

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 849

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-329**
(22) Přihlášeno: **03.06.2016**
(40) Zveřejněno: **13.12.2017**
(Věstník č. 50/2017)
(47) Uděleno: **15.05.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **26.06.2019**
(Věstník č. 26/2019)

(56) Relevantní dokumenty:
KRÍŽOVÁ L. et al.: „p19-targeted ABD-derived protein variants inhibit IL-23 binding and exert suppressive control over IL-23-stimulated expansion of primary human IL-17+ T-cells“, Autoimmunity, vol. 50, 19.1.2017, str. 1 – 12.
US 2012 308 573; CZ 304 514; WO 2008 106 134; US 2016 039 878.

(73) Majitel patentu:
Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i., Vestec, CZ

(72) Původce:
RNDr. Petr Malý, CSc., Praha 4 Braník, CZ
Ing. Lucie Křížová, Praha 8 - Libeň, CZ
Mgr. Milan Kuchař, Ph.D., Sobůlky, CZ
Ing. Hana Petroková, Ph.D., Praha 10, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
**Polypeptidy pro léčbu autoimunitních
chorob založenou na blokaci podjednotky
p19 lidského cytokinu IL-23**

(57) Anotace:
Předkládané řešení se týká polypeptidu vhodného pro léčbu autoimunitních chorob, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci:
 $X^1YKNX^2INX^3AX^4X^5VX^6X^7VKX^8X^9IDX^{10}ILAX^{11}LP$
(SEQ ID NO. 1), mající na N-konci nebo na C-konci přímo připojenou sekvenci
LAELAKVLNRELDKYGVSD (SEQ ID NO. 2), kde
 X^1 je vybrána z aminokyselin V, I, P, S;
 X^2 je vybrána z aminokyselin T, W, R, L, M;
 X^3 je vybrána z aminokyselin P, A, T, M, Q;
 X^4 je vybrána z aminokyselin A, S, G, V;
 X^5 je vybrána z aminokyselin W, G, T, F, L;
 X^6 je vybrána z aminokyselin L, R, A;
 X^7 je vybrána z aminokyselin A, H, L, Y, R;
 X^8 je vybrána z aminokyselin R, S;
 X^9 je vybrána z aminokyselin M, C, W, R, F;
 X^{10} je vybrána z aminokyselin R, M, L, S, V;
 X^{11} je vybrána z aminokyselin N, A, G, P, R.

CZ 307849 B6

Polypeptidy pro léčbu autoimunitních chorob založenou na blokaci podjednotky p19 lidského cytokinu IL-23

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových polypeptidů, které jsou vhodné pro léčbu autoimunitních chorob a jako diagnostická činidla.

10

Dosavadní stav techniky

O autoimunitních chorobách, jakými jsou například psoriáza, Crohnova choroba, revmatoidní artritida nebo roztroušená skleróza, je známo, že souvisejí s cytokinem IL-23 indukujícím signalizační funkci zprostředkovanou subpopulací T_H17 buněk nebo přirozených zabíječských buněk (NKC), které exprimují buněčně povrchový receptor pro IL-23 (Oppmann B et al.: Immunity 2000;13(5):715–725; Cua DJ et al.: Nature 2003;421(6924):744–748; Langrish CL et al.: J Exp Med 2005;201(2):233–240; Chan JR et al.: J Exp Med 2006;203(12):2577–2587; Capon F et al.: Hum Genet 2007;122(2):201–206; Vaknin-Dembinsky A et al.: Immunol 2006;176(12):7768–7774; Duerr RH et al.: Science 2006;314(5804):1461–1463). V těchto typech buněk cytokin IL-23, uvolněný z dendritických buněk a sestávající z unikátní podjednotky p19 a obecné podjednotky p40 (Beyer BM et al.: J Mol Biol 2008;382(4):942–955; Lupardus PJ et al.: J Mol Biol 2008;382(4):931–941), aktivuje signální dráhu prostřednictvím interakce p19 podjednotky se svým buněčným membránovým receptorem IL-23R a interakcí podjednotky p40 s povrchovým receptorem (31 cytokinu IL-12 (Parham C et al.: J Immunol 2002;168(11):5699–5708; Kastelein RA et al.: Annu Rev Immunol 2007;25:221–242). Synergická vazba heterodimeru IL-23 k oběma receptorovým jednotkám vede k heterodimerizaci receptoru následované tvorbou kvarterního komplexu, která spouští signální kaskádu dráhy jak/stat, zahrnující molekuly Jak2, Tyk2, Stat1, Stat3, Stat4 a Stat5. Transdukce signálu aktivuje transkripci, která vyvolává sekreci směsi modulátorů zánětu, jimiž jsou IL-17A, IL-17F, IL-22 a některé chemokiny stimulující keratinocyty a další typy buněk, a tedy hrajících zásadní roli v prozánětlivém procesu (přehledový článek Bonifáče K et al.: Immunol Rev 2008;226:132–146).

Effektivní terapeutická intervence potlačující hyperproliferaci keratinocytů jako klinický projev psoriázy vede k blokádě interakce mezi podjednotkami p19/p40 IL-23 a jejich receptory v buněčných membránách (Toichi E et al.: J Immunol 2006;177(7):4917–4926; Krueger GG et al.: N Engl J Med 2007;356(6):580–592; Gottlieb AB et al.: Curr Med Res Opin 2007;23(5):1081–1092). Nedávno bylo ukázáno, že léčivo na bázi monoklonální protilátky Stelara (ustekinumab, Janssen Biotech), blokující podjednotku p40 cytokinu IL-23 a bránící její interakci s β 1 receptorem cytokinu IL-12, dosahuje výborných výsledků v léčbě středních a těžkých forem psoriázy (Leonardi CL et al.: Lancet 2008;371(9625):1665–1674; Papp KA et al.: Lancet 2008;371(9625):1675–1684). Protože však podjednotka p40 je součástí cytokinu IL-12 i IL-23, ovlivňuje léčivo dvě rozdílné signální dráhy, což přináší nežádoucí vedlejší účinky včetně kardiovaskulárních problémů. Pozornost se proto v současné době soustředí na vývoj nových léčiv cíleně zasahujících pouze signální dráhu zprostředkovanou IL-23, jakými jsou specifické anti-p19 protilátky MK-3222 (Merck), CNTO 1959 (Janssen Biotech) and AMG 139 (Amgen/MedImmune) (Garber K: Nat Biotechnol 2012;30(6):475–477), nebo cílené protilátky popsané v patentových přihláškách WO 2008/103 432, WO 2010/027 766 a WO 2012/093 127. Protilátky jsou však velké molekuly, náročné na přípravu a s omezenou pohyblivostí v organismu, a to především z hlediska prostupnosti kůži a tkáněmi. Alternativou ke konvenčním léčivům založeným na monoklonálních protilátkách jsou uměle vytvořené vazebné molekuly odvozené od malých proteinových struktur (Binz HK et al.: Current Opinion in Biotechnology 2005;16(4):459–469; Nygren PA et al.: Journal of Immunological Methods 2004;290(1–2):3–28; Gronwall C et al.: J Biotechnol 2009;140(3–4):254–269).

Protože přesná molekulární struktura komplexu IL-23/IL-23R dosud nebyla objasněna, je navrhování efektivních inhibitorů funkce IL-23 se slibným terapeutickým účinkem značně problematické.

5

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou polypeptidy obsahující aminokyselinovou sekvenci:

10 X¹YKNX²INX³AX⁴X⁵VX⁶X⁷VKX⁸X⁹IDX¹⁰ILAX¹¹LP (SEQ ID NO. 1), mající na N-konci nebo na C-konci přímo připojenou sekvenci LAEAKVLANRELDKYGVSD (SEQ ID NO. 2).

X¹ je vybrána z aminokyselin V, I, P, S;

X² je vybrána z aminokyselin T, W, R, L, M;

X³ je vybrána z aminokyselin P, A, T, M, Q;

X⁴ je vybrána z aminokyselin A, S, G, V;

15 X⁵ je vybrána z aminokyselin W, G, T, F, L;

X⁶ je vybrána z aminokyselin L, R, A;

X⁷ je vybrána z aminokyselin A, H, L, Y, R;

X⁸ je vybrána z aminokyselin R, S;

X⁹ je vybrána z aminokyselin M, C, W, R, F;

20 X¹⁰ je vybrána z aminokyselin R, M, L, S, V;

X¹¹ je vybrána z aminokyselin N, A, G, P, R.

Předmětem vynálezu jsou s výhodou polypeptidy obsahující sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující:

25 LAEAKVLANRELDKYGVSDVYKNTINPAAWVLAVKRMIDRILANLP (SEQ. ID NO. 8),

LAEAKVLANRELDKYGVSDIYKNWINAAAGVRHVKRCIDMILAALP (SEQ. ID NO. 9)

LAEAKVLANRELDKYGVSDPYKNRINTASTVALVKSUIDLILAGLP (SEQ. ID NO. 10),

LAEAKVLANRELDKYGVSDSYKNLINMAGFVRVYKRRIDSILAPLP (SEQ. ID NO. 11),

30 LAEAKVLANRELDKYGVSDIYKNMINQAVLVRRVVKRFIDVILARLP (SEQ. ID NO. 12).

V rámci předkládaného vynálezu bylo zjištěno, že polypeptidy podle vynálezu se váží na podjednotku p19 lidského cytokinu IL-23 a blokují tak specificky jeho vazbu s receptorem IL-23R. Uváděná sekvence je esenciální pro vazbu. Polypeptid může být na obou stranách libovolně prodloužen, například tak, že obsahuje až 100 aminokyselin, s výhodou až 80 nebo až 70 nebo až 60 nebo až 50 aminokyselin.

35

Předmětem předkládaného vynálezu je také sekvence DNA vybraná ze skupiny zahrnující komplementární DNA kódující aminokyselinovou sekvenci polypeptidů podle předkládaného vynálezu a DNA hybridizující s uvedenou komplementární DNA za vysoce stringentních podmínek. Vysoce stringentními podmínkami jsou v tomto vynálezu míněny následující podmínky pro odmytí značené DNA sondy: použití odmývacího roztoku obsahujícího 0,5 x SSC + 0,1 % SDS o teplotě 60 °C.

40

Předkládaný vynález dále zahrnuje použití uvedené sekvence DNA pro přípravu polypeptidů podle vynálezu produkovaných v bakteriálních, kvasinkových, hmyzích, savčích nebo lidských hostitelských buňkách, a rovněž tyto hostitelské buňky, obsahující sekvence DNA podle vynálezu.

45

Polypeptidy podle vynálezu jsou vhodné pro použití v medicíně, zejména v léčbě autoimunitních chorob.

50

Polypeptidy podle vynálezu jsou vhodné pro i pro použití jako diagnostická činidla, zejména pro autoimunitní choroby. Za tímto účelem je zejména vhodné připojit k polypeptidům podle předkládaného vynálezu chromofor nebo fluorofor.

55

Autoimunitní choroby jsou choroby zahrnující prozánětlivé procesy zprostředkované IL-23, a zahrnují například psoriázu, Crohnovu chorobu, revmatoidní artritidu a roztroušenou sklerózu.

5 Polypeptidy podle vynálezu inhibují vazbu lidského cytokinu IL-23 k receptoru IL-23R interakcí s proteinem 19, tj. s alfa podjednotkou IL-23, čímž specificky blokují prozánětlivou signální dráhu, tedy jsou vhodné jako léčiva další generace pro léčbu autoimunitních chorob. Tato inhibiční schopnost byla prokázána v *in vitro* vazebných stanoveních a kompetičních experimentech, ale i v *ex vivo* funkčním stanovení na lidských T buňkách periferní krve. Dále sekvence podle předkládaného vynálezu vykazují sníženou afinitu proti sérovým albuminům.

10

Objasnění výkresů

Obr 1. Vazebné proteiny ILP-TolA-AVI vážou rekombinantní protein DH-p19, podjednotku cytokinu IL-23. Rekombinantní protein DH-p19 exprimovaný v buňkách *E. coli* BL21(λDE3), získaný z inkluzních tělísek a refoldovaný v roztoku 8M močoviny, byl nanesen na ELISA destičku typu Polysorp. Vazba *in vivo* biotinylovaných ILP-TolA-AVI proteinů byla detekována pomocí konjugátu streptavidin-HRP. ABDwt-TolA-AVI protein byl použit jako negativní kontrola. Výsledky představují tři samostatná stanovení se znázorněním standardních odchylek.

20

Obr 2. Vazebné proteiny ILP inhibují vazbu proteinu DH-p19 k IL-23 receptoru na povrchu lidských THP-1 buněk. Sériově vyředitelné varianty ILP klonů v rozmezí 50 až 1,6 µg/ml byly připraveny v roztoku s konstantním množstvím 10 µg/ml rekombinantního proteinu DH-p19. Jednotlivé vzorky byly pak přidány k THP-1 buňkám. Po 30 minutové inkubaci na ledu byly buňky opláchnuty roztokem cHBSS a navázaný protein p19 byl detekován průtokovou cytometrií pomocí polyklonální protilátky anti-IL23 (p19) v kombinaci s konjugátem Cy5-anti-myší IgG. ABDwt-TolA-AVI protein byl použit jako negativní kontrola. Naměřené hodnoty jsou znázorněny se standardními odchylkami.

Obr 3. Vazebné proteiny ILP inhibují IL-23-stimulovanou *ex vivo* expanzi IL-17 produkujících CD4+ T-buněk. Separované T-buňky, izolované z periferní krve 6 dobrovolníků, aktivované pomocí protilátky anti-CD3 a kostimulované pomocí cytokinu IL-23 a IL-2, byly kultivovány po dobu 3 dnů v přítomnosti nebo nepřítomnosti ILP vazebných proteinů, a) IL-17 pozitivní buňky byly detekovány pomocí průtokové cytometrie nastavením parametrů FSC, SSC, CD3+ a CD4+. Znázorněn je jeden reprezentativní experiment, b) Jednotlivá množství IL-17 produkujících buněk získaných ze vzorků kultivovaných primárních T-buněk v přítomnosti nebo nepřítomnosti ILP vazebných proteinů jsou znázorněny ve formě sloupců vyjadřujících aritmetický průměr se standardní odchylkou. Celkový počet buněk byl normalizován k počtu buněk ve vzorcích indukovaných IL-23/IL-2.

40

Příklady uskutečnění vynálezu

Materiály a metody

45

Protilátky a detekční činidla: myší anti-IL-23(p19) polyklonální protilátka a křenuv peroxidáza (HRP)-konjugovaná kozí anti-myší IgG byly získány od Biolegend, San Diego, CA. Cy5-konjugovaný kozí anti-myší IgG (F(ab')₂ fragment) byl získán od Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA. Streptavidin-fycoerytrin byl zakoupen od eBioscience, San Diego, CA. Streptavidin-HRP konjugát byl získán od Thermo Scientific, Rockford, IL. Monoklonální anti-poly-histidin-HRP protilátka produkovaná v myších byla získána od Sigma-Aldrich, Německo.

Buněčné linie a podmínky kultivace: v příkladech byly použity buněčné linie lidské akutní monocytické leukémie THP-1 (ATCC číslo: TIB-202). Buňky byly kultivovány v médiu DMEM

55

(Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) suplementovaném 10% fetálním telecím sérem (FCS) (GIBCO, Grand Island, N.Y.) a roztokem antibiotik a antimykotik (ATB) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO).

Produkce rekombinantního proteinu p19, podjednotky cytokinu IL–23

5

Rekombinantní p19/IL–23 (jeho vypočtená molární hmotnost je 23,3 kDa) s N–terminálním dvojitým polyhistidylovým motivem His₆ a TEV konzervativním štěpicím místem pro proteázu (tzv. DH–p19 protein) byl připraven použitím syntetické, kodónově optimalizované p19 kódující cDNA (GENEART, Německo), která byla vpravena do vektoru pET–28b klonováním s využitím NcoI+XhoI restrikčních míst. Vzniklý plasmid byl vložen do buněk *E. coli* Top 10, namnožen a sekvenováním ověřen. Protein byl poté produkován v hostitelských buňkách *E. coli* BL21(DE3). Kultivace přes noc v 50 ml média LB obsahujícím 60 µg/ml kanamycinu byla použita pro inokulaci 1 l LB média a následnou kultivaci při 37 °C do dosažení OD₆₀₀ = 1,0. Kultura byla indukována 1 mM IPTG po dobu 4 h při 37 °C. Buňky byly sklizeny centrifugací (6000xg, 20 min), promyty TN pufrem (50 mM Tris pufr s 150 mM NaCl, pH = 8) a znovu centrifugovány (5000 x g, 10 min). Pelety byly resuspendovány v 10 ml TN pufru a rozrušeny sonikátorem MISONIX 3000. Lyzáty byly centrifugovány 20 min při 40 000 x g a nerozpustný DH–p19 byl extrahován z inkluzních tělísek 2 ml 8M močoviny v TN pufru. Močovinový extrakt byl ponechán třepat 1 h při laboratorní teplotě a centrifugován 20 min při 40 000 x g. Supernatant byl aplikován na 1 ml Ni–NTA agarózovou kolonu ekvilibrovanou 5 ml TN pufru. Promývání bylo prováděno 10 ml TN pufru s 8M močovinou a poté TN pufrem obsahujícím 8M močovinu a 20 mM imidazol. DH–p19 byl eluován TN pufrem obsahujícím 8M močovinu a 250 mM imidazol v 0,5 ml frakcích.

Alternativně byl rozpustný p19 připraven z upraveného konstruktu DNA ve formě fúzního proteinu s cDNA proteinu vázícího maltózu (MBP) (*Mal E*) nesoucího dvojitě His₆ značení na N–konci (vypočtená molární hmotnost 69 kDa). Bylo zjištěno, že malE cDNA kódující MBP v kombinaci s modifikací na C–konci podporuje rozpustnost výsledného p19–MBP fúzního proteinu. Sekvence p19 byla vložena do vektoru odvozeného od pET–28b, nesoucího sekvenci kódující dvojitý polyhistidinový tag za tvorby výsledné sekvence pro produkci proteinu His₆–MBP–TEV–MCS–TEV–6xHis, a to s použitím primem p19–F–NheI (GGGCTAGCTAGCAGAGCTGTGCCTGGGGGC) a p19–R–XhoI (GCGCCTCGAGGGGACTCAGGGTTGCTGCTC). Hostitelské buňky *E. coli* TOP 10 (Life Technologies, Carlsbad, CA) byly transformovány vektorem s klonovaným p19 a vysety na LB agar suplementovaný 60 µg/ml kanamycinu. Protein byl produkován v *E. coli* BL21(DE3). K inokulaci 50 ml LB média obsahujícího 60 µg/ml kanamycinu byla použita jediná kolonie. 20 ml kultury pěstované přes noc bylo použito k inokulaci 1 l kultivačního média a dále pěstováno při 37 °C do dosažení OD₆₀₀ = 0,6. Kultura byla indukována IPTG při 20 °C a ponechána růst 4 h. Buňky byly sklizeny centrifugací 20 min při 6000 x g, promyty TN pufrem (pH = 8) a centrifugovány 10 min při 5000 x g. Pelety byly resuspendovány v 10 ml TN pufru a rozrušeny ultrazvukovými pulzy na sonikátoru MISONIX3000. Lyzáty byly centrifugovány 20 min při 40 000 x g. Cytoplasmatická frakce obsahující rozpustný DH–MBP–p19 byla nalita na 5 ml His–Trap kolonu s Ni–NTA agarózou a přečištěn na ÄKTA purifier (GE Healthcare, Británie). Eluce bylo provedena ve třech krocích s pufrem obsahujícím 250, 500 a 1000 mM imidazolu. Frakce o objemu 1,5 ml získané elucí 500 mM imidazolem byly ověřeny na SDS–PAGE a ty, které obsahovaly DH–MBP–p19, byly sloučeny a použity dále.

Test vazebné aktivity exIL–23R a p19 pomocí metody ELISA

Rekombinantní extracelulární receptor IL–23 (exIL–23R) nebo protein p19 byly imobilizovány přímo na NUNC Polysorp 96–jamkovou destičku zředěním ve vazebném pufru (100 mM hydrogenuhlíčanový/uhlíčanový roztok, pH = 9,6) na koncentraci 5 až 10 µg/ml a inkubovány za nízké teploty (cca 7 °C) přes noc. Další den byla destička omyta PBS pufrem obsahujícím 0,05 % Tweenu (PBST) a blokována 1 % BSA rozpuštěným ve stejném roztoku (PBSTB). V případě imobilizace exIL–23R (*E. coli* SHuffle a BL21 (DE3)) byl tento receptor v 4M

močovinném roztoku zředěn alespoň 20 x ve vazebném pufru; a přečištěné rekombinantní proteiny DH-MBP-p19 i DH-p19 byly aplikovány v sériovém ředění v PBSTB a detegovány za použití koží polyklonální protilátky proti lidskému IL-23 (anti-p19) a následně myšního anti-kožího konjugátu IgG-křenové peroxidázy (HRP) (BioLegend, San Diego, CA), obojí zředěno v PBSTB 1:1000. Vazba exIL-23R k imobilizovanému DH-MBP-p19 byla detegována pomocí koží polyklonální protilátky anti-IL-23R (1:250) a následně sekundárního králíčího anti-kožího konjugátu s HRP (1:1000) (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Všechny experimenty ELISA byly vizualizovány enzymatickou reakcí HRP s OPD substrátem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) v citrátovém pufru (3,3 % dihydrátu citrátu trisodného, fosforečná kyselina, pH = 5,0), reakce byla zastavena 2M kyselinou sírovou a byla měřena absorbance při 492 nm.

Screening peptidů metodou ELISA

Pro ELISA analýzu peptidů byl použit buněčný lyzát klonů připravený podle dříve popsaného protokolu (Ahmad JN et al.: Proteins 2012;80(3):774–789) nebo přečištěné peptidy. Byla použita dvě různá sendvičová uspořádání. V prvním případě byla destička NUNC Polysorp přímo pokryta proteinem DH-MBP-p19 nebo DH-p19 (5 µg/ml) ve vazebném pufru za nižší teploty (cca 7 °C) přes noc. Další den byla destička omyta pufrem PBST a jamky byly blokovány PBSTB. Vzorky proteinů testovaných sekvencí s navázanými sekvencemi TolA-AVI byly aplikovány v sériovém ředění v PBSTB a vázané biotinylované proteiny byly detekovány konjugátem streptavidinu-HRP naředěném ve stejném pufru 1:1000 (Pierce) (Obr. 1). V druhém případě byla destička pokryta streptavidinem (1 µg/ml) ve vazebném pufru a blokována stejným způsobem. Biotinylované sekvence s navázaným TolA-AVI naředěné v PBSTB na koncentraci 5 µg/ml byly imobilizovány streptavidinem produkovaným v Arctic Express *E.coli* a přečištěny na iminobiotin agaróze. Sériově ředěné DH-MBP-p19 nebo DH-p19 v PBSTB byly přidány do jamek a byla detekována vazba p19 k imobilizovaným testovaným peptidům myši anti-IL-23(p19) polyklonální protilátkou (1:1000) a koží anti-myši polyklonální protilátkou (1:1000).

Testované peptidy vykazovaly specifitu pro p19 protein, ve srovnání například s lysozymem, bovinním sérovým albuminem, ovalbuminem a lidským sérovým albuminem.

Testované peptidy jsou uvedeny v Tabulce 1. Sekvence AA 1–19 ve všech peptidech byla LAEAKVLANRELDKYGVSD (SEQ ID. 2). AA 20–46 jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka 1.

	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
ILP030	V	Y	K	N	T	I	N	P	A	A	W	V	L	A	V	K	R	M	I	D	R	I	L	A	N	L	P
ILP215	I	Y	K	N	W	I	N	A	A	A	G	V	R	H	V	K	R	C	I	D	M	I	L	A	A	L	P
ILP272	P	Y	K	N	R	I	N	T	A	S	T	V	A	L	V	K	S	W	I	D	L	I	L	A	G	L	P
ILP317	S	Y	K	N	L	I	N	M	A	G	F	V	R	Y	V	K	R	R	I	D	S	I	L	A	P	L	P
ILP323	I	Y	K	N	M	I	N	O	A	V	L	V	R	R	V	K	R	F	I	D	V	I	L	A	R	L	P

ILP030 obsahuje sekvenci AA 20–46 označenou v seznamu sekvencí jako SEQ. ID NO. 3, ILP215 obsahuje sekvenci AA 20–46 označenou v seznamu sekvencí jako SEQ. ID NO. 4, ILP 272 obsahuje sekvenci AA 20–46 označenou v seznamu sekvencí jako SEQ. ID NO. 5,

ILP 317 obsahuje sekvenci AA 20–46 označenou v seznamu sekvencí jako SEQ. ID NO. 6,
ILP 323 obsahuje sekvenci AA 20–46 označenou v seznamu sekvencí jako SEQ. ID NO. 7.

5 Ověření stability proteinů pomocí stanovení posunu teplotní denaturace na bázi fluorescenční detekce

Vzorky proteinů (0,1 mg/ml) v PBS a činidlo 5x Sypro Orange (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) byly smíchány do finálního objemu 25 µl. Pomocí real–time PCR Detection System CFX96 Touch (Bio–Rad Laboratories, USA) byly proteiny inkubovány v teplotním gradientu od 20 °C do 80 °C s přírůstkem teploty 0,5 °C v intervalu 30 s. Stupeň rozbalení proteinů byl sledován kanálem FRET (fluorescence resonance energy transfer), který zachycoval spektrální vlastnosti komplexů Sypro Orange s rozbaleným proteinem (excitační vlnová délka ≈470 nm a emisní vlnová délka ≈570 nm). Data byla analyzována softwarem CFX Manager a teploty tání byly stanoveny pomocí první derivace spektra.

15 Teploty tání pro testované peptidy–TolA–AVI byly 52 °C pro ILP030, 51 °C pro ILP272, 59 °C pro ILP317 a 61 °C pro ILP323.

Analýza vazby testovaných peptidů a p19 k buněčným liniím

20 Všechna stanovení byla prováděna v pufru HBSS (10 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl) doplněném 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1% (w/v) glukózy a 1% (v/v) FCS (cHBSS) na 96–jamkových kultivačních destičkách (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland). Pro vazebné stanovení DH–p19 bylo inkubováno 2,5 x 10⁵ buněk v 50 µl pufru cHBSS obsahujícího či neobsahujícího DH–p19 (10 µg/ml) 30 min při 4 °C. Buňky byly promyty cHBSS a navázaný DH–p19 byl barven myší anti–IL–23(p19) protilátkou (ředění 1:50) 30 min při 4 °C a po promytí Cy5–konjugovaným kozím anti–myším IgG, F(ab')₂ fragmentem (ředění 1:200) 30 min při 4 °C. Ve vazebných stanoveních pro testované peptidy bylo inkubováno 2,5 x 10⁵ buněk v 50 µl pufru cHBSS s biotinylovanými peptidy s navázanými sekvencemi TolA–AVI po dobu 30 min při 4 °C, promyto cHBSS, a na buňkách vázaný peptid byl barven streptavidin–phycoerythrinem (ředění 1:400) po dobu 30 min při 4 °C.

Buňky byly promyty, resuspendovány v 100 µl HBSS a analyzovány průtokovou cytometrií na přístroji FACS LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA) v přítomnosti 1 µg/ml Hoechst 33258. K vyloučení buněčných agregátů a mrtvých buněk byla použita odpovídající nastavení parametrů pro třídění buněk a vazebná data byla stanovena na základě průměrných intenzit fluorescence (MFI).

Kompetice mezi vazbou DH–p19 a testovaných peptidů k buňkám THP–1

40 Blokování vazby p19 k molekule receptoru IL–23 testovanými peptidy bylo zkoumáno tak, že byly připraveny směsi sériově ředěných (50 až 1,6 µg/ml) testovaných peptidů s navázanými sekvencemi TolA–AVI ve stálé koncentraci 10 µg/ml rekombinantního proteinu DH–p19 v celkovém objemu 50 µl pufru cHBSS. Vzorky byly přidány k buňkám THP–1 (2,5 x 10⁵) a inkubovány po dobu 30 min při 4 °C. Buňky byly promyty cHBSS a vázaný p19 byl detekován průtokovou cytometrií s použitím anti–IL–23(p19) polyklonální protilátky v kombinaci s Cy5–konjugovaným kozím anti–myším IgG, F(ab')₂ fragmentem jak je popsáno výše.

45 Jak je ukázáno na Obr. 2, zvyšující se koncentrace testovaných peptidů významně snižovaly vazbu DH–p19 k buňkám THP–1.

50 Vazba testovaných peptidů na lidský IL–23 sledovaná metodou ELISA

Destičky Polysorp (NUNC, Denmark) byly pokryty rekombinantním streptavidinem (1 µg/ml) v potahovacím pufru přes nos, při ~7 °C. Opláchnuté destičky byly blokovány PBSTB 2 h při laboratorní teplotě. Biotinylované testované peptidy s TolA–AVI sekvencemi byly imobilizovány v PBSTB pufru streptavidinem 1 h při laboratorní teplotě. Opláchnuté destičky byly inkubovány

s 4 µg/ml lidského IL-23 (R&D systems, Minneapolis, MN) v pufru PBSTB 1 h při laboratorní teplotě. Vazba IL-23 k imobilizovaným peptidům byla detekována myší anti-IL-23(p19) polyklonální protilátkou (1:1000) a sekundárním kozím anti-myším-HRP konjugátem (1:1000).

5 IL-23-dependentní *ex vivo* expanze lidských T-buněk produkujících IL-17

Zdraví dárce poskytli písemný informovaný souhlas v souladu s Helsinskou deklarací. Neseparované buňky periferní krve odebrané do zkumavek obsahujících EDTA byly použity pro získání přečištěných mononukleárních buněk (PBMCs) za použití Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Primární lidské T-buňky izolované z PBMCs za použití Human T Cell Enrichment Kit (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) byly jednou promyty PBS, resuspendovány v úplném médiu RPMI 1640 (RPMI 1640 suplementované 10% tepelně inaktivovaným FCS, 100 U/ml penicilinem, 100 µg/ml streptomycin sulfátem a 1,7 mM glutamátem sodným). T-buňky byly vyředěny na koncentraci 2×10^6 buněk/ml a aktivovány na 96-jamkové destičce předem potažené anti-CD3 (MEM-57, 10 µg/ml, Exbio Praha a.s., Praha) v přítomnosti kostimulačních protilátek (CD28/CD49d, 1 µg/ml, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), IL-23 (10 ng/ml), IL-2 (100 U/ml). Přečištěné testované peptidy s navázaným Tola-AVI bez LPS (7 µg/ml) byly přidány do média a buňky byly inkubovány tři dny při 37 °C. Buňky byly restimulovány 6 h při 37 °C (poslední 4 hodiny byla exocytóza blokována Brefeldinem A (10 µg/ml, Sigma-Aldrich)). Po inkubaci byly buňky barveny protilátkami proti CD8 Horizon V-500 (BDB) po dobu 15 min ve tmě. Buňky byly pak promyty promývacím pufrům (PBS obsahující 0,1 % azidu sodného a 2 % želatiny (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a fixovány pomocí lyzačního roztoku pro FACS/FACS Perm 2 (BDB) podle instrukcí výrobce. Po fixaci a permeabilizaci byly buňky promyty a barveny CD3 PerCP-Cy5.5 (eBioscience, San Diego, CA, USA), CD4 ECD (Immunotech, Marseille, France) a intracelulárními markery lidského interferonu-γ PE Cy7, IL2 APC, IL17 PB (eBioscience) a CD 154 PE (Immunotech). Buňky pak byly znovu promyty a měřeny na průtokovém cytometru FACS ARIA II (BDB). Pomocí trubiček BD Truecount (BDB) naplněných známým množstvím referenčních perliček byly získány absolutní počty buněk, a buňky byly barveny Syto-16 a DAPI (Invitrogen).

Třídenní *ex vivo* kultivace suspenzí T-buněk v přítomnosti testovaných peptidů vedla k významnému snížení buněčné expanze Th17 buněk, detekované jako počty IL-17 sekretujících a IFN-γ ne-sekretujících T-buněk v porovnání s neošetřenou kontrolou (Obr. 3a, pravý dolní výsek s uvedenými procenty). Zvýšení Th17+ buněk po IL-23-zprostředkované indukci je dokumentován jako rozdíl mezi neindukovanými buňkami (vzorek NO IL-23, $0,463 \pm 0,245$, $n=6$, $p=0,0030$) a normalizovanými počty IL-23 stimulace (IL-23 only, =1), uvedenými jako sloupce na Obr. 3b. Všechny testované peptidy významně inhibovaly expanzi Th17+ buněk: ILP030 ($0,613 \pm 0,196$, $n=6$, $p=0,0047$), ILP317 ($0,498 \pm 0,189$, $n=6$, $p=0,0013$) a ILP323 ($0,456 \pm 0,221$, $n=6$, $p=0,0018$).

Seznam sekvencí

<110> Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i.
 <120> Polypeptidy pro léčbu autoimunitních chorob založenou na blokaci podjednotky p19 lidského cytokinu IL-23
 <130> P
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> mutated sequence
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> V or I or P or S
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> T or W or R or L or M
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> P or A or T or M or Q
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> A or S or G or Y
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (11)..(11)
 <223> W or G or T or F or L
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (13)..(13)
 <223> L or R or A
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (14)..(14)
 <223> A or H or L or Y or R
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (17)..(17)
 <223> R or S
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (18)..(18)
 <223> M or C or W or R or F
 <220>

<221> VARIANT
 <222> (21)..(21)
 <223> R or M or L or S or Y

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (25)..(25)
 <223> N or A or G or P or R

<400> 1

Xaa Tyr Lys Asn Xaa Ile Asn xaa Ala Xaa Xaa val xaa xaa val Lys
 1 5 10 15

Xaa xaa Ile Asp Xaa Ile Leu Ala xaa Leu Pro
 20 25

<210> 2
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutated sequence

<400> 2

Leu Ala Glu Ala Lys val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp

<210> 3
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutated sequence

<400> 3

Val Tyr Lys Asn Thr Ile Asn Pro Ala Ala Trp val Leu Ala val Lys
 1 5 10 15

Arg Met Ile Asp Arg Ile Leu Ala Asn Leu Pro
 20 25

<210> 4
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutated sequence

<400> 4

Ile Tyr Lys Asn Trp Ile Asn Ala Ala Ala Gly val Arg His val Lys
 1 5 10 15

Arg Cys Ile Asp Met Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 20 25

<210> 5
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutated sequence

<400> 5

Pro Tyr Lys Asn Arg Ile Asn Thr Ala Ser Thr Val Ala Leu Val Lys
 1 5 10 15

Ser Trp Ile Asp Leu Ile Leu Ala Gly Leu Pro
 20 25

<210> 6
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutated sequence

<400> 6

Ser Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Met Ala Gly Phe Val Arg Tyr Val Lys
 1 5 10 15

Arg Arg Ile Asp Ser Ile Leu Ala Pro Leu Pro
 20 25

<210> 7
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutated sequence

<400> 7

Ile Tyr Lys Asn Met Ile Asn Gln Ala Val Leu Val Arg Arg Val Lys
 1 5 10 15

Arg Phe Ile Asp Val Ile Leu Ala Arg Leu Pro
 20 25

<210> 8
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutated sequence

<400> 8

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Val Tyr Lys Asn Thr Ile Asn Pro Ala Ala Trp Val Leu
 20 25 30

Ala Val Lys Arg Met Ile Asp Arg Ile Leu Ala Asn Leu Pro
 35 40 45

<210> 9
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutated sequence

<400> 9

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Ile Tyr Lys Asn Trp Ile Asn Ala Ala Ala Gly Val Arg
 20 25 30

His Val Lys Arg Cys Ile Asp Met Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 10
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutated sequence

<400> 10

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Pro Tyr Lys Asn Arg Ile Asn Thr Ala Ser Thr Val Ala
 20 25 30

Leu Val Lys Ser Trp Ile Asp Leu Ile Leu Ala Gly Leu Pro
 35 40 45

<210> 11
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mutated sequence

<400> 11

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly

```

1           5           10           15
Val Ser Asp Ser Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Met Ala Gly Phe Val Arg
20           25           30

Tyr Val Lys Arg Arg Ile Asp Ser Ile Leu Ala Pro Leu Pro
35           40           45

<210> 12
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> mutated sequence
<400> 12
Leu Ala Gly Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1           5           10           15

Val Ser Asp Ile Tyr Lys Asn Met Ile Asn Glu Ala Val Leu Val Arg
20           25           30

Arg Val Lys Arg Phe Ile Asp Val Ile Leu Ala Arg Leu Pro
35           40           45

<210> 13
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 13
Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gly Cys Thr Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly
1           5           10           15

Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Cys
20           25           30

<210> 14
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> primer
<400> 14
Gly Cys Gly Cys Cys Thr Cys Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Thr
1           5           10           15

Cys Ala Gly Gly Gly Thr Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys
20           25           30

```

PATENTOVÉ NÁROKY

5

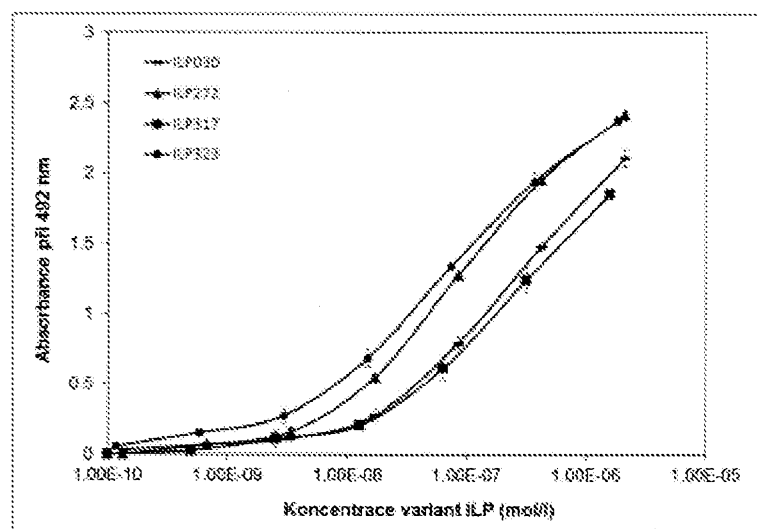
1. Polypeptid obsahující sekvenci aminokyselin:
 $X^1YKNX^2INX^3AX^4X^5VX^6X^7VKX^8X^9IDX^{10}ILAX^{11}LP$ (SEQ ID NO. 1), mající na N-konci nebo
na C-konci přímo připojenou sekvenci LAEAKVLNRELDKYGVSD (SEQ. ID NO. 2), kde

10

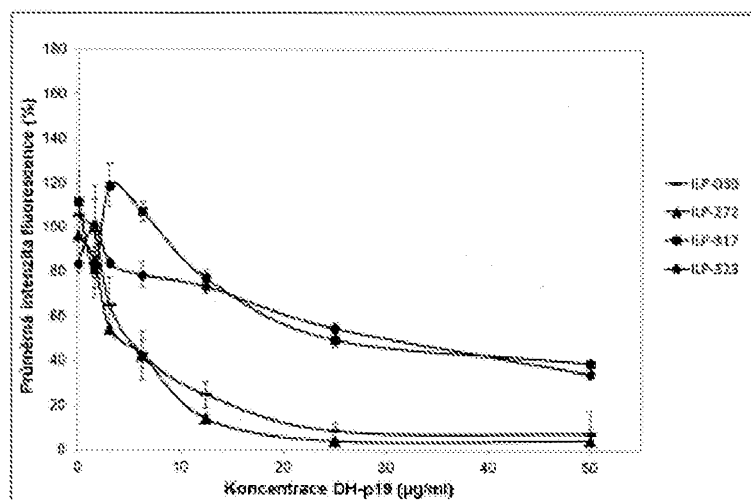
X^1 je vybrána z aminokyselin V, I, P, S;
 X^2 je vybrána z aminokyselin T, W, R, L, M;
 X^3 je vybrána z aminokyselin P, A, T, M, Q;
 X^4 je vybrána z aminokyselin A, S, G, V;

- X⁵ je vybrána z aminokyselin W, G, T, F, L;
 X⁶ je vybrána z aminokyselin L, R, A;
 X⁷ je vybrána z aminokyselin A, H, L, Y, R;
 X⁸ je vybrána z aminokyselin R, S;
 5 X⁹ je vybrána z aminokyselin M, C, W, R, F;
 X¹⁰ je vybrána z aminokyselin R, M, L, S, V;
 X¹¹ je vybrána z aminokyselin N, A, G, P, R;
 pro použití v léčbě a/nebo diagnostice autoimunitních chorob založené na blokaci podjednotky
 p19 lidského cytokinu IL-23
- 10 2. Polypeptid pro použití podle nároku 1, obsahující sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující:
 LAEAKVLANRELDKYGVSDWKNTINPAAWVLAVKRMIDRILANLP (SEQ. ID NO. 8),
 LAEAKVLANRELDKYGVSDIYKNWINAAAGVRHVKRCIDMILAALP (SEQ. ID NO. 9),
 LAEAKVLANRELDKYGVSDPYKNRINTASTVALVKSUIDLILAGLP (SEQ. ID NO. 10),
 15 LAEAKVLANRELDKYGVSDSYKNLINMAGFVRVYVKRRIDSILAPLP (SEQ. ID NO. 11),
 LAEAKVLANRELDKYGVSDIYKNMINQAVLVRRVKRFIDVILARLP (SEQ. ID NO. 12).
3. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 pro použití v léčbě autoimunitních chorob
 vybraných ze skupiny zahrnující psoriázu, Crohnovu chorobu, revmatoidní artritidu a
 20 roztroušenou sklerózu.
4. Polypeptid obsahující sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující:
 LAEAKVLANRELDKYGVSDVYKNTINPAAWVLAVKRMIDRILANLP (SEQ. ID NO. 8),
 LAEAKVLANRELDKYGVSDIYKNWINAAAGVRHVKRCIDMILAALP (SEQ. ID NO. 9),
 25 LAEAKVLANRELDKYGVSDPYKNRINTASTVALVKSUIDLILAGLP (SEQ. ID NO. 10),
 LAEAKVLANRELDKYGVSDSYKNLINMAGFVRVYVKRRIDSILAPLP (SEQ. ID NO. 11),
 LAEAKVLANRELDKYGVSDIYKNMINQAVLVRRVKRFIDVILARLP (SEQ. ID NO. 12).
5. Sekvence DNA, **vyznačující se tím**, že je vybrána ze skupiny zahrnující komplementární
 30 DNA kódující aminokyselinovou sekvenci polypeptidů podle nároku 4.
6. Použití sekvence DNA podle nároku 5 pro přípravu polypeptidů nebo rekombinantních
 proteinů produkovaných v bakteriálních, kvasinkových, hmyzích, savčích nebo lidských
 35 hostitelských buňkách.
7. Hostitelské buňky, **vyznačující se tím**, že obsahují sekvenci DNA podle nároku 5.
8. Polypeptid podle nároku 4 pro použití v medicíně.
- 40 9. Polypeptid podle nároku 4 pro použití jako diagnostické činidlo.

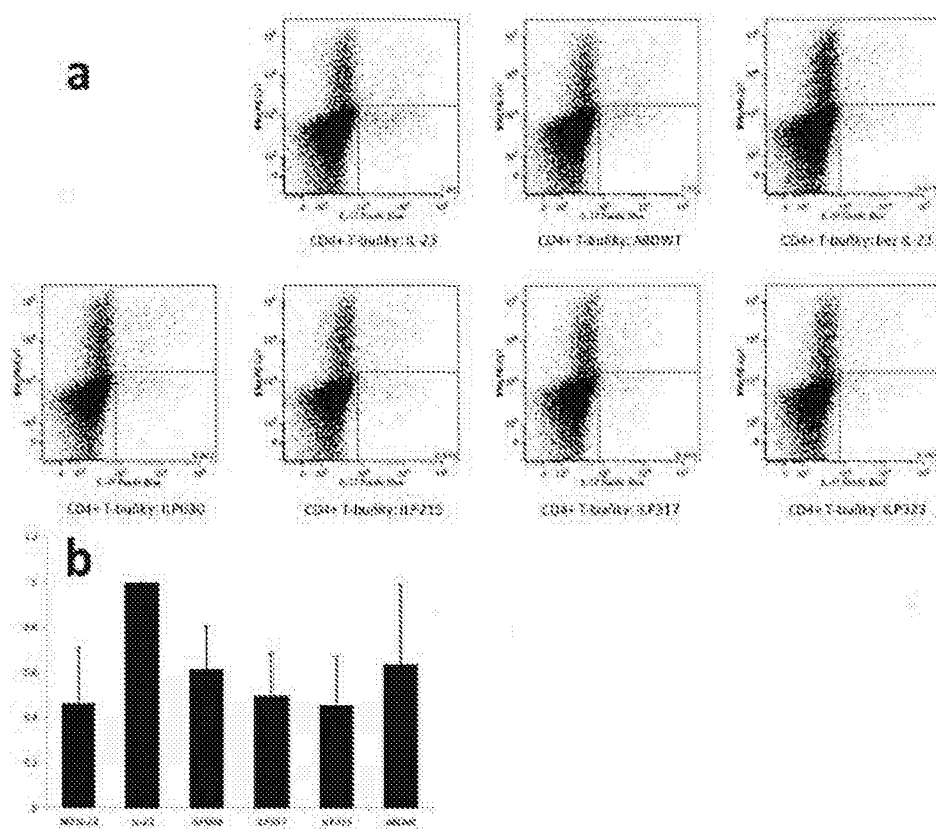
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3