte essencial dela (correspondente ao polipeptídeo (c) acima). Tal polipeptídeo contém duas cadeias de açúcar ligadas em N: uma localizada na sequência glicina-asparagina-isoleucina-treonina da sua extremidade do terminal C, e a outra localizada na 25ª à 28ª sequências de

aminoácidos de SEQ ID NO: 1, consistindo em asparagina-glicina-treonina/serina-leucina, que é modificada substituindo o 27° aminoácido arginina de SEQ ID NO: 1 por treonina ou serina.

[0027] A forma mais preferida nas muteínas de interferon beta humano da presente invenção é um polipeptídeo que contém uma cadeia de um açúcar ligada em N na posição onde o 27º aminoácido arginina de SEQ ID NO: 1 é substituído por treonina ou serina, e contém outra cadeia de açúcar ligada em N na posição onde a sequência glicina-asparagina-isoleucina- treonina é adicionada à sua extremidade do terminal C.

[0028] Os exemplos da presente invenção, que se seguem, indicam que a muteína de interferon beta humano, introduzida com duas cadeias de um açúcar adicionais, apresenta outra atividade melhorada ou aumentada em comparação com a muteína de interferon beta humano, introduzida com apenas uma cadeia de açúcar adicional, em comparação com o interferon beta natural (vide Exemplos 5 e 6 e Figuras 7 a 10).

[0029] Enquanto isso, a muteína de interferon beta humano da presente invenção pode ser definida como um polipeptídeo que apresenta a atividade de interferon beta humano, como um dos seguintes polipeptídeos, que é introduzida com uma cadeia adicional de um açúcar ligada em N na posição onde as 25ª à 28ª sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que consiste em asparagina-glicina-treonina/serina-leucina, são conservadas:

(a) um polipeptídeo que contém a sequência de aminoácidos inteira de SEQ ID NO: 2;

(b) um polipeptídeo que inclui uma parte essencial da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; e

(c) um polipeptídeo substancialmente similar ao polipeptídeo (a) ou (b).

[0030] A expressão "as 25ª à 28ª sequências de amino- ácidos de SEQ ID NO: 2 que consistem em asparagina-glicina-

treonina/serina-leucina, são conservadas", como aqui utilizada, inclusive nas reivindicações, significa que as 25ª à 28ª sequências de aminoácidos, que consistem em asparagina-glicina-treonina/ serina-leucina, devem estar presentes no polipeptídeo (b) ou (c) (isto é, o polipeptídeo que inclui uma parte essencial da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou o polipeptídeo substancial- mente similar à sequência de aminoácidos inteira (SEQ ID NO: 2) ou uma parte essencial dela).

[0031] Quando a muteína de interferon beta humano da presente invenção é definida de uma maneira diferente daquela descrita acima, a muteína de interferon beta humano preferida da presente invenção é um polipeptídeo que contém a sequência de aminoácidos inteira de SEQ ID NO: 2, que é introduzida com uma cadeia de um açúcar adicional ligada em N na posição das 25ª à 28ª sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que consistem em asparagina-glicina-treonina/serina-leucina.

[0032] A sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 é a sequência que tem o 27º aminoácido arginina na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 substituído por treonina ou serina.

[0033] Enquanto isso, o termo "polipeptídeo que inclui uma parte essencial da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2" ou "polipeptídeo substancialmente similar à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou uma parte essencial dela" tem o mesmo significado que aquele descrito acima.

[0034] Em outra modalidade, a presente invenção refere-se a um polinucleotídeo que codifica a muteína de interferon beta humano como descrita acima.

[0035] O termo "muteína de interferon beta humano como descrita acima" inclui as muteínas de interferon beta humano da presente invenção como definidas acima com duas maneiras diferentes e todas modalidades preferidas de cada uma delas.

[0036] Quando dada uma certa sequência de amino- ácidos, os versados nessas técnicas conseguem sintetizar facilmente um polinucleotídeo que codifica a certa sequência de aminoácidos, baseado na dada sequência, empregando suas técnicas convencionais .

[0037] O termo "polinucleotídeo", como aqui utilizado, é definido como incluindo todo RNA ou DNA de filamento único ou filamento duplo ou um polímero dele.

[0038] Enquanto isso, quando se considera a atividade, o polinucleotídeo acima é preferível que seja um polipeptídeo que codifica a muteína de interferon beta humano, que é introduzida com uma sequência glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina na extremidade do terminal C do interferon beta natural humano, que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ 1D NO: 1 ou um polinucleotídeo que codifica a muteína de interferon beta humano, que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ 1D NO: 2. Mais preferivelmente, o polinucleotídeo é um polinucleotídeo que codifica a muteína de interferon beta humano, que é introduzida com a sequência glicina-asparagina-isoleucina- treonina-valina na extremidade do terminal C do interferon beta natural humano, que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ 1D NO: 1, e tem a substituição do 27º aminoácido arginina por treonina ou serina.

[0039] Em outra modalidade, a presente invenção refere-se a um vetor de expressão de célula animal que compreende o polinucleotídeo descrito acima, que é capaz de expressar a muteína de interferon beta humano da presente invenção na célula animal.

[0040] A muteína de interferon beta humano da presente invenção inclui uma ou duas cadeias adicionais de açúcar em comparação com o interferon beta natural humano. Quando se considera o fato de que a adição de tal cadeia de um açúcar é um fenômeno que ocorre genericamente em uma célula animal, o vetor de expressão de células animais compreende fundamentalmente:

(i) o polipeptídeo que codifica a muteína do interferon beta humano como descrita acima;

(ii) um promotor ligado operacionalmente à sequência de (i) que gera uma molécula de RNA;

(iii) um polinucleotídeo que codifica uma sequência-líder;

(iv) uma origem de replicação; e

(v) a região 3' não-traduzida (3'-UTR) que causa a poliadenilação da extremidade do terminal 3' da molécula deRNA.

[0041] O promotor empregável na presente invenção significa a sequência capaz de ativar a transcrição, que é bem conhecido nessas técnicas. Similarmente, a sequência-líder que leva à translocação de uma proteína traduzida dentro do retículo endoplasmático, onde a glicosilação ocorreu, e 3'-UTR capaz de estabilizar a sequência-líder e o RNAm são bem conhecidas nessas técnicas.

[0042] Enquanto isso, o vetor de expressão da presente invenção pode compreender seletivamente um gene-repórter (por exemplo, luciferase e β-glicuronidase) ou um gene de resistência a antibiótico como um marcador seletivo (como por exemplo, neomicina, carbenicilina, canamicina, espectinomicina, higromicina), e pode compreender ainda um intensificador.

[0043] Enquanto isso, o vetor de expressão de células animais empregável na presente invenção inclui pSV2-neo (Southern e Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341 (1982)), pCAGGS (Niwa et al., Gene 108:193-200 (1991)),pcDL-SRa296 (Takebe et al., Mol. Cell Biai. 8:466-572 (1988)), pAc373 (Luckow et al., Bio/Technology 6:47-55 (1988), e tais vetores listados acima podem compreender um promoter, uma seqüência-líder, uma origem de replicação, 3'-UTR, um gene-repórter, um gene marcador seletivo e/ou um intensificador descritos acima em demandas de ocasião.

[0044] Em outra modalidade, a presente invenção refere-se a uma célula animal transformada com o vetor de expressão e um

método para a produção de uma muteína de interferon beta humano, cultivando a célula animal.

[0045] O termo "transformação", aqui utilizado, significa a modificação do genótipo da célula hospedeira, introduzindo um polinucleotídeo estranho (na presente invenção, isto significa um polipeptídeo que codifica a muteína de interferon beta humano), e significa a introdução de um polinucleotídeo estranho dentro de uma célula hospedeira, independentemente do método de transformação utilizado. O polinucleotídeo estranho introduzido dentro do genoma de uma célula hospedeira pode ser mantido com ou sem a integração dentro do genoma da célula hospedeira, e a presente invenção inclui ambos casos.

[0046] Enquanto isso, o termo "célula animal", aqui utilizado, inclui todas células animais e células de insetos empregáveis na produção de uma proteína recombinante. As células animais exemplificativas, empregáveis na presente invenção, incluem células COS, células CHO, células C-127, células BHK, células HepG2 do rato, hepatócitos do camundongo, células DUKX, células 293, e assim por diante, e a célula de inseto é exemplificada por uma célula de cultura do bicho-da-seda.

[0047] Em outra modalidade, a presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende a muteína de interferon beta humano de acordo com a presente invenção.

[0048] O interferon beta humano incluído na composição farmacêutica da presente invenção tem sido usado genericamente como um agente terapêutico para esclerose múltipla, as relatou-se também que ele pode ser usado para tratar câncer, distúrbios auto-imunes, infecções virais, doenças relacionadas ao HIV e hepatite C (Pilling et ai., Eur. J. lmmunol. 29:1041-1050 (1999)), e seu efeito farmacológico tem sido continuamente descoberto.

[0049] Portanto, o efeito farmacológico na composição farmacêutica da presente invenção deve ser entendido como incluindo todos efeitos farmacológicos que estão sendo apresentados pelo interferon beta humano, bem como o efeito·farma-cológico como um agente terapêutico para esclerose múltipla.

[0050] Além disso, tal efeito farmacológico deve ser entendido como incluindo qualquer efeito farmacológico que será descoberto no futuro, bem como os efeitos farmacológicos relatados até agora como o efeito farmacológico do interferon beta humano.

[0051] Como a composição farmacêutica da presente invenção é caracterizada por compreender a muteína de interferon beta humano, tendo atividade melhorada ou aumentada ou a capacidade de ser preparada de acordo com o método da presente invenção, embora a composição farmacêutica da presente invenção possa incluir qualquer efeito farmacológico de interferon beta humano que será descoberto no futuro, bem como seus efeitos farmacológicos relatados até agora, o âmbito da presente invenção não deve ser ampliado indevidamente .

[0052] Contudo, quando se considera o fato de que o interferon beta humano tem sido amplamente usado como um agente terapêutico para esclerose múltipla e seus efeitos terapêuticos para câncer, distúrbios auto-imunes, infecções virais, doenças relacionadas ao HIV e hepatite C, foram descobertos anteriormente, o efeito farmacológico acima é preferido para ser tais efeitos farmacológicos.

[0053] Enquanto isso, a composição farmacêutica da presente invenção pode ser administrada por intermédio de várias vias de administração, incluindo a introdução oral, transdérmica, subcutânea, intravenosa e intramuscular.

[0054] A composição farmacêutica desta invenção pode ser formulada em vários tipos de formulações de acordo com qualquer um dos procedimentos convencionais. Ao preparar a formulação, o ingrediente

ativo é, de preferência, misturado ou diluído com diluentes tais como cargas, expansores, aglutinantes, agentes umectantes, desintegradores, e surfactantes ou excipientes.

[0055] Para tratar um paciente humano, uma dose diária típica da composição farmacêutica desta invenção pode ficar na faixa entre cerca de 0,01 e 5 mg/kg de peso corporal, e pode ser administrada em uma dose única ou em doses divididas.

[0056] Entretanto, deve-se entender que a quantidade do ingrediente ativo realmente administrada deve ser determinada à luz de vários fatores relevantes que incluem a condição a ser tratada, a via de administração escolhida, a idade, o sexo e o peso corporal do paciente individual, e a gravidade do sintoma do paciente; e, portanto, não se pretende que a dose acima limite de forma alguma o âmbito da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0057] A Figura 1 é a sequência de nucleotídeos de um gene que codifica o interferon beta humano, e a sequência de aminoácidos codificada nele. A sequência de aminoácidos que está sendo substituída artificialmente está representada como uma caixa.

[0058] A Figura 2 é um esquema que ilustra o procedimento de modificar artificialmente o gene que codifica o interferon beta humano em um sítio específico por mutagênese direcionada a sítio. Na primeira etapa, o par de iniciadores sintetizados se liga ao sítio específico da sequência· de nucleotídeos e sintetiza um novo gene que tem a sequência de nucleotídeos substituída pela ação de DNA polimerase. Na segunda etapa, o gene-modelo de interferon beta metilado dentro da mistura da reação de polimerase em cadeia (PCR), contendo o gene de interferon beta recém-sintetizado, é removido tratando com a enzima de restrição Dpnl, e a mistura da PCR resultante é transformada dentro de E. coli.

[0059] A Figura 3 é um esquema que ilustra o procedimento para montar o vetor de expressão pcDNA3.1-IFN-P para a expressão de uma muteína de interferon beta humano.

[0060] A Figura 4 é um esquema que ilustra o procedimento para co-transfectar o vetor de expressão pcDNA3.1-IFN-P e psp72-DHFR para dentro de uma célula animal, para a expressão de uma muteína de interferon beta humano.

[0061] A Figura 5 ilustra o resultado da análise Western blot da expressão de muteínas de interferon beta em células COS. Além disso, ela ilustra também o resultado da análise Western blot das muteínas após o tratamento com N- glicanase. Um anticorpo monoclonal específico para interferon beta humano é usado como anticorpo primário e um anticorpo leporídeo anti-imunoglobulina do camundongo, conjugado com HRP, é usado como anticorpo secundário.

[0062] A Figura 6 ilustra o resultado da análise SDS-pAGE das muteínas de interferon beta purificadas a partir de uma cultura em solução de células CHO.

[0063] A Figura 7 ilustra o resultado da comparação das atividades antivirais das muteína de interferon beta expressadas em células CHO com aquela do interferon beta natural.

[0064] A Figura 8 ilustra o resultado da comparação do efeito inibitório sobre o crescimento celular das muteínas de interferon beta expressadas em células CHO com aquela do interferon beta natural.

[0065] A Figura 9 ilustra o resultado da medição dos efeitos imunorreguladores das muteínas de interferon beta expressadas em células CHO, e do interferon beta natural através da ativação de MHC classe I em células A549, e comparando-os.

[0066] A Figura 10 ilustra as concentrações sangüíneas residuais das muteínas de interferon beta expressadas em células CHO e de interferon beta natural em ratos no decorrer do tempo.

[0067] Os exemplos que se seguem pretendem ilustrar ainda mais a presente invenção e eles não devem ser interpretados como limitativos do âmbito da invenção.

Exemplo 1: Síntese de um gene que codifica uma muteína de interferon beta humano, que tem uma ou mais sequências adicionais Asn-X-Ser/Thr por intermédio de mutagênese

[0068] Para transformar artificialmente R27 (o 27º aminoácido da sequência, arginina) da sequência de aminoácidos de interferon beta humano (IFN-P) representada por SEQ ID NO: 1 (Figura 1) em treonina (T) ou serina (S), ou para adicionar uma sequência glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina (G-N-I- T-V) à extremidade do terminal C de IFN-P, foram conduzidas a mutagênese direcionada a sítio e a síntese do DNA, usando um gene que codifica o interferon beta natural de SEQ ID NO: 3 como modelo.

[0069] A saber, uma série de pares de iniciadores foi sintetizada direcionando para o sítio a ser submetido à mutagênese. Nesta hora, os pares de iniciadores, usados na PCR de sobreposição para sintetizar um gene que codifica uma muteína de interferon beta, foram os seguintes:

i) um par de iniciadores para sintetizar R27T

R27T-5': GCAATTGAATGGGACGCTTGAATACTGCCTC (SEQ ID NO: 4)

R27T-3': GAGGCAGTATTCAAGCGTCCCATTCAATTGC (SEQ ID NO: 5)

(ii) um par de iniciadores para sintetizar R27S

R27S-5': GCAATTGAATGGGAGTCTTGAATACTGCCTC (SEQ ID NO: 6)

R27S-3': GAGGCAGTATTCAAGACTCCCA TTCAATTGC (SEQ ID NO: 7)

(iii) um par de iniciadores para sintetizar GNITV

GNITV-5': CTTACAGGTTACCTCCGAAAC GGTAATATCACTGTCTGAAGATCTCCTAGCCTGTCC (SEQ IDNO: 8)

GNITV-3': GAATGTCCAATGGAGGCTTTG CCATTATAGTGACAGACTTCTAGAGGATCGGACAGG (SEQ IDNO: 9).

(onde R27T e R27S são os genes que codificam muteínas de interferon beta que têm a substituição de arginina na 27ª posição por treonina e serina, respectivamente, através da mutagênese de um gene de ínterferon beta, e GNITV é o gene que codifica a muteína de interferon beta à qual foi adicionada uma sequência glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina (G-N-I-T-V) à sua extremidade do terminal C através da mutagênese de um gene de interferon beta; os que se seguem são iguais).

[0070] Como ilustrado na Figura 2, a PCR foi conduzida usando o vetor plasmídico pGEM-T Easy (Promega, EUA), contendo o gene que codifica interferon beta como modelo, dos pares de iniciadores e sobreposição, e a DNA polimerase Pfu-turbo. A solução da PCR foi preparada misturando 5 μL da uma solução de tampão de reação 10x, 5 a 50 ng de um gene-modelo, 125 ng de cada um dos pares de iniciadores e 1 μL de uma mistura de dNTP, e seu volume final foi ajustado para 50 μL com água ultrapura, e depois adicionou-se 1 μL de DNA polimerase Pfu-turbo (2,5 U/μL). As condições da PCR foram as seguintes: 12 ciclos de 30 segundos a 95°C, 60 segundos a 55°C e 480 segundos a 68°C, depois de uma desnaturação de 30 segundos a 95°C.

[0071] O produto da PCR foi tratado com 1 μL de Dpnl (10 U/μL) a 37°C por 4 h, para remover o gene-modelo metilado. Depois de adicionar 1 μL do produto da PCR tratado com Dpnl a células de E. coli coradas com azul XL1 fundidas sobre gelo, a mistura foi aquecida a 42°C por 45 segundos e resfriada com gelo. As células de E. coli assim preparadas foram colocadas em suspensão em 500 μL de um meio de cultura, incubadas a 37°C por uma hora, e submetidas a uma centrifugação para colher as células. As células assim colhidas foram espalhadas sobre uma

placa de ágar LB, incubadas a 37°C por 16 h ou mais, até que fosse gerada uma colônia. Depois disso, o DNA plasmídico foi purificado a partir da colônia, o gene que codifica uma muteína de interferon beta foi submetido a uma análise de sequenciamento, usando um sequenciador de DNA. Como resultado, o 27º aminoácido foi transformado no códon que codifica treonina (R27T) ou serina (R27S) por intermédio de mutagênese direcionada a sítio. Além disso, o códon que codifica a sequência de aminoácidos (GNITV) que consiste em glicina-asparagina- isoleucina-treonina-valina foi adicionada à extremidade do terminal C do interferon beta natural. Os plasmídeos que contêm o gene assim preparado foram designados pGEMT-IFN-j3-R27T, pGEMT-IFN-j3-R27S e pGEMT-IFN-j3-GNITV, respectivamente.

[0072] A PCR foi realizada usando pGEMT-IFN-j3-R27T e pGEMT-IFN-j3-R27S como modelo, o par de iniciadores em sobreposição (iii) específico para GNITV e DNA polimerase Pfu-turbo, sob as mesmas condições, e o produto da PCR assim ampliado foi submetido à clonagem como descrito acima. Como resultado, o gene que tem a substituição de alanina na 27ª posição por treonina ou serina, e a adição do códon que codifica a sequência de aminoácidos que consiste em glicina-asparagina- isoleucina-treonina-valina foi obtida. Os plasmídeos que contêm tal gene foram designados pGEMT-IFN-j3-R27T+GNITV e pGEMT-IFN-j3-R27S+NITV.

[0073] A Tabela 1 indica os plasmídeos inseridos com genes da muteína de interferon beta 5, preparados de acordo com a presente invenção, respectivamente.

Tabela 1

Genes de Muteínas de Interferon Beta

Plasmídeo	Substituição de aminoácido	Substituição e adição
pGEMT-IFN-P-R27T	R27T	AGG ACG
pGEMT-IFN-P-R27S	R27S	AGG AGT
pGEMT-IFN- -GNITV	GNITV	+GGTAATATC ACTGTC
pGEMT-IFN-P-R27T+GNITV	R27T+GNITV	AGG ACG +GGTAATATC ACTGTC
pGEMT-IFN-P-R27S+GNITV	R27S+GNITV	AGG AGT +GGTAATATC ACTGTC

Exemplo 2: Construção de um Vetor de Expressão, Transfecção para dentro de Células COS e Cultura de Células

[0074] A PCR foi conduzida usando cada um dos plasmídeos que contêm a muteína de interferon beta preparada no Exemplo 1 como modelo e um par de iniciadores de Pl (CCGGA ATTCGCCACCATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAAM SEQ ID NO: 1O) e P2 (CCGCTCGAGGTCACTTAAACAGCATCTG CTGGTTGA, SEQ 1D NO: 11), para obter os genes que codificam interferon beta substituído artificialmente (Figura 3).

[0075] Nesta hora, a DNA polimerase (Stratagene) foi empregada nesta PCR, e o gene ampliado tinha sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição EcoRI e Xhol em ambas das suas extremidades. O gene da muteína de IFN-P assim ampliado e pCDNA3. l (Invitrogen) foram tratados com EcoRl e Xhol, respectivamente. O gene da muteína de IFN-P linearizado e pcDNA3.1 foram recuperados a partir de um gel de agarose,

usando um kit de extração Qiagen, submetidos à ligação, e depois transformados em E. coli DH5a. O DNA plasmídico foi purificado a partir da colônia gerada depois de cultivar o

transformante de E. coli em um meio de ágar com LB-ampicilina, tratado com as enzimas de restrição EcoRI e Xhol, e depois, submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1%, para selecionar a colônia inserida com apenas o gene da muteína de IFN-p. Confirmou-se que o DNA plasmídico da colônia selecionada tinha a sequência de nucleotídeos do gene da muteína de IFN-P por análise de sequenciamento. Tal plasmídeo foi designado pCDNA3.1-IFN-P-X (onde X é um número de cada muteína de interferon beta).

[0076] Células COS (ATCC Nº CRL-1650) foram transfectadas com os vetores de expressão recombinantes correspondentes a interferon beta natural, muteínas de interferon beta R27T, R27S, R27T+GNITV e R27S+GNITV entre os vetores de expressão recombinantes preparados, respectivamente. A saber, as células COS pré-cultivadas foram inoculadas dentro de uma placa de cultura de tecidos de 60 mm em uma concentração de 2 x 105 células/mL e incubadas por 24 h. Cada DNA do vetor de expressão recombinante, 2 µg, e 7 µL de um reagente Lipofectin™ (Gibco BRL) foram adicionados a 100 µL de DMEM sem soro, respectivamente, e mantidos à temperatura ambiente por 15 min. Duas soluções assim preparadas foram misturadas entre si e mantidas à temperatura ambiente por 15 min, para formar um complexo lipofectina/DNA. Depois disso, um DMEM isento de soro foi adicionado ao complexo lipofectina/ DNA, a mistura foi colocada suavemente sobre as células COS cultivadas na placa, e a placa foi incubada em uma incubadora a 37°C e 5% de CO2 por 6 horas, para ocorrer a transfecção. As células COS transfectadas com cada vetor de expressão foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (JRH), 50 µg/mL de penicilina e 50 µg/mL de

estreptomicina a 37°C, 5% de CO2, por 48 h. Durante a cultivação, a solução de cultura condicionada foi coletada por 3 a 5 dias.

Exemplo 3: Caracterização da Muteína de Interferon beta

Exemplo 3-1: Confirmação da Adição da Cadeia de Açúcar

[0077] O sobrenadante que contém a interferon beta humano recombinante ou a muteína de interferon beta foi separado da solução de cultura das células COS preparadas no Exemplo 2. O sobrenadante (1~2 µg) foi misturado com um anticorpo policlonal leporídeo anti-interferon beta e submetido à imunoprecipitação à temperatura ambiente de um dia para o outro. A resina Proteína A Sefarose (20 a 80 µL), diluída com PBS (solução salina tamponada com fosfato) em um volume igual, foi adicionada ao sobrenadante que contém o anticorpo, e a mistura foi reagida à temperatura ambiente por uma hora. A mistura foi submetida à centrifugação para separar um agregado, e o agregado foi lavado com PBS. Uma parte do agregado foi tratada com N-glicanase, para cortar uma cadeia de açúcar ligada a N. Os agregados tratados com e sem N-glicanase foram submetidos a uma eletroforese em gel de 15% de SDS/ poliacrilamida. Os géis foram transferidos para cima de um membrana de nitrocelulose e submetidos à análise Western blot, usando um anticorpo monoclonal anti-interferon beta do camundongo, de acordo com o método descrito por Runkel et al., Pharm. Res. 15:641-649 (1998).

[0078] Como resultado da análise do sobrenadante das células COS transfectadas com cada uma das muteínas de interferon beta, confirmou-se que o peso molecular de protéico das muteínas de interferon beta aumenta em comparação com aquele do interferon beta natural (Figura 5). Quando a muteína de interferon beta com peso molecular protéico aumentado foi tratada com N-glicanase, sua cadeia de açúcar foi removida, o que resulta em peso molecular decrescente (Figura 5).

Exemplo 3-2: Comparação das Atividades de Muteínas de Interferon beta

[0079] Para comparar as atividades do interferon beta e das muteínas de interferon beta , a quantidade da proteína interferon foi quantificada por intermédio de EIA (imunoensaio de enzima), e as titulações do interferon beta natural e das muteínas de interferon beta foram medidas através de um teste de atividade antiviral.

[0080] O EIA foi realizado usando um kit (PBL) de acordo com as instruções do fabricante. A saber, 100 µL de uma solução diluidora foram distribuídos para cada poço especificado dentro de uma placa absorvedora de anticorpo incluída no kit de imunoensaio de enzima. Uma solução de padrão internacional e as amostras foram diluídas com uma solução diluidora em uma taxa de diluição apropriada, e 100 µL de cada um dos diluentes foram adicionados ao poço. A placa foi mantida à temperatura ambiente por uma hora. Nesta hora, a solução de padrão internacional foi preparada dissolvendo uma ampola do padrão internacional de IFN- (NIBSC em 1 mL de um tampão de formulação, e distribuindo 100 µL da solução resultante para um frasco. O frasco foi estocado a -70°C, e quando usado, o frasco congelado foi fundido e o conteúdo foi diluído adequadamente com uma solução diluidora antes do uso. Depois que a solução de reação residual foi removida de cada poço, a placa com poços foi lavada três vezes com 250 µL de uma solução de lavagem , e 100 µL de uma solução de conjugado enzima/anticorpo foram adicionados a cada poço. A placa de poços foi mantida à temperatura ambiente por uma hora. Depois de completada a reação, a solução da reação foi removida. A placa com poços foi lavada três vezes com 200 µL de uma solução de lavagem e a solução residual foi completamente removida dela. Uma solução colorante de substrato pré-preparada e 100 µL foram então adicionados a cada poço e reagidos à temperatura ambiente por 30 min. Depois de completada a reação, 100 µL de uma solução interruptora de reação foram adicionados a cada poço, para interromper e a absorvância foi medida a 450 nm. Uma curva- padrão foi desenhada plotando uma concentração da solução- padrão no eixo horizontal e

a absorvância (ASO nm) dela no eixo vertical, e a concentração de IFN-P humano correspondente a cada absorvância da solução de padrão internacional e das amostras foi calculada a partir da curva-padrão. O valor médio de três concentrações diluentes foi determinado multiplicando a concentração calculada por cada taxa de diluição, os valores medidos da solução do padrão internacional e das amostras foram calculados a partir dela, e depois, a concentração final foi calculada. O teste de atividade antiviral foi realizado de acordo com o mesmo método descrito no Exemplo 6. A razão da titulação antiviral para o volume de EIA nas várias soluções de cultura das células COS que expressam transientemente cada muteína de interferon beta está indicada na Tabela 2. A partir desses resultados, confirmou-se que o peso molecular o peso molecular da muteína de interferon beta aumenta devido à adição da cadeia de açúcar, e sua atividade também é igual ou mais alto do que aquela do interferon beta natural. Para a produção em massa de tal muteína de interferon beta, o vetor de expressão da muteína de interferon beta descrito acima foi transfectado para dentro da linhagem de células CHO.

Tabela 2

Aumento no Peso Molecular da Muteína de Interferon beta e a Razão da Titulação Antiviral para o Valor de EIA

Muteína Nº	Substituição de aminoácido	Aumento no peso molecular	Razão datitulação antiviral para valor de EIA
R27T	R27T	++	3
R27S	R27S	++	3
GNITV	GNITV	++	1,5
R27T+GNITV	R27T+GNITV	++++	4
R27S+GNITV	R27S+GNITV	++++	4

++: o peso molecular é 26 kDa com uma cadeia de açúcar adicionada a ela

++++: o peso molecular é 30 kDa com duas cadeias de um açúcar adicionada a ela

Exemplo 4: Transfecção de Cultura de Células (Células CHO)

[0081] Células CHO (DG44) foram desenvolvidas em uma placa de cultura de 60 mm até que sua confluência atingisse cerca de 40-80% (1~4 x 105/placa de 60 mm). Um reagente Lipofectin™ (3 µL) (Gibco) foi bem misturado com 97 µL de α- MEM (isento de soro e isento de antibióticos), e os plasmídeos pcDNA3.1-IFN- -X DNA (0,1 µg/µL ou mais, cerca de 2 µg) e pSP72-DHFR (0,2 µg) foram adicionados a ele. Depois, a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 30 min, e adicionada às células CHO cultivadas acima (Figura 4). Um dia depois, o meio de cultura foi substituído por alfa-MEM suplementado com 50 µg/mL de 0418 e 10% de FBS. Subsequentemente, as células foram cultivadas em meio alfa-MEM mínimo sem desoxirribonucleosídeo e ribonucleosídeo por 7-10 dias, para selecionar as células transfectantes. Depois disso, as células CHO DHFR + transfectantes foram selecionadas secundariamente. As células CHO DHFR + transfectantes selecionadas secundaria- mente foram submetidas a uma colonização sobre uma placa com 96 poços através de um método de diluição limitativa, e cultivadas continuamente em um meio seletivo. Finalmente, as células transfectantes foram cultivadas em um meio mínimo, contendo 10% de soro com concentração de MTX (metotrexato, Sigma) gradualmente crescente em 2 vezes a partir de 20 nM até 1.000 nM, para selecionar terciariamente clones resistentes a MTX, desenvolvidos no meio seletivo de MTX.

[0082] Uma única célula foi separada da linhagem de células sadias, desenvolvida no meio contendo 1 µM de MTX por pelo menos um mês. Em primeiro lugar, depois de inocular uma única célula dentro de cada poço de uma placa com 96 poços, e cultivar, o poço com apenas uma única célula foi selecionado. Um grupo de candidatos que apresentava uma alta taxa de expressão foi selecionado por intermédio de análise quantificadora

de EIA. O grupo candidato selecionado foi cultivado transferindo-o serialmente em uma placa de 24 poços para uma placa com 6 poços. O grupo de candidatos assim cultivado foi selecionado novamente por intermédio de análise quantificadora de EIA, para finalmente estabelecer uma linhagem de alta expressão de interferon beta. Como resultado da medição da quantidade de interferon beta produzida na linhagem de células CHO recombinantes assim preparada acima, enquanto a linhagem de células de interferon beta natural produziu 1,8 µg/mL/24 h de IFN-β, as linhagens de células CHO-R27T e CHO-R27T-GNITV, que expressam a muteína de interferon beta, produziram 6,5 µg/mL/24h de IFN-p e 7,0 µg/mL/24h de IFN-β, respectivamente, o que é o triplo da linhagem de células natural.

Exemplo 5: Purificação de interferon beta adicionado com uma ou mais cadeias de açúcar, produzido na linhagem de Células CHO

[0083] A linhagem de células incorporada com uma ou mais sequências de muteína no Exemplo 4 foi cultivada usando uma fábrica de células (Nunc, Nº do Catálogo: 170069). Cada linhagem de células de expressão foi diluída com alfa-MEM, contendo 10% de FBS em uma concentração de 5 x 104 células/mL, e subcultivada na fábrica de células a 5% de CO2, 37°C, por 72 horas, para confirmar um crescimento celular. As células foram lavadas três vezes com PBS para remover ao máximo o componente soro residual, e seu meio de cultura foi substituído por um meio isento de soro (Sigma C8730). Depois da substituição pelo meio isento de soro, a solução da cultura foi coletada a cada 24 h quatro vezes e o meio fresco isento de soro foi adicionado a ela cada vez para a coleta. As quatro soluções de cultura totais coletadas foram submetidas à purificação. A resina Sefarose azul (Amersham-Pharmacia) (200 mL) foi colocada dentro de uma coluna XK.50/20 (Amersham-Pharmacia) e equilibrada com 1O V.C. (volumes de coluna) de um tampão A (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,4). A

solução de cultura microfiltrada foi escoada para dentro da coluna equilibrada em uma vazão de 20 mL/min, e monitorada por um detector de UV em um comprimento de onda de 280 nm. Um tampão B (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1 M, 30% de etilenoglicol, pH 7,4) foi escoado para dentro da coluna para remover os componentes não-absorventes, e a proteína absorvida na resina foi eluída com um tampão C A (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1 M, 60% de etilenoglicol, pH 7,4). O efluente foi submetido a uma diálise com PBS (solução salina tamponada com fosfato), concentrado com um concentrador (Centricon, corte em 10.000), e depois, submetido novamente a uma diálise com PBS.

Exemplo 6: Caracterização físico-química de interferon beta adicionado com uma ou mais cadeias de açúcar, produzido na linhagem de células CHO

Exemplo 6-1: Análises SDS-PAGE e Western blot

[0084] A amostra purificada no Exemplo 5 foi misturada com um tampão de amostras 5x Tris-HCl 125 mM, 5% de SDS, 50% de glicerina, 0,1% de -mercaptoetanol, 1 mg/mL de azul de bromo-fenol) em uma razão 1:4, e a mistura foi pré- tratada a 95°C por 5 min. A mistura pré-tratada (20 µL) foi carregada dentro de uma placa de gel de poliacrilamida a 15% com um marcador de peso molecular padrão e desenvolvida. Depois de completada a eletroforese, o gelo foi corado com azul brilhante de Coomassie e descolorida com uma solução descolorizadora. Como resultado, o interferon beta natural apresentou cerca de 18,0 kDa de uma banda correspondente à proteína que não tem cadeia de açúcar, e cerca de 22,0 kDa de uma banda correspondente à proteína que tem uma cadeia de açúcar. No caso do IFN- com uma cadeia de açúcar adicional, cerca de 26,0 kDa de uma banda foi detectado adicionalmente, e no caso de IFN- com duas cadeias de açúcar adicionais, cerca de 30,0 kDa de uma banda foi detectado adicionalmente, comparado com o Pedrão de bandas do interferon beta natural (Figura 6).

Exemplo 6-2: Teste para confirmar a adição de ácido siálico à extremidade do terminal da cadeia de açúcar

[0085] O teor de interferon beta em todas proteínas purificadas foi medido usando um kit ELISA de IFN-í3 humano. O teor de ácido siálico em cada proteína foi medido modificando o método de Masaki et ai., Anal. Biachem. 300:260 (2002). O ácido siálico foi separado de uma glicoproteína reagindo a proteína purificada com ácido clorídrico 0,1 N a 80°C por uma hora. Algumas delas foram marcadas com fluoresceína usando um kit de marcação de fluorescência com ácido siálico (Takara) e submetidas a HPLC para analisar o teor. Os resultados estão indicados na Tabela 3, como proporção percentual do peso de ácido siálico na muteína de interferon beta, em comparação com aquela do interferon beta natural.

Tabela 3

Peso de Ácido Siálico na Muteína de Interferon beta

Interferon beta	Peso de ácido siálico/ peso de IFN-P
Natural	1,96±0,14
R27T, R27S	3,50 ± O,12
GNITV	3,23 ± 0,32
R27T+GNITV, R27S+GNITV	6,90 ± 0,25

Exemplo 7: Atividade Biológica de Muteína de Interferon beta Expressada em Células CHO

Exemplo 7-1: Atividades Antivirais das muteínas de Interferon beta R27T, R27S e GNITV

[0086] As atividades antivirais das muteínas de interferon beta R27T, R27+GNITV e GNITV e do interferon beta sem sua cadeia de açúcar (IFNβ-1b) foram comparadas relativamente entre si, baseado

na atividade antiviral do interferon beta natural (IFNβ-1a). Nesta hora, Rebif (Serono) foi empregado como interferon beta natural.

[0087] Células A549 cultivadas em MEM suplementado com 10% de FBS, 100x solução de aminoácido não-essencial e piruvato de sódio 100 mM. No dia dessa análise, as células forma transferidas para o mesmo meio fresco e sua densidade celular foi ajustada para 3 x 105 células/mL. Os interferons beta do teste e do controle foram diluídos com o mesmo meio. Tal diluição foi conduzida dentro de uma placa de 96 poços a ser contida no poço em uma volume de 100 µL/poço e as amostras foram diluídas serialmente em 2 vezes. Todas amostras foram preparadas em dois conjuntos. Os poços de controle, contendo apenas 100 µL do meio (sem interferon beta), foram incluídos nelas. Depois disso, 100 µL das células foram adicionados a cada poço, e a placa com poços foi incubada a 37°C, 5% de CO2, por 20 h. O meio foi removido da placa e 100 µL de EMCV (1.000 TCID50/mL), diluído com o mesmo meio, foram adicionados a cada poço. Depois disso, a placa foi incubada a 37°C, 5% de CO2, por 22 h, o meio foi removido dela, e a placa foi corada com violeta cristal. Depois de remover o corante, 100 µL de 2-metóxi-etanol foram adicionados a ela para extrair o corante, e a absorvância foi medida a 450 nm para determinar a atividade antiviral.

[0088] Quando se removeu do interferon beta sua cadeia de açúcar (IFN -lb), ele apresentou uma atividade relativamente baixa sob as mesmas condições, e R27T, R27T+GNITV e GNITV apresentaram atividades mais altas do que o interferon beta natural (IFN -la; Rebit). R27T+GNITV com duas cadeias de açúcar adicionais apresentou atividade 4 vezes mais alta do que o interferon beta natural, e R27T com uma cadeia de açúcar adicional apresentou uma atividade 3 vezes mais alta do que o mesmo (Figura 7).

Exemplo 7-2: Inibição do Crescimento Celular

[0089] Além disso, os efeitos das muteínas de interferon beta sobre o crescimento celular foram examinados, e comparados relativamente entre si, baseado no efeito do interferon beta natural (IFN β-1a) igual à atividade antiviral. Nesta hora, Rebif (Serona) foi empregado como interferon beta natural. A atividade antiproliferativa foi medida usando células Daudi.

[0090] As células Daudi foram cultivadas em RPMI 1650 suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, glutamina 2 mM e 10% de FBS. Os interferons beta do teste e do controle foram diluídos serialmente em 2 vezes com RPMI 1640 contendo 10% de FBS dentro de uma placa com 96 poços, a ser contido no poço em uma volume de 100 µL/poço. Todas amostras foram preparadas em dois conjuntos. As células foram adicionadas a uma placa com 96 poços em uma concentração de 1 x 104 células/poço, e a placa com poços foi incubada a 37ºC, 5% de C0 2, por 40 a 48 h. Subsequentemente, 50 µL do meio contendo 1 µCi de 3[H]-timidina foram adicionados a cada poço, e a placa com poços foi incubada por 6h. As células foram colhidas e sua quantidade incorporada de radiatividade foi medida.

[0091] As muteínas de interferon beta suprimiram o crescimento de células Daudi e suas atividades eram dependentes da dose. O interferon beta que teve sua cadeia de açúcar removida (IFN -1b) apresentou atividade antiproliferativa mais baixa do que o interferon beta natural (IFN -1a), enquanto que as muteínas de interferon beta R27T, R27T+GNITV e GNITV apresentaram atividade mais alta do que o mesmo. As atividades das niuteínas de interferon beta foram ranqueadas na ordem de R27T+GNITV, R27T e GNITV (Figura 8).

Exemplo 7-3: Capacidade Imunorreguladora

[0092] As capacidades imunorreguladoras do interferon beta natural e das suas muteínas foram medidas através da ativação de MHC classe I em células A549.

[0093] Células A549 foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de FBS e glutamina 2 mM. As células foram inoculadas dentro do meio contendo interferon beta natural, suas muteínas ou interferon beta do qual se removeu sua cadeia de açúcar (IFN -1b), diluídas serialmente duas vezes, em uma densidade de 1 x 105 células/mL, respectivamente, e incubadas a 37°C, 5% de CO2, por 48h. As células foram tratadas com uma solução de sal tamponada de Hank, contendo EDTA 5 mM e colhidas por centrifugação. O agregado assim preparado foi colocado em suspensão em uma tampão de FACS em uma densidade de 2 x 107 células/mL, e sua quantidade de expressão de MHC classe I foi medida por análise FACS. Um anticorpo anti-HLA ABC acoplado com biotina e estreptavidina acoplada com fluoresceína foi empregado nesta medição, e todas amostras foram preparadas em dois conjuntos.

[0094] Os efeitos da intensificação de imunidade das muteínas de interferon beta foram similares ou ligeiramente mais altos do que o do interferon beta natural (IFNβ-1a). Tais efeitos das muteínas de interferon beta foram aumentados na ordem de GNITV, R27T e R27T+GNITV, que é igual às duas atividades diferentes descritas acima. O interferon beta sem qualquer cadeia de açúcar adicional apresentou efeito imunorregulador baixo em comparação com sua concentração (Figura 9).

[0095] Exemplo 7-4: Estudo da Constante Farmacocinética

[0096] O teste de atividade in vivo foi conduzido de acordo com o método que mede a mudança na concentração sanguínea da muteína de interferon beta dependendo do tempo no rato que recebeu administração da muteína de interferon beta que foi expressada em células

CHO. Ratos Hsd:Sprague-Dawley fêmeas com um peso corporal médio de 246,3 ± 258,1 g foram empregados neste teste de atividade in vivo, e eles foram aclimatados por uma semana no ambiente da gaiola a uma temperatura de 24 ± 1ºC, umidade relativa de 55% e uma condição de iluminação de 12 h de iluminação e 12 h de escuridão. Os ratos foram alimentados na mesma gaiola durante o experimento.

[0097] Depois de pesar os ratos e distribuí-los aleatoriamente de acordo com sues pesos corporais médios, eles foram divididos em quatro grupos de administração de interferon beta natural, duas muteínas e nenhum fármaco, respectivamente, cada grupo tendo 4 ratos. Um cateter foi inserido na veia jugular dos ratos por uma operação cirúrgica 2 dias antes do experimento. O peso corporal médio dos ratos com cateter inserido era de 253,5 g.

[0098] O interferon beta natural e cada muteína de interferon beta foram injetados nos ratos por meio da veia da cauda como uma amostra do teste. O cateter na veia jugular foi lavado com solução salina antes da coleta do sangue, e 0,3 mL de sangue foi coletado no período de tempo correspondente a 1, 5, 15, 30, 75, 180, 300 e 480 min depois da injeção. Depois da coleta de sangue, o cateter foi enchido com solução de heparina (50 UI/mL) para impedir entupimento. As amostras do sangue coletado foram tratadas imediatamente com uma solução de citrato de sódio a 4% como um anticoagulante para impedir a coagulação, e submetidas a uma centrifugação para separar o plasma exceto os hemócitos. O plasma separado foi estocado a - 70°C. A concentração sanguínea do interferon beta na cobaia foi medida por um teste antiviral. A Figura 1O ilustra as concentrações sangüíneas da muteína de interferon beta e do interferon beta natural que permaneciam no decurso do tempo. Além disso, as constantes farmacocinéticas foram calculadas a partir dessas concentrações sangüíneas residuais.

[0099] Os resultados estão indicados na Tabela 4. As muteínas de interferon beta R27T+GNITV e R27S+GNITV com introdução de duas cadeias de açúcar adicionais apresentaram meia-vida prolongada em 3 vezes em comparação com o interferon beta natural, e as muteínas de interferon beta R27T, R27S e GNITV com uma cadeia de açúcar introduzida apresentaram meia-vida prolongada em 3 vezes em comparação com o interferon beta natural.

Tabela 4

Meias-vidas de Muteínas de Interferon beta e Interferon beta Natural em Ratos

Amostra	Auc* (h.UI/mL)	Tempo médio de retenção (h)	Vss (mL/kg)	Taxa de depuração (mL/kg/h)	Meia-vida (h)
R27T	203966	0,726214	65,0	100,1	2,48
GNITV	190610	0,647452	74,4	114,9	2,46
R27T+GNI TV	316807	0,952376	45,1	60,5	3,50
Natural	116807	0,512376	96,1	187,5	1,13

[00100] Como descrito acima, de acordo com a presente invenção, podem ser fornecidas muteínas de interferon beta com atividade ou capacidade melhorada ou aumentada em comparação com o interferon beta natural.

[00101] Como as muteínas de interferon beta da presente invenção contêm ainda uma ou mais cadeias adicionais de um açúcar, em comparação com o interferon beta natural, elas apresentam atividade antiviral melhorada ou aumentada, atividade inibitória do crescimento celular, capacidade imunorreguladora, e meia-vida prolongada. Isto significa que elas são capazes de reduzir uma dose e o número de injeções de interferon beta humano.

[00102] Ao mesmo tempo, de acordo com a presente invenção, também são fornecidos um gene que codifica a muteína de interferon beta, um vetor de expressão de células animais que contém o gene, uma célula animal transfectada com o vetor de expressão, um método para preparar a muteína de interferon beta cultivando a célula animal, e uma composição farmacêutica que compreende o interferon beta humano.

[00103] Embora a invenção tenha sido descrita com relação às modalidades específicas, deve-se reconhecer que várias modificações e mudanças podem ser feitas na invenção pelos versados nessas técnicas, que também caem dentro do âmbito da invenção como definida pelas reivindicações apensadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Muteína de interferon-beta humano, **caracterizada** por consistir em SEQ ID No: 1 contendo a inserção da sequência GNITV na porção C-terminal e tendo uma cadeia de açúcar ligada a N da sequência GNITV.

2. Muteína humana de interferon-beta, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por compreender ainda a mutação R27T ou R27S em relação à SEQ ID NO: 1 e conter uma cadeia de açúcar adicional ligada a N na sequência NG[T,S]L associada a essas mutações.

3. Muteína de interferon-beta humano, **caracterizada** por consistir em SEQ ID No: 1 contendo a mutação R27T ou R27S e contendo uma cadeia de açúcar ligada a N na sequência NG[T,S]L associada a essas mutações.

4. Polinucleotídeo, **caracterizado** por compreender a SEQ ID No:3 contendo uma das seguintes modificações:

a) a inserção dos nucleotídeos ggtaatatcactgtc na posição 499 a 513;

b) a mutação G80C;

c) a mutação G81T;

d) a inserção de nucleotídeos ggtaatatcactgtc na posição 499 a 513 e a mutação G80C;

e) a inserção de nucleotídeos ggtaatatcactgtc na posição 499 a 513 e a mutação G81T; e suas sequências degeneradas que codificam uma das muteínas de interferon-beta humano das reivindicações 1 a 3.

5. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a muteína humana de interferon-beta inclui a sequência glicina-asparaginaisoleucina-treonina-valina na região C-terminal da sequência de aminoácido SEQ ID Nº 1.

6. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a muteína humana de interferon-beta é uma

muteína de interferon-beta humana que inclui a sequência de aminoácido SEQ ID Nº 2.

7. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a muteína humana de interferon-beta e' uma muteína de interferon-beta humana que inclui uma sequência glicina-asparagina-isoleucina-treoninavalina na região C-terminal da sequência de aminoácido SEQ ID Nº 2.

8. Vetor de expressão que expressa uma muteína de interferon-beta humano em uma célula de animal, **caracterizado** pelo fato de compreender um polinucleotídeo conforme definido na reivindicação 4.

9. Método para a preparação de uma muteína humana de interferon-beta, **caracterizado** pelo fato de que compreende a etapa de cultura de uma célula de origem animal transfectada pelo vetor de expressão conforme definido na reivindicação 8.

10. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de compreender qualquer uma das muteínas humanas de interferon-beta conforme definidas nas reivindicações de 1 a 3.

11. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de que demonstra um efeito farmacológico de interferon-beta natural humano.

12. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada** pelo fato de possuir um efeito farmacológico de interferon-beta natural humano, em que o dito efeito farmacológico está em prevenir ou tratar doenças selecionadas do grupo que consiste em esclerose múltipla, câncer, distúrbios autoimunes, infecções virais, doenças relacionadas com HIV e hepatite C.

Fig.1

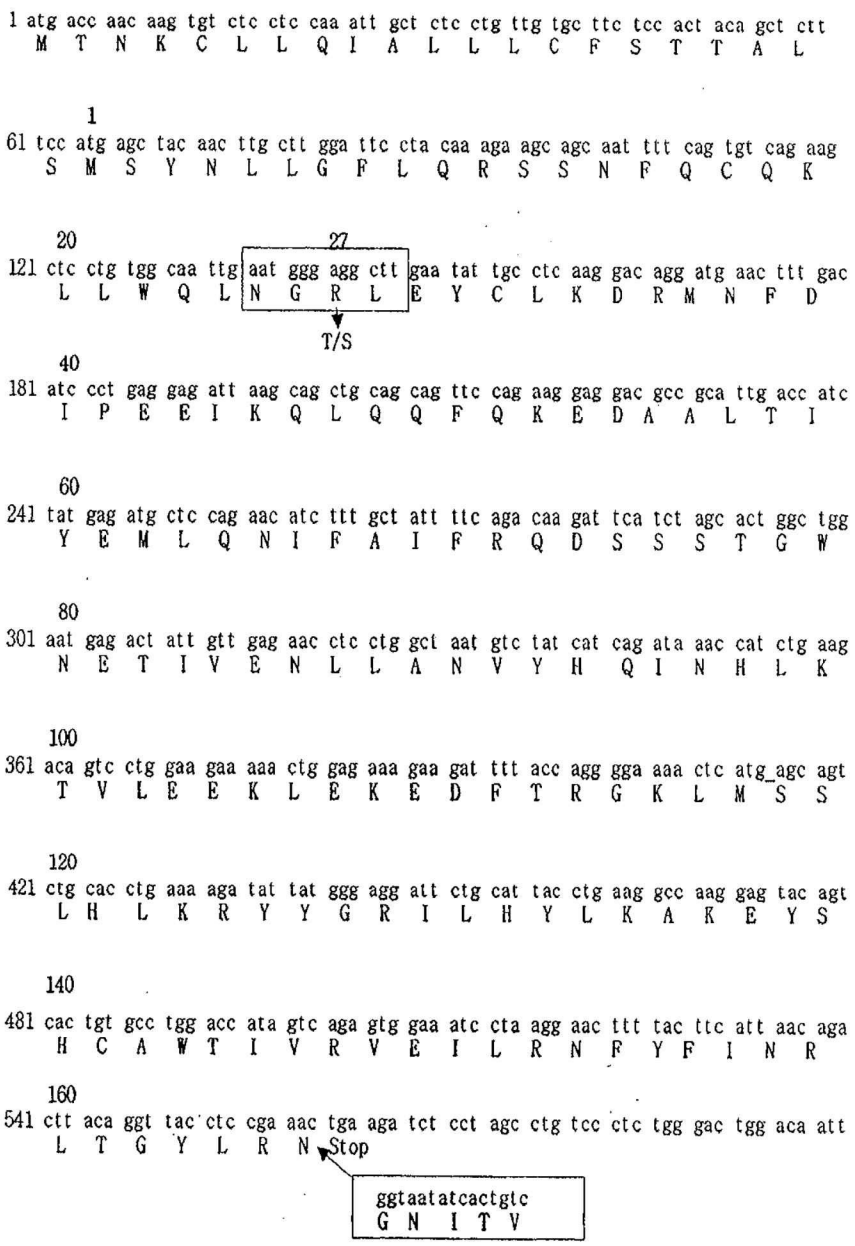

1 atg acc aac aag tgt ctc ctc caa att gct ctc ctg ttg tgc ttc tcc act aca gct ctt
M T N K C L L Q I A L L L C F S T T A L
1
61 tcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag
S M S Y N L L G F L Q R S S N F Q C Q K
20
27
121 ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg ctt gaa tat tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac
L L W Q L N G R L E Y C L K D R M N F D
T/S
40
181 atc cct gag gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc
I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A L T I
60
241 tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct agc act ggc tgg
Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S T G W
80
301 aat gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat gtc tat cat cag ata aac cat ctg aag
N E T I V E N L L A N V Y H Q I N H L K
100
361 aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag aaa gaa gat ttt acc agg gga aaa ctc atg agc agt
T V L E E K L E K E D F T R G K L M S S
120
421 ctg cac ctg aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt
L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K E Y S
140
481 cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt tac ttc att aac aga
H C A W T I V R V E I L R N F Y F I N R
160
541 ctt aca ggt tac ctc cga aac tga aga tct cct agc ctg tcc ctc tgg gac tgg aca att
L T G Y L R N Stop
ggtaatatcactgtc
G N I T V

Fig.2

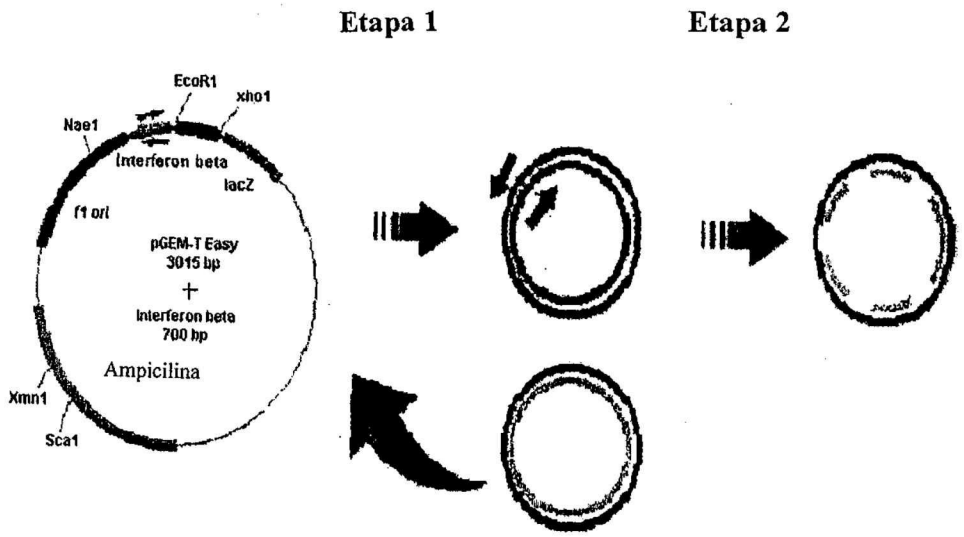

Etapa 1
Etapa 2
EcoR1
xho1
Nae1
Interferon beta
lacZ
f1 ori
pGEM-T Easy
3015 bp
+
Interferon beta
700 bp
Ampicilina
Xmn1
Sca1

Fig.3

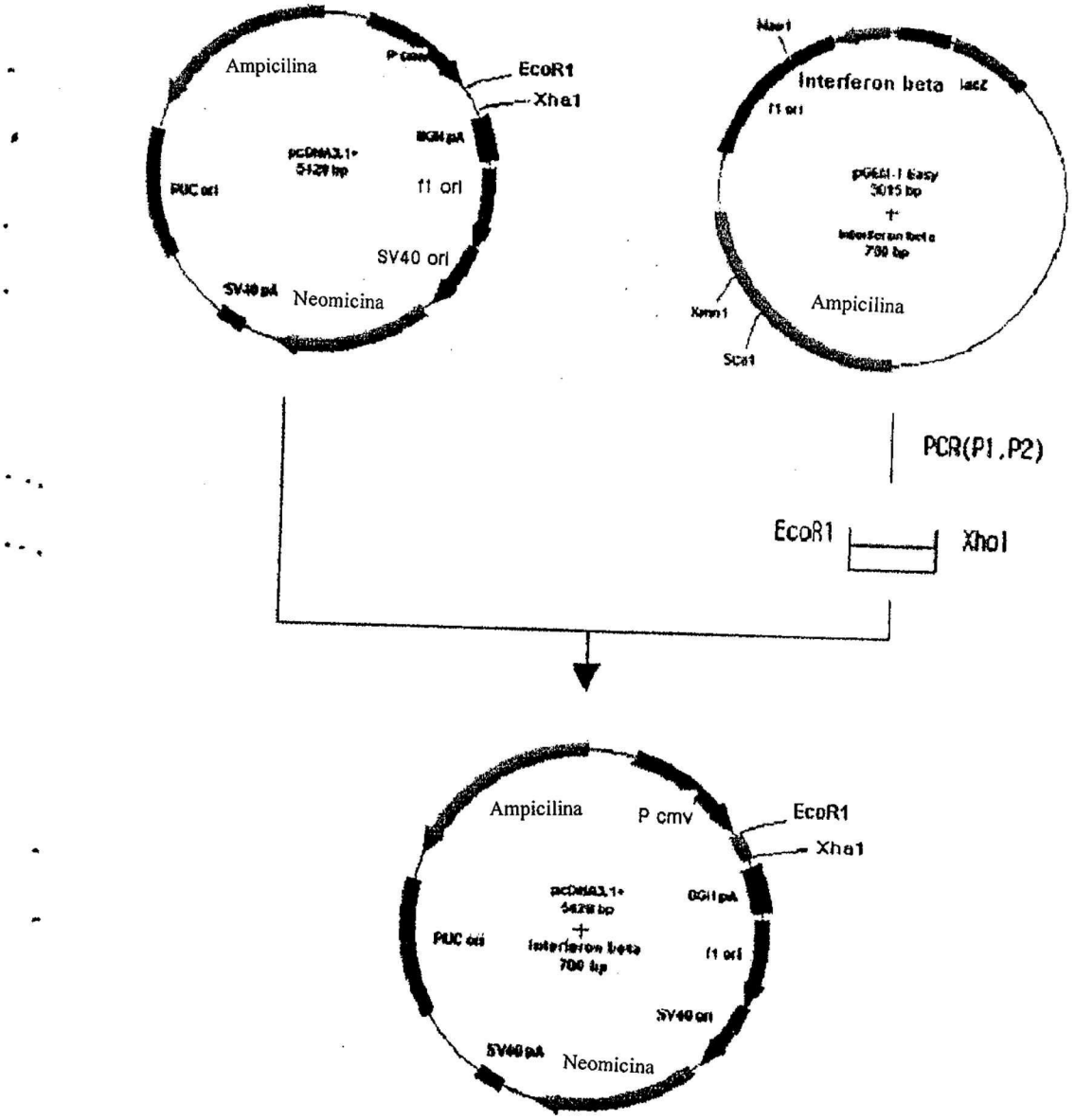
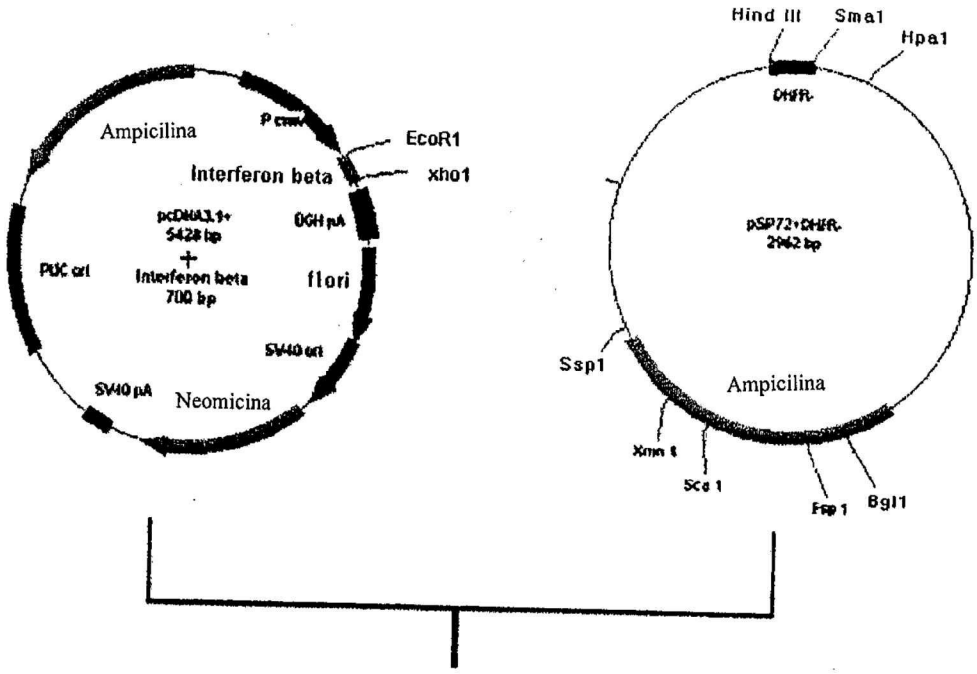
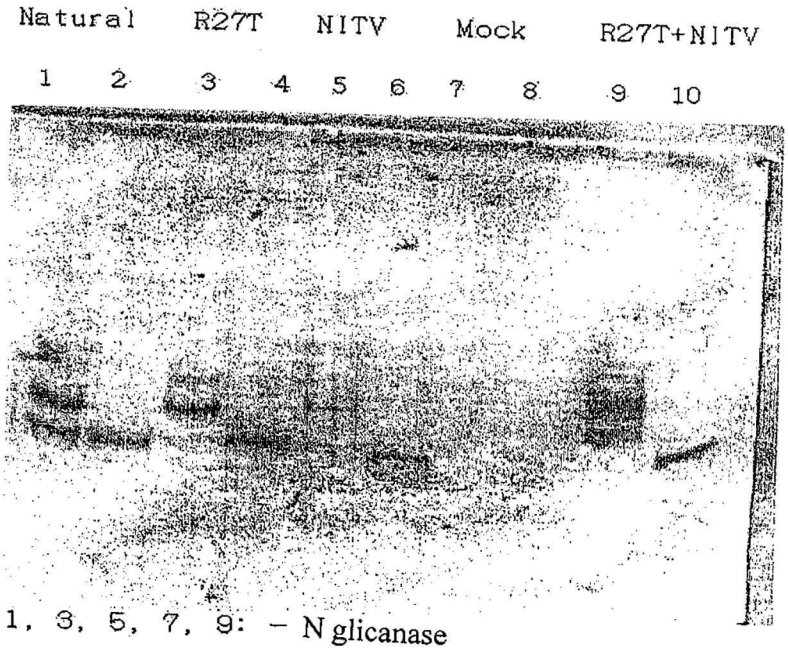

Ampicilina
EcoR1
Xha1
f1 ori
SV40 ori
Neomicina
Interferon beta
Ampicilina
PCR(P1,P2)
EcoR1
Xho1
Ampicilina
P cmv
EcoR1
Xha1
Interferon beta
f1 ori
Neomicina

Fig.4



Co-transfecção

Fig.5



1, 3, 5, 7, 9: − N glicanase

2, 4, 6, 8, 10: + N glicanase

Fig.6

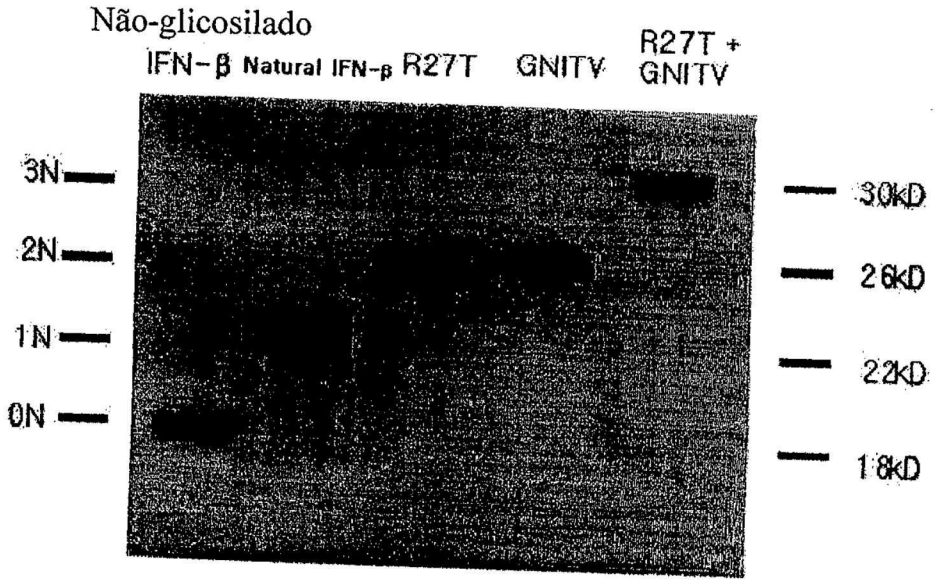
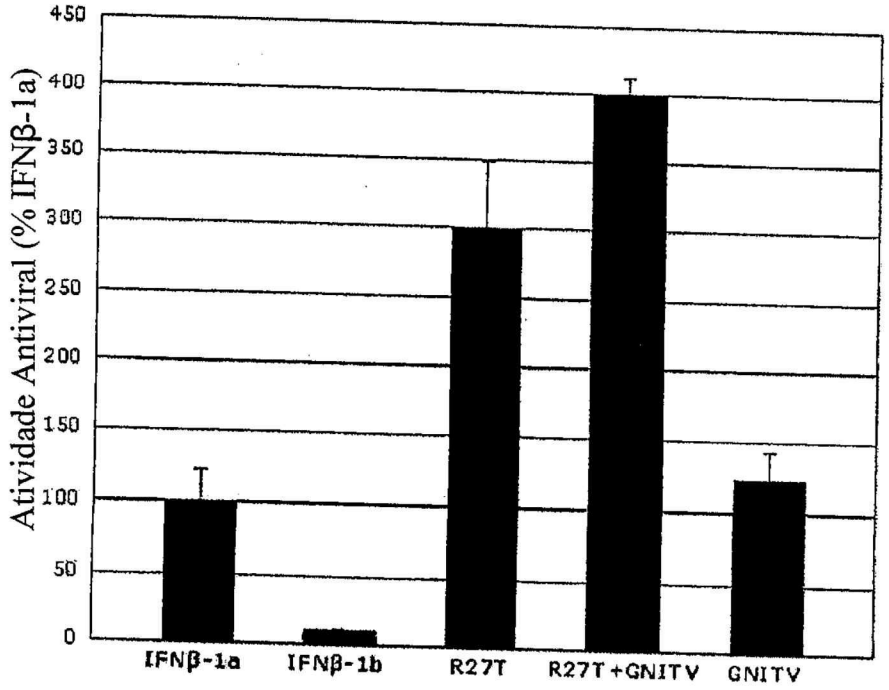
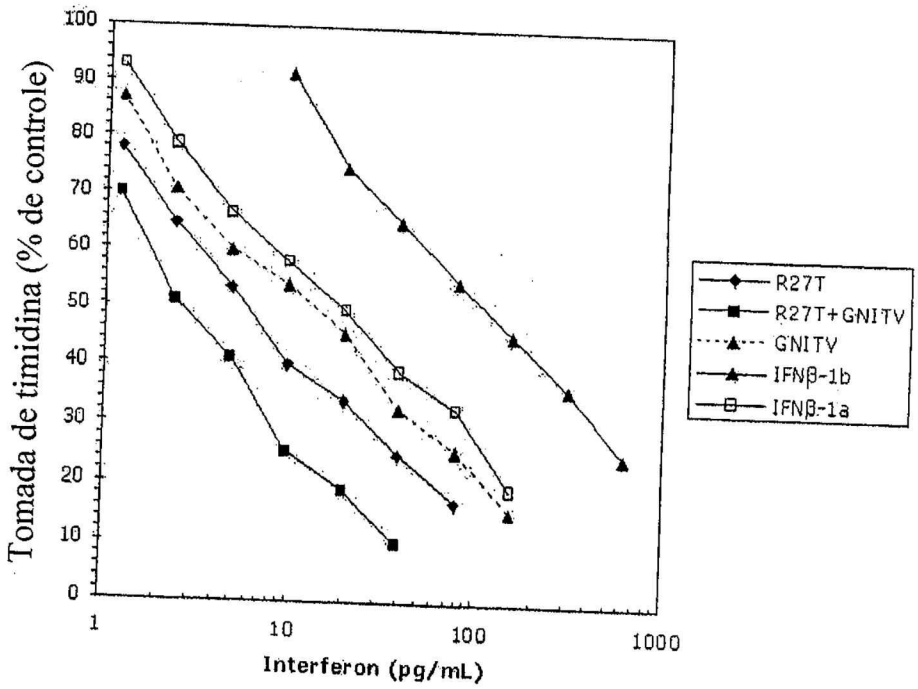

Não-glicosilado
IFN-β Natural IFN-β R27T GNITV R27T + GNITV
3N
2N
1N
0N
30kD
26kD
22kD
18kD

Fig.7


Atividade Antiviral (% IFNβ-1a)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
IFNβ-1a
IFNβ-1b
R27T
R27T+GNITV
GNITV

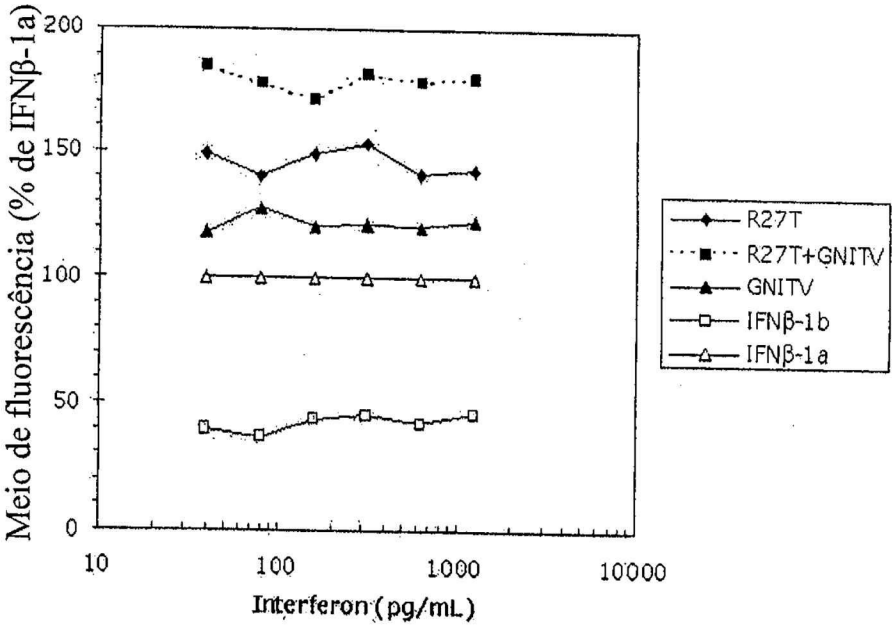
65

Fig.8


Tomada de timidina (% de controle)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
1000
Interferon (pg/mL)
R27T
R27T+GNITV
GNITV
IFNβ-1b
IFNβ-1a

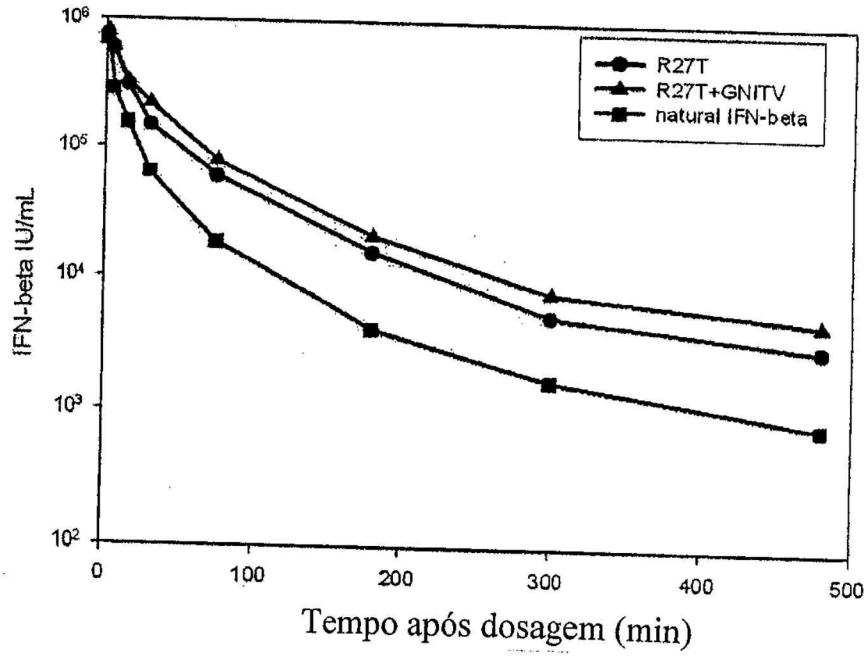
66

Fig.9


Meio de fluorescência (% de IFNβ-1a)
200
150
100
50
0
10
100
1000
10000
Interferon (pg/mL)
R27T
R27T+GNITV
GNITV
IFNβ-1b
IFNβ-1a

67

Fig.10


R27T
R27T+GNITV
natural IFN-beta
IFN-beta IU/mL
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
0
100
200
300
400
500
Tempo após dosagem (min)