

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

III

(19) ES	(11) NUMERO	446530
(21)	(22) FECHA DE PRESENTACION	

446.530
PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO 4801/73	4 de abril de 1973	SUIZA
4802/73	4 de abril de 1973	SUIZA

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C07G / A61K	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	---	--

(54) TITULO DE LA INVENCION

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE INTERFERONA MODIFICADA ESTRUCTURALMENTE.

(71) SOLICITANTE (S)

SANDOZ A.G.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Basilea, SUIZA.

(72) INVENTOR (ES)

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

PATENTE DE INVENCION

=====
Ref: Case 900-9087/III. 3700/RA/HP.

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE INTERFERONA
MODIFICADA ESTRUCTURALMENTE.

=====

Solicitante: SANDOZ A.G., entidad suiza, residente en Basilea,
Suiza.

=====

Esta invención se refiere a la producción bio
sintética de interferonas y en particular a la puri-
ficación y modificación estructural de las mismas.

Las interferonas son compuestos conocidos, an
5 ti-viralmente activos, que son producidos in vivo

por organismos vivos e in vitro por cultivos de tejido en res-
puesta a la acción de una serie de inductores específicos, en
particular, tanto inductores virales como no virales. Han si-
do perfectamente descritos en la literatura y se ha demostra-
do que poseen un amplio espectro de actividad contra muchos y
diferentes tipos de virus, que son atóxicos y no-antigénicos.
Las interferonas, por consiguiente, tienen grandes posibilida-
des en el tratamiento y, en particular, la profilaxis de las
infecciones virales, especialmente teniendo en cuenta la gam-
más bien limitada de fármacos sintéticos, antivirales, actual-
mente disponibles. No obstante, su potencial no se había al-
canzado hasta el momento debido a la imposibilidad de produ-
cir interferonas en cantidad suficiente, la falta de pureza
de las interferonas producidas hasta ahora, y el hecho de que
las interferonas, cuando se administran parenteralmente, tie-
nen una vida media relativamente breve.

La presente invención proporciona una serie de procedi-
mientos para modificar la estructura de las interferonas de
forma que se aumente la vida media mientras no se disminuye
sustancialmente la actividad anti-viral. La presente inven-
ción proporciona igualmente un procedimiento para purificar
interferonas e interferonas estructuralmente modificadas.

Se conoce muy poco de la naturaleza química de las in-
terferonas, en gran parte por la pureza insuficiente de las
interferonas producidas hasta ahora, descartando de este modo
el análisis químico directo. No obstante, se han deducido al-
gunas de sus características estructurales por diversos trata-
mientos enzimáticos y químicos de preparados impuros de inter-
feronas y la evaluación de la actividad anti-viral de los pro-
ductos resultantes. Lo que es evidente es que las interfero-

nas son proteínas, o al menos contienen proteína como componente principal, y que parte de la molécula está formada por radicales de hidratos de carbono. Se ha sugerido también como hipótesis que las interferonas son glicoproteínas que tienen una unidad terminal de ácido siálico [E. Schonke et. al., Series Immunobiol. Standard 14, 61 (1969)], aunque esta hipótesis aún no se ha confirmado de manera conclusiva. La presente invención se basa (apoyándolo en gran medida) en el supuesto de que las interferonas son tales glicoproteínas. La presente invención confirma igualmente que la penúltima unidad de sacárido es un radical galactosa.

La presente invención proporciona procesos para producir derivados de interferona, caracterizados por

- a) introducir enzimáticamente ácidos siálicos en las interferonas o asialointerferonas utilizando sialil-transferasas específicas.
- b) oxidar enzimáticamente la unidad terminal galactosa en asialointerferonas con oxidasa de galactosa.
- c) dividir enzimáticamente la unidad terminal galactosa en asialointerferonas con galactosidasa específica.

El proceso a) puede efectuarse empleando procedimientos convencionales para la introducción de ácidos siálicos, particularmente el ácido N-acetilneuramínico en el interior de glicoproteínas o asialoglicoproteínas. Las sialil-transferasas específicas empleadas son también conocidas para tales procesos e incluyen la sialil-transferasa del hígado de la rata (RLST) [J. Hickman et. al., J. Biol. Chem. 245 759 (1970)], del "colustrum" de ganado vacuno (CCST) [B.A. Bartholomew y G.W. Jourden, Procedimientos de Enzimología 8 368 (1966)], de la glándula submaxilar de la oveja (SSGST) [D.M.

Carlson et. al., Procedimientos de Enzimología, 8 361 (1966) y del cerebro embrionario del pollo (ECBST) [B. Kaufman y S. Basu, Procedimientos en Enzimología 8, 365 (1966)]. Las condiciones en las que preferentemente se lleva a cabo el proceso son standard y varían según la enzima empleada. Así, en general, el proceso se efectúa en una gama de pH de 5,5 a 8,0, aunque esto varía según la enzima empleada. Así, con RLST, que es la transferasa preferida, el pH es preferentemente de 6,0 a 8,0, utilizando, por ejemplo, tampones de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico o de Tris-cloruro; con el CCST, el pH es preferentemente de 6,4 a 7,2, utilizando, por ejemplo, tampones de fosfato, y con el SSGST, el pH es preferentemente de 5,8 a 6, utilizando tampón de acetato de Cacodilato. No se ha demostrado en estas enzimas necesidades de metal, aunque el EDTA puede estimular las actividades. El donador de ácido siálico es convenientemente el ácido CMP-N-acetilneuramínico, pero puede ser también el ácido CMP-N-glucolilneuramínico, cuando se emplea SSGST como transferasa. Las temperaturas y otras condiciones son convencionales y están descritas en la literatura. El proceso se realiza preferentemente de manera que el producto final se sialice al menos en un 80% del total posible.

El proceso b) se realiza también de forma convencional para la oxidación de los residuos terminales de galactosa en glicoproteínas utilizando la oxidasa de galactosa enzimática (comercialmente disponible). Las condiciones de la oxidación son standard y puede efectuarse, por ejemplo, a un pH de 7,0 a 8,0 utilizando, por ejemplo, un tampón de fosfato. El grado de oxidación puede comprobarse por la reducción subsiguiente del grupo aldehído C6 recién formado con borohidruro de so

dio irradiado, por ejemplo, tritiado. Cuando se hidroliza el material reducido, por ejemplo, con ácido clorhídrico, la galactosa irradiada resultante en el hidrolisato puede determinarse por cromatografía en papel.

5 El proceso c) se efectúa de manera standard para escindir las unidades de galactosa terminales en glicoproteínas, utilizando las β -galactosidasas conocidas para esta finalidad, incluyendo las de origen bacteriano o animal, por ejemplo, las de Diplococcus pneumoniae (DPG) (R.C. Hughes y R.W. Jeanloz, Biochem. J., 1535 (1964)), las de la Concanavalia ensiformis (CEG) (Y.T. Li y S.C. Li, Procedimientos en Enzimología 28, 702 (1972)), del Phaseus vulgaris (PVG) (K.M.L. Agrawal y O.P. Bahl, Procedimientos de Enzimología 28, 720 (1972)), del Aspergillus niger (ANG) (O.P. Bahl y K.M.L. Agrawal, Procedimientos de Enzimología 28, 728 (1972)) y del Clostridium perfringens (CPG) (E.J. McGuire et. al., Procedimientos de Enzimología 28, 755, (1972)). Las condiciones del proceso son convencionales y dependen en gran medida de la enzima empleada. Así, por ejemplo, aunque el proceso puede efectuarse
10
15
20
25 generalmente a un pH de 3,5 a 6,5, las gamas preferidas de pH para las enzimas específicas son, con el DPG, que es el preferido, de 6,3 a 6,5 utilizando, por ejemplo, tampón de fosfato; con la CEG, de 3,5 a 4,5; con el PVG de 3,5 a 4,8 y con el ANG de 3,8 a 4,6. La escisión de los residuos de galactosa pueden comprobarse con asialointerferona tritiada. Esta última se trata con β -galactosidasa, se dializa y se hidroliza y la galactosa tritiada puede detectarse en el hidrolisato.

Los derivados resultantes de interferona pueden aislarse y purificarse de manera convencional, por ejemplo, por diálisis y centrifugación. Las asialointerferonas, que son inter
30

feronas en las que los residuos siálicos terminales han sido liberados parcial o totalmente, utilizados como materiales de partida en los procesos a), b) y c), son ya conocidas (E. Schonke et. al. Symp, Series Immunobiol. Standard 14, 61 (1969)) o pueden producirse de manera convencional para eliminar los residuos terminales de ácido siálico de las glicoproteínas. Así, pueden producirse por hidrólisis ácida suave de las interferonas, por ejemplo con ácido sulfúrico diluido, a temperatura elevada. Como alternativa, pueden ser producidas por tratamiento de las interferonas con neuraminidasa de origen bacteriano o animal, por ejemplo, la obtenida del Vibrio cholerae, el Clostridium perfringens o el Diplococcus pneumoniae (R. Drzenieck, Temas Actuales sobre Microbiología e Inmunología 59, 35 (1972)) o del corazón de la rata. Las condiciones de incubación son standard y dependen de la neurominidasa empleada. Por ejemplo, con la neurominidasa del V. cholerae un pH de 5,5 parece ser el óptimo, utilizando por ejemplo tampón de acetato, y con la del D. Pneumoniae se prefiere un pH de 6,5.

Si se desea, pueden efectuarse los procedimientos alternativos de desialilación descritos anteriormente para obtener una mayor desialilación.

Las asialointerferonas resultantes pueden aislarse y purificarse utilizándose las técnicas convencionales.

Las mismas interferonas, utilizadas como materiales de partida, están perfectamente descritas en la literatura y pueden ser producidas por interacción de inductores, tales como los mixovirus y los arbovirus, los enterovirus, los virus DNA y otros diversos virus, por ejemplo, el virus de la glopeda, que realmente no pertenece a ningún grupo, así como

inductores no virales, tales como microorganismos y endotoxinas bacterianas, con células in vivo o in vitro. Entre las interferonas específicas que podrían mencionarse se incluyen las interferonas animales inducidas por virus, tales como interferona de conejo, interferona de pato, interferona de ratón, interferona de mono, interferona de ternera e interferona humana.

La presente invención proporciona también un proceso para la producción biosintética de interferona modificada estructuralmente, por síntesis completa de la porción de hidratos de carbono de las interferonas. Más concretamente, la invención proporciona un procedimiento para producir una interferona modificada estructuralmente que comprende la inhibición de la síntesis de los hidratos de carbono durante la biosíntesis de interferona, incorporando una glicosiltransferasa, preferentemente 2-desoxiglucosa o 2-desoxi-2-aminoglucosa, al medio de reacción. El proceso se lleva a cabo de manera convencional para la inhibición de la síntesis de los hidratos de carbono en proteínas. Por ejemplo, empleando 2-desoxiglucosa o 2-desoxi-2-aminoglucosa, el proceso se realiza adecuadamente a una temperatura de unos 35 a 45°C, preferentemente de 37°C. El producto resultante se modifica hasta que se compruebe que no contiene unidades terminales de galactosa.

Las interferonas estructuralmente modificadas así producidas pueden aislarse y purificarse por las técnicas convencionales.

La invención proporciona igualmente un proceso de purificación para los preparados de interferonas, asialointerferonas o interferonas modificadas de acuerdo con la invención,

que comprende la cromatografía del preparado sobre una aglutinina inmovilizada y la desorción posterior de la interferona, asialointerferona o interferona modificada, fijada a la aglutinina. Este procedimiento de purificación cromatográfica por afinidad puede realizarse de manera convencional. Así, el ligando de aglutinina se moviliza adecuadamente en una matriz sólida sustancialmente inerte. Las matrices adecuadas dependen en cierta medida de la aglutinina empleada, pero la matriz preferida es el éster de N-hidroxisuccinimida de aminoalquil-agarosa succinilatada (P. Cuatrecasas et. al., Biochemistry 11, 2291-2299). La aglutinina inmovilizada se coloca entonces en una columna cromatográfica y se hace pasar a través de la columna una solución de la interferona que debe purificarse. Las interferonas se fijan específicamente o son adsorbidas por el ligando de aglutinina mientras que las impurezas pasan a través del mismo. La interferona fijada o adsorbida es entonces eluida con un eluyente apropiado. Las aglutininas adecuadas son convencionales en la purificación de la glicoproteína, e incluyen las fitohemaglutininas, tal como la fitohemaglutinina Concanavalina A, la fitohemaglutinina de la lenteja común, las fitohemaglutininas de la semilla de ricino y, preferentemente, la fitohemaglutinina del Phaseus Vulgaris. El eluyente utilizado para desorber la interferona fijada puede depender de la aglutinina empleada pero, en general, es apropiadamente un mono-, oligo- o polisacárido, u otra glicoproteína, preferentemente una glicoproteína o fragmento de la misma obtenida de los eritrocitos humanos [S. Kornfeldt et. al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 63, 1439-1446].

Las interferonas modificadas de la invención poseen

propiedades antivirales similares a las interferonas no modificadas, pero sus vidas medias son más prolongadas. En particular, son activas contra el virus Herpes Simplex, como se observa en los conejos blancos de Nueva Zelanda (1,0 - 2,0 kg) inyectados con 10^3 pfu de virus Herpes Simplex. De 3 a 6 días después de la administración, todos los conejos desarrollan una creciente parálisis y en aproximadamente 2/3 partes de los conejos, encefalitis con resultados normalmente letales. 10^6 unidades del preparado de interferona se inyectan como una sola dosis o en 4 dosis inhibidas a intervalos de 6 horas, comenzando al iniciarse la infección, observándose los resultados en los animales.

Las interferonas modificadas de la invención están pues indicadas para su uso como agentes antivirales, particularmente profilácticamente. Una dosis diaria indicada es $5 \cdot 10^6$ a $200 \cdot 10^6$ unidades, administradas adecuadamente en dosis divididas de 2 a 4 veces al día.

Las interferonas modificadas pueden mezclarse adecuadamente con diluyentes líquidos inertes y administrarse parenteralmente en forma de soluciones o suspensiones estériles inyectables.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. En los ejemplos, se hace referencia a la focalización isoeléctrica. Esta se realiza como un sistema de electroforesis en columna Uniphor LKB 7900, Volumen 220 ml, utilizando anfolitos portadores de anfolina con pH de 3 a 10. La focalización isoeléctrica se realiza según el manual de instrucciones LKB. Todas las operaciones se efectúan a 2°C . A las 36 horas se recogen fracciones de 5 ml y se registra inmediatamente el pH.

EJEMPLO 1: Producción de Interferona

La interferona se produce en las células primarias del riñón del conejo, según el procedimiento de Tan et. al., Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 464-471 con la siguiente modificación. Unas capas individuales se incuban con 200 $\mu\text{g/ml}$ de poli (I), poli (C) durante 1 hora a 37°C . Después de retirar el inductor, las células se lavan dos veces con solución salina tamponada con tampón Hanks y se añaden 10 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida en medio esencial mínimo de Eagle conteniendo un 2 % de suero de feto de ternera. Los cultivos se incuban durante 3 horas y media a 37°C , y a continuación se añaden 3 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D, continuándose la incubación durante otra media hora. Se retiran los antimetabolitos, las células se lavan 5 veces con solución de Hanks y se cubren con medio fresco sin suero. A las 8-10 horas se recoge el sobrenadante, se centrifuga y se guarda a -70°C hasta que se utilice.

20 litros de sobrenadante se concentran 200 veces por ultrafiltración a través de membranas Diaflo PM-10 (Amicon), se dializan contra ácido acético diluido (pH 3,0) y se liberan de las proteínas precipitadas por centrifugación.

Para las pruebas de la interferona, se utiliza la prueba de reducción en placa en células primarias de riñón de conejo. Se tratan capas simples en discos Petri de 6 cm durante unas 18 horas con 2 ml de diluciones de interferona y a continuación se atacan con 50 a 80 unidades formadoras de placas de virus de Vesicular stomatitis. Los contenidos se expresan como la dilución de interferona que provoca una reducción del 50 % en la placa. En cada serie de pruebas se incluye un standard de laboratorio. Todos los resultados se

corrigen según esta standar y se expresan como unidades de la
boratorio por 2 ml.

EJEMPLO 2: Proceso de purificación

5 La fitoaglutinina de Phaseolus vulgaris necesaria para
el proceso existe como bacto~~fite~~maglutinina y se purifica se-
gún describe L. Weber et al., Scand. J. Hämat. 4, 77-80. La
porción eritrocaglutinante se filtra en gel sobre Sephadex
G-150 y a continuación se acopla con el éster de N-hidroxisuc-
cinimida de amialquil-agarosa succinilatada (P. Cuatrecasas
10 et. al., Biochemistry 11, 2291-2299).

Esta aglutinina muestra una reacción específica con la
secuencia de oligosacáridos galactosa → N-acetil-glucosami-
na → manosa, que existe en muchas glicoproteinas como carac-
terística estructural. Como puede observarse en la figura 1,
15 la asialointerferona irradiada con (³H) se adsorbe muy fuerte-
mente en esta lectina unida con agarosa.

Se utiliza una cantidad total de 10.000 unidades de in-
terferona con 120.000 dpm (³H) de actividad. Aproximadamente
un 50 % de la radioactividad no se adsorbe, y un 20 % más pue
20 de eluirse con galactosa 0,1 M. No obstante, este material
no mostró ninguna actividad biológica. Se obtiene una comple-
ta desorción con un fragmento de glicoproteina de eritrocitos
humanos. Este fragmento de glicoproteina se obtiene de la mem-
brana de los eritrocitos humanos después del tratamiento con
tripsina según el procedimiento descrito por S. Kornfeld et.
25 et., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 63, 1439-1446.

Después de añadir este fragmento de glicoproteina al
eluyente, se obtiene un máximo en cresta (ver fig. 1). Toda
la radioactividad restante se eluye, es decir, la interferona
30 se desorbe dentro de una gama muy limitada.

EJEMPLO 3: Incorporación de ácido N-acetil-neuramínico en interferona.

Reactivos: el ácido CMP-N-acetil-neuramínico se sintetiza a partir del ácido CTP-N-acetil-neuramínico con la enzima transferasa del ácido CPM-sialílico procedente de las glándulas salivares (E.L.Kean et al., *Procedimientos de Enzimología*, 8, 208 (1966)). La enzima de sialiltransferasa se obtiene del hígado de rata (J. Hickman et al., *J. Boil. Chem* 245, 759 (1970)), o el calostro de ganado vacuno (B.A. Bartholomew et al., *Procedimientos de Enzimología*, 8, 368 (1966)).

44 cc de una solución de interferona de conejo conteniendo $2 \cdot 10^6$ unidades de interferona en tampón tris-HCl 0,05 M, un pH de 7,5, 10 milimoles de EDTA, 5 milimoles de acetato de magnesio, se incuban con 2 milimoles de ácido CMP-N-acetilneuramínico y 500 unidades de dialiltransferasa. A las dos horas la solución se dializa contra ácido acético 0,1 N y a continuación contra agua destilada, retirándose el precipitado por centrifugación. El material sobrenadante contiene interferona a la que se ha incorporado adicionalmente ácido N-acetil-neuramínico.

La transferencia enzimática se verifica por focalización isoeléctrica. Mientras que antes del tratamiento la interferona está presente en varias especies moleculares de pI 6,3; 5,8; 5,3, el nuevo producto resultante tiene principalmente un pI de 4,8. La incorporación queda además confirmada por la transferencia del ácido N-acetil-neuramínico radioactivo. Cuando se utiliza ácido CMP-(^{14}C)-N-acetil-neuramínico en la reacción enzimática, la fracción de pI 4,8 muestra una elevada incorporación de la actividad (^{14}C) procedente del ácido neuramínico radioactivado

EJEMPLO 4: Oxidación enzimática de asialointerferona.

Una solución de 40 cc de interferona de conejo con $5 \cdot 10^6$ unidades de interferona, se trata en tampón de acetato de sodio 0,05 M pH 5,5, NaCl 0,15 M, 20 milimoles de CaCl_2 ,
5 con una unidad internacional de neuraminidasa de origen bacterial o animal. A las 4 horas el material se dializa contra ácido acético 0,1 N y posteriormente contra agua. En el material sobrenadante existe asialointerferón. Cuando este preparado se somete a focalización isoeléctrica, puede observarse, como se ha descrito ya (E. Schonke et al., *Symposium Series Immunobiol. Standard*, 14, 61-68), que ha desaparecido la heterogeneidad de la carga y se ha formado un producto uniforme con un pI de 6,3. Esta asialointerferona se oxida con la enzima oxidasa de galactosa. $2 \cdot 10^6$ unidades de interferona en
10 tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,8, NaCl 0,05 M se incuban con 500 unidades de oxidasa de galactosa durante 20 horas. Después de diálisis contra ácido acético 0,1 N, se efectúa la centrifugación.

La reacción se comprueba por reducción del grupo aldehído C6 recién formado de la galactosa terminal con NaBH_4 tritado. Cuando el material reducido se electrofocaliza, la fracción de interferona de pI 6,3 muestra una elevada incorporación de tritio. Este material se hidroliza en HCl 2N durante 2 horas a 100°C , se neutraliza con Ag_2CO_3 y se libera de
20 los iones con una resina de intercambio de iones. La galactosa radioactivada con tritio puede detectarse inequívocamente en el material hidrolizado por cromatografía en papel (ver tabla). Esta Tabla muestra los resultados obtenidos con interferona y asialointerferona no tratada y tratada.
25

T A B L A

Reducción con NaB(³ H ₄)	Incubación con oxidasa de galactosa	Incorporación total (³ H) dpm/ μ g de proteína	Incorporación de la galactosa (³ H) dpm/ μ g de proteína
Interferona		39.115	2.182
Interferona		24.765	6.224
Asialointerferona		26.593	4.080
Asialointerferona		113.135	77.724

5

10

EJEMPLO 5: Escisión de la galactosa terminal

10⁷ unidades de asialointerferona de conejo en tampón de fosfato de sodio 0,01 M, pH 6,5, se incuban con 1.000 unidades de β -galactosidasa de Diplococcus pneumoniae, (R.C. Hughes y R.W. Jeanloz, Biochem. J, 1535 (1964)), durante 3 horas. A continuación se efectúa la diálisis contra ácido acético 0,1 N retirándose el precipitado por centrifugación. El material sobrenadante contiene agalactointerferona. La escisión de la galactosa puede comprobarse con asialointerferona tritiada. Cuando este material se trata con β -galactosidasa, se dializa plenamente y a continuación se somete a hidrólisis ácida, no puede detectarse galactosa tritiada en el material hidrolizado.

15

20

EJEMPLO 6: Biosíntesis de interferona modificada

Se induce la interferona en células primarias del riñón del conejo con 200 μ /ml Poli 1:C. Después de incubación durante 60 minutos, el inductor se filtra, se lavan 3 veces las células y se mezclan con un medio fresco conteniendo 40 mM de 2-desoxiglucosa ó 40 mM de 2-desoxiaminoglucosa. Después de incubación durante 10 horas a 37°C, se recupera la interferona del sobrenadante.

25

30

5 El material recuperado se somete a focalización iso-
elétrica y el material con actividad biológica se encuentra
únicamente en la gama de pH de 6,3 a 6,8, mientras que la
interferona natural se dispone en diversas gamas. Se obser-
va que el producto no contiene residuos terminales de galac-
tosa de la forma siguiente. 10^6 unidades de interferona bio-
sintéticamente modificada, se incuba, como en el ejemplo 3,
en tampón Tris HCl 0,05 M (pH 7,5), 10 mM de EDTA, 5 mM de
acetato de magnesio con 2 mM de ácido CMP-N-acetilneuramínico
10 y 500 unidades de sialiltransferasa. Al contrario de la asia-
lointerferona, la interferona modificada biosintéticamente no
absorbe ningún ácido N-acetilneuramínico. Las especies mole-
culares de 6,3 a 6,8 permanecen así después del tratamiento
con sialil-transferasa y no aparecen fracciones adicionales
15 con valores inferiores de pI. El hecho de que, según el ejem-
plo 3, los residuos del ácido siálico se transfieren a los re-
siduos terminales de la galactosa, demuestra que las interfe-
ronas modificadas biosintéticamente no contienen residuos de
galactosa terminal como aceptores del ácido siálico.

20 Descrita suficientemente la naturaleza del invento,
así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacer-
se constar que las disposiciones anteriormente indicadas son
susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alte-
ren su principio fundamental.

25 REIVINDICACIONES

1ª.- Procedimiento para la producción de interferona
modificada estructuralmente, caracterizado porque comprende
inhibir la síntesis de los hidratos de carbono durante la bio-
síntesis de la interferona, incorporando una glucosiltransfe-
30 rasa al medio de reacción.

2^a.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la glucosiltransferasa es 2-desoxiglucosa ó 2-desoxi-2-aminoglucosa.

5

3^a.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque se lleva a cabo a una temperatura de 35 a 45°C.

10

4^a.- Procedimiento para la producción de interferona modificada estructuralmente, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

Esta Memoria consta de 16 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid 13 JUN. 1977

SANDOZ A.G.

J. M. GOMEZ ACEBO Y POMBO
p. p. Firmado: J. Suarez Diaz

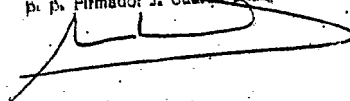
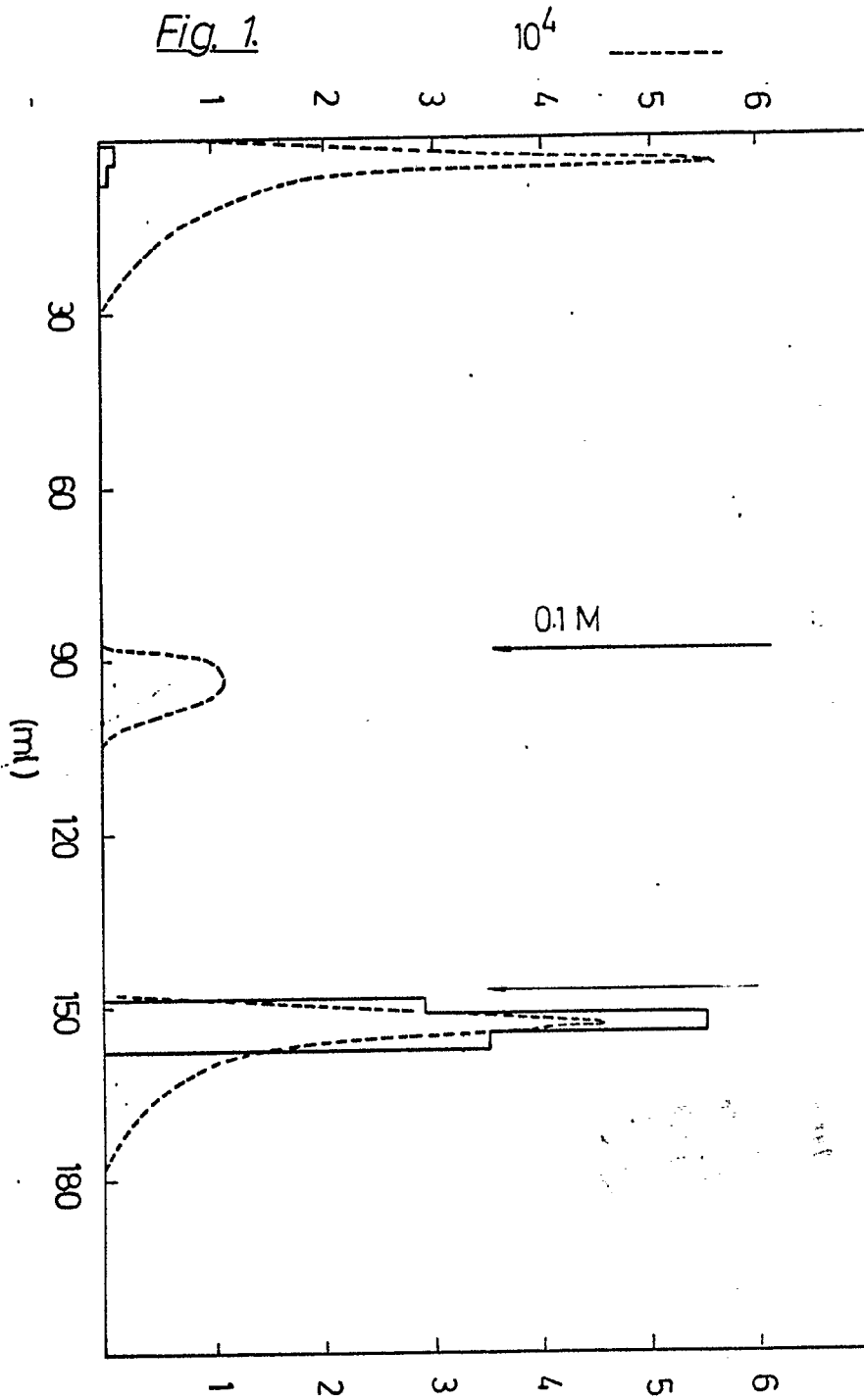


Fig. 1.



13 JUN 1977

$2\text{ml} \times 10^3$

J. M. GONZALEZ AGUIRRE Y POMBO
p. p. Firmado J. Suarez Diaz