(12) **PATENT**

(19) NO (11) **318989** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl[7] C 07 K 14/565, C 12 N 15/22

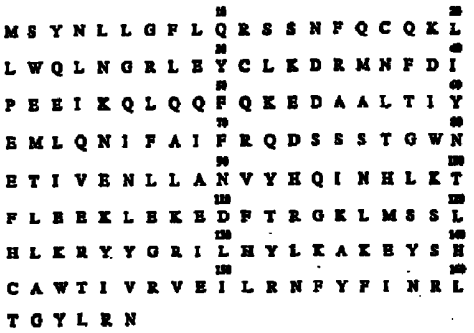
Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19963837	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.03.13 PCT/US95/03206
(22)	Inng.dag	1996.09.13	(85)	Videreføringsdag	1996.09.13
(24)	Løpedag	1995.03.13	(30)	Prioritet	1994.03.15, US, 213448
(41)	Alm.tilgj	1996.11.14			
(45)	Meddelt	2005.05.30			
(83)	Biol.mat. dep	ATCC nr. 69584			

(73)	Innehaver	Biogen Idec MA Inc, 14 Cambridge Center, MA02142 CAMBRIDGE, US
(72)	Oppfinner	Susan E. Goelz, Winchester, MA, US Richard L. Cate, Weston, MA, US Pingchang E. Chow, Charlestown, MA, US Blake R. Pepinsky, Watertown, MA, US
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, NO

(54)	Benevnelse	**Nye muteiner av IFN-beta**
(56)	Anførte publikasjoner	EP 041313 PNAS, vol.81, 1984, side 5662-5666 av Mark et al
(57)	Sammendrag	

IFN-β-mutein hvor Val (V) i stilling 101 i naturlig IFN-β - når stillingene nummereres ifølge naturlig forekommende IFN-β - er substituert med Phe F, Tyr (Y), Trp (W) eller His (H); DNA-sekvenser som koder disse IFN-β-muteiner, rekombinante DNA-molekyler som inneholder disse DNA-sekvenser operativt bundet til ekspresjonskontrollsekvenser og som er i stand til å indusere ekspresjon av et IFN-β-mutein, verter som er transformert med disse rekombinante DNA-molekyler, farmasøytiske sammensetninger inneholdende IFN-β-muteiner samt fremgangsmåter ved anvendelse av disse sammensetninger for å behandle virale infeksjoner, kreft eller svulster eller ved immunomodulasjon.



TEKNISK OMRÅDE FOR OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse vedrører muteiner av interferon-beta ("IFN-β"), hvor Val (V) i stilling 101 - når stillingene nummereres ifølge naturlig forekommende IFN-β - er substituert med Phe (F).

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Interferoner er enkeltkjedede polypeptider som utsondres av de fleste dyreceller som en reaksjon på diverse induserende stoffer, omfattende viruser, mitogener og polynukleotider. Interferonene deltar i reguleringen av cellefunksjonene, og har antivirale, antiproliferative og immunomodulerende egenskaper. Naturlige humaninterferoner oppdeles i tre hovedtyper: α-IFN (leukocytt), IFN-β (fibroblast) og γ-IFN (immun). Naturlig IFN-β fremstilles hovedsaklig av diploide fibroblaster samt i mindre mengder av lymfoblaster.

IFN-β er et glykoprotein. Dens nukleinsyre- og aminosyresekvenser er blitt kartlagt (Houghton et al., "The Complete Amino Acid Sequence of Human Fibroblast Interferon as Deduced Using Synthetic Oligodeoxyribonucleotide Primers of Reverse Transcriptase", Nucleic Acids Research, 8, s. 2885-2894 (1980); T. Taniguchi et al., "The Nucleotide Sequence of Human Fibroblast DNA", Gene, 10, s. 11-15 (1980)). Rekombinant IFN-β er blitt fremstilt og karakterisert.

IFN-β oppviser diverse biologiske og immunologiske aktiviteter. Én av IFN-β's biologiske aktiviteter er dens antivirale aktivitet. Denne antivirale aktivitet kan nøytraliseres av antistoffer mot IFN-β; jfr. EP-B1-41313. Fremstilling og isolering av antistoffer mot IFN-β beskrives i EP-B1-41313 og de deri nevnte henvisninger. IFN-β kan også bindes til celler som uttrykker interferonreceptorer, så som Daudi-celler eller A549-celler.

Som et resultat av disse aktiviteter, har IFN-β potensiell anvendelse innen immunoterapi, antisvulst- og antikreftterapi samt antivirale terapier.

Det er blitt og fortsetter å bli utført flere undersøkelser og kliniske prøver av antisvulst- og antikreftegenskapene av både naturlig forekommende og rekombinant IFN-β. Dette omfatter behandlingen av flere ondartede sykdommer, så som osteosarkom, basalcellekarsinom, cervikal dysplasi, gliom, akutt myeloid leukemi, multippel myeloma og Hodgkins sykdom. I tillegg har IFN-β vist seg å føre til lokal svulstregresjon når det injiseres til subkutane svulstnoduli i melanom- og brystkarsinomrammede pasienter.

IFN-β (naturlig forekommende og rekombinant) er blitt testet klinisk mot forskjellige virale infeksjoner, omfattende papillomavirus, så som genitale vorter og condylomata på cervix uteri; viral hepatitt omfattende akutt/kronisk hepatitt B og non-A, non-B-hepatitt (hepatitt C); herpes genitalis; herpes zoster; herpetisk keratitt; herpes simpleks; viral encefalitt; cytomegalovirus pneumoni; og ved forebyggelse av rhinovirus. Det er også blitt utført kliniske undersøkelser på anvendelsen av rekombinant IFN-β ved behandling av multippel sklerose, og IFN-β er godkjent for handelen i U.S.A. ved behandling av multippel sklerose.

SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse frembringer muteiner av IFN-β, hvor Val (V) i stilling 101 - når stillingene nummereres ifølge naturlig forekommende IFN-β - er substituert med Phe (F). Oppfinnelsen frembringer dessuten DNA-sekvenser som koder disse IFN-β-muteiner, rekombinante DNA-molekyler inneholdende slike sekvenser som er operativt bundet til ekspresjonskontrollsekvenser og som er i stand til å indusere i en egnet vert ekspresjonen av IFN-β-muteiner, verter som er transformert med disse rekombinante DNA-molekyler og farmasøytiske sammensetninger inneholdende IFN-β'et. Disse

sammensetninger er nyttige innen immunoterapien samt i antikreft-, antisvulst- og antivirale terapier.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 avbilder aminosyresekvensen av det foretrukne mutein ifølge denne oppfinnelse, IFN-β(Phe_{101}) (SEKV. ID NR: 1).

Figur 2 viser den foretrukne degenerative DNA-sekvens som koder IFN-β(Phe_{101}) og signalsekvensen for naturlig IFN-β (SEKV. ID NR: 2).

Figur 3 viser en analyse av IFN-β(Phe_{101})'ets binding til interferonreceptorbærende celler. Panelene A og B viser receptorbindingsdata for ^{125}I-IFN-β(Phe_{101}) hhv. naturlig forekommende ^{125}I-IFN-β til Daudi-celler. Panelene C og D viser receptorbindingsdata for ^{125}I-IFN-β(Phe_{101}) hhv. naturlig forekommende ^{125}I-IFN-β til A549-celler.

Figur 4 viser en analyse av IFN-β(Phe_{101}) og naturlig forekommende IFN-β ved peptidkartlegging ved endoproteinase-Lyse-C.

Figur 5 viser at antistoffer mot naturlig IFN-β nøytraliserer aktiviteten av IFN-β(Phe_{101}) og naturlig IFN-β.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Anvendt heri, betyr "naturlig IFN-β" et IFN-β, enten naturlig eller rekombinant, med den normalt forekommende aminosyresekvens av naturlig human-IFN-β, som vist f.eks. i EP-B1-41313, Figur 4.

Anvendt heri, betyr "IFN-β-mutein" et polypeptid hvor Val (V) i stilling 101 - når stillingene nummereres ifølge naturlig forekommende IFN-β - er substituert med Phe (F).

Med "nummereres ifølge naturlig IFN-β", vil vi identifisere en utvalgt aminosyre under henvisning til den stilling i hvilken denne aminosyre normalt forekommer i naturlig IFN-β.

IFN-β-muteinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved hvilken som helst egnet fremgangsmåte som er kjent innen faget. Slike fremgangsmåter omfatter å konstruere en DNA-sekvens som koder IFN-β-muteinene ifølge foreliggende oppfinnelse og uttrykke disse sekvenser i en egnet transformert vert. Denne fremgangsmåte vil gi rekombinante muteiner ifølge foreliggende oppfinnelse. Muteinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan imidlertid også fremstilles - selv om dette er mindre foretrukket - ved kjemisk syntese eller en kombinasjon av kjemisk syntese og rekombinant DNA-teknologi.

I én utførelsesform av en rekombinant fremgangsmåte ved fremstilling av et mutein ifølge foreliggende oppfinnelse, konstrueres en DNA-sekvens ved å isolere eller syntetisere en DNA-sekvens som koder naturlig IFN-β og deretter å forandre kodonet for Val_{101} til et kodon for Phe (F), ved setespesifikk mutagenese. Denne teknikk er velkjent, jfr. f.eks. Mark et al., "Site-Specific Mutagenesis of the Human Fibroblast Interferon Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, s. 5662-5666 (1984); US-patent nr. 4.588.585.

En ytterligere fremgangsmåte ved fremstilling av en DNA-sekvens som koder IFN-β-muteinene ifølge foreliggende oppfinnelse, ville være kjemisk syntese. F.eks. kan et gen som koder det ønskede IFN-β-mutein syntetiseres kjemisk under anvendelse av en oligonukleotidsyntetisator. Slike oligonukleotider utvikles basert på aminosyresekvensen av det ønskede IFN-β-mutein og foretrukket ved utvalg av de kodoner som er foretrukket i vertcellen i hvilken det rekombinante mutein vil fremstilles. I denne sammenheng er det velkjent at den genetiske kode er degenerativ - at det kan

kodes for en aminosyre med flere kodoner. F.eks. kodes det for Phe (F) med to kodoner, TTC eller TTT. Følgelig vil det være klart at det for en gitt DNA-sekvens som koder et bestemt IFN-β-mutein, vil finnes flere degenerative DNA-sekvenser som vil kode for dette IFN-β-mutein. Det vil f.eks. være klart at det i tillegg til den foretrukne DNA-sekvens vist på figur 2, vil finnes flere degenerative DNA-sekvenser som koder for IFN-β-muteinet vist på Figur 1. Disse degenerative DNA-sekvenser anses å ligge innen rammen for foreliggende oppfinnelse.

DNA-sekvensen som koder IFN-β-muteinet ifølge foreliggende oppfinnelse, være seg det fremstilles ved seterettet mutagenese, syntese eller andre fremgangsmåter, kan valgfritt også inneholde DNA-sekvenser som koder en signalsekvens. En slik signalsekvens bør, når den forekommer, være en som gjenkjennes av den utvalgte celle for ekspresjon av IFN-β-muteinet. Den kan være prokaryotisk, eukaryotisk eller en kombinasjon av disse. Den kan også være signalsekvensen for naturlig IFN-β. Innlemmelsen av en signalsekvens er avhengig av om det er ønskelig at IFN-β-muteinet utsondres fra de rekombinante celler hvor det fremstilles. Når de valgte celler er prokaryoter, foretrekkes det generelt at DNA-sekvensen ikke koder en signalsekvens. Når de valgte celler er eukaryoter, foretrekkes det generelt at en signalsekvens kodes, og mest foretrekkes det at den naturlige IFN-β-signalsekvens anvendes.

Standardfremgangsmåter kan anvendes for å syntetisere et gen som koder et IFN-β-mutein ifølge foreliggende oppfinnelse. F.eks. kan den fullstendige aminosyresekvens anvendes for å konstruere et tilbaketranslatert gen. En DNA-oligomer inneholdende en nukleotidsekvens som koder for IFN-β-mutein, kan syntetiseres. F.eks. kan det syntetiseres flere små oligonukleotider som koder for deler av det ønskede polypetid, som deretter ligeres. De enkelte oligonukleo-

tider inneholder vanligvis 5'- eller 3'-utspring for komplementær samling.

Etter samling (ved syntese, seterettet mutagenese eller en annen fremgangsmåte), vil DNA-sekvensene som koder et IFN-β-mutein ifølge foreliggende oppfinnelse, innsettes i en ekspresjonsvektor og operativt bindes til en ekspresjonskontrollsekvens som er egnet for ekspresjon av IFN-β-muteinet i den ønskede transformerte vert. Riktig innsetting kan bekreftes ved nukleotidsekvensiering, restriksjonskartlegging og ekspresjon av et biologisk aktivt polypeptid i en egnet vert. Det er velkjent innen faget at for å erholde høye ekspresjonsnivåer ev et transfektert gen i en vert, må dette gen være operativt bundet til transkriberende og translerende ekspresjonskontrollsekvenser som er funksjonelle i den valgte ekspresjonsvert.

Valget av ekspresjonskontrollsekvens og ekspresjonsvektor, vil være avhengig av valget av vert. Det kan anvendes et vidt spektrum av ekspresjonsvert/vektorkombinasjoner. Nyttige ekspresjonsvektorer for eukaryotverter omfatter f.eks. vektorer som inneholder ekspresjonskontrollsekvenser fra SV40, bovint papillomavirus, adenovirus eller cytomegalovirus. Nyttige ekspresjonsvektorer for bakterielle verter omfatter kjente bakterielle plasmider, så som plasmider fra E. coli, omfattende col E1, pCR1, pBR322, pMB9 og deres derivater, plasmider med videre vertområde, så som RP4, fag-DNA'er, f.eks. de diverse derivater av fag lambda, så som NM989, og andre DNA-fager, så som M13, eller filamentøse enkeltkjedede DNA-fager. Nyttige ekspresjonsvektorer for gjærceller omfatter 2μ-plasmidet og derivater derav. Nyttige vektorer for insektceller omfatter pVL941. Vi foretrekker pBG311; jfr. Cate et al., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene in Animal Cells", Cell, 45, s. 685-698 (1986).

I tillegg kan det anvendes et vidt spektrum av ekspresjonskontrollsekvenser i disse vektorer. Slike nyttige ekspresjonskontrollsekvenser omfatter ekspresjonskontrollsekvensene forbundet med strukturelle gener av de foregående ekspresjonsvektorer. Eksempler på nyttige ekspresjonskontrollsekvenser omfatter f.eks. de tidlige og sene promoterer av SV40 eller adenovirus, lac-systemet, trp-systemet, TAC- eller TRC-systemet, de hovedoperator- og -promoterområder av fag lambda, f.eks. PL, kontrollområdene av fd kappeprotein, promoteren for 3-fosfoglyceratkinase eller andre glykolytiske enzymer, promoterene av sur fosfatase, f.eks. Pho5, promoterene av gjær-α-paringssystemet og andre sekvenser som er kjent for å kontrollere ekspresjonen av gener av prokaryoter eller eukaryoter eller deres viruser, og diverse kombinasjoner derav.

Hvilken som helst egnet vert kan anvendes for å fremstille IFN-β-muteinene ifølge oppfinnelsen, omfattende bakterier, sopp (inklusive gjærkari), plante-, insekt-, pattedyr- eller andre egnede dyreceller eller cellelinjer, samt transgene dyr eller planter. Nærmere bestemt kan disse verter omfatte velkjente eukaryot- og prokaryotverter, så som stammer av E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces, sopp, gjær, insektceller, så som Spodoptera frugiperda (SF9), dyreceller, så som eggstokk fra gullhamster (CHO) og museceller, så som NS/O, celler fra afrikansk grønn ape, så som COS1, COS7, BSC1, BSC40 og BMT10, og celler fra menneske, samt planteceller i vevkulturer. For dyrecelleekspresjon, fortrekker vi CHO-celler og COS7-celler i kulturer, og spesielt CHO-DDUKY-β1-cellelinjen (jfr. s. 18-19).

Det bør så klart forstås at ikke alle vektorer og ekspresjonskontrollsekvenser vil virke like godt for å uttrykke DNA-sekvensene beskrevet heri. Heller ikke vil alle verter virke like godt med det samme ekspresjonssystem. Imidlertid vil en person med kunnskaper innen faget kunne gjøre et utvalg blant disse vektorer, ekspresjonskontrollsekvenser og

verter uten overdrevet eksperimentering. F.eks. ved valg av en vektor, må verten tas i betraktning fordi vektoren må replikeres deri. Vektorens kopieringsevne, evnen til å kontrollere denne kopieringsevne og ekspresjonen av andre proteiner som kodes av vektoren, så som antibiotiske markører, bør også tas i betraktning. F.eks. omfatter de foretrukne vektorer for anvendelse ifølge foreliggende oppfinnelse, slike som tillater DNA'et som koder IFN-β-muteinene, til å amplifiseres med stor kopieringsevne. Slike amplifiserbare vektorer er velkjent innen faget. De omfatter f.eks. vektorer som kan amplifiseres ved DHFR-amplifikasjon (jfr. f.eks. Kaufman, US-patent nr. 4.470.461; Kaufman og Sharp, "Construction of a Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis of Signals Utilized for Efficient Expression", Mol. Cell. Biol., 2, s. 1304-1319 (1982)) eller amplifikasjon ved glutaminsyntetase ("GS") (jfr. f.eks. US-patent nr. 5.122.464 og den publiserte Europapatentsøknad nr. 338.841).

Ved valg av en ekspresjonskontrollsekvens, bør også diverse andre faktorer tas i betraktning. Disse omfatter f.eks. den relative styrke av sekvensen, dens kontrollerbarhet og dens kompatibilitet med den faktiske DNA-sekvens som koder IFN-β-muteinet ifølge oppfinnelsen, spesielt hva angår potensielle sekundære strukturer. Verter bør utvelges i betraktning av deres kompatibilitet med den valgte vektor, toksisiteten av produktet som kodes for av DNA-sekvensene ifølge oppfinnelsen, deres sekresjonskarakteristikker, deres evne til å folde polypeptidene riktig, deres fermentasjons- eller kultiveringskrav samt vanskelighetsgraden ved isolering av produktene som kodes for av DNA-sekvensene.

Innen disse parametere kan en person med kunnskaper innen faget velge diverse vektor/ekspresjonskontrollsekvens/vert-kombinasjoner som vil uttrykke de ønskede DNA-sekvenser ved

fermentasjon eller i dyrekulturer i stor skala, f.eks. under anvendelse av CHO-celler eller COS7-celler.

IFN-β-muteinene som erholdes ifølge foreliggende oppfinnelse, kan være glykosylert eller uglykosylert, avhengig av hvilken vertorganisme som anvendes for å fremstille muteinet. Når det velges bakterier som vert, da vil det fremstilte IFN-β-mutein være uglykosylert. Eukaryoter vil på den andre side glykosylere IFN-β-muteinene, men kanskje ikke på samme måte som naturlig IFN-β glykosyleres.

IFN-β-muteinet som fremstilles av den transformerte vert, kan isoleres ved hvilken som helst egnet fremgangsmåte. Det er kjent diverse fremgangsmåter ved isolering av IFN-β; jfr. f.eks. US-patentene nr. 4.289.689, 4.359.389, 4.172.071, 4.551.271, 5.244.655, 4.485.017, 4.257.938 og 4.541.952. Vi foretrekker immunoaffinitetsisolering; jfr. f.eks. Okamura et al., "Human Fibroblastoid Interferon: Innumosorbent Column Chromatography and N-Terminal Amino Acid Sequence", Biochem., 19, s. 3831-3835 (1980).

Den biologiske aktivitet av IFN-β-muteinene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan undersøkes ved hvilken som helst egnet fremgangsmåte som er kjent innen faget. Slike assayer omfatter antistoffnøytralisasjon av antiviral aktivitet, induksjon av proteinkinase, oligoadenylat-2,5-A-syntetase eller fosfodiesteraseaktiviteter, som beskrevet i EP-B1-41313. Disse assayer omfatter også immunomodulatoriske assayer (jfr. f.eks. US-patent nr. 4.753.795), veksthemmingsassayer og måling av bindingen til celler som uttrykker interferonreceptorer.

IFN-β-muteinet ifølge foreliggende oppfinnelse vil administreres i en dose som omtrent tilsvarer dosen som anvendes ved terapi med naturlig eller rekombinant IFN-β. Fortrinnsvis administreres en virksom mengde IFN-β-mutein. En "virksom mengde" betyr en mengde som kan forebygge eller minske

alvoret eller utspredningen av lidelsen eller indikasjonen som behandles. Det vil være åpenbart for en fagperson at den virksomme mengde IFN-β-mutein bl.a. vil avhenge av sykdommen, doseringen, administrasjonstimeplanen av IFN-β-muteinet, om IFN-β-muteinet administreres for seg selv eller sammen med andre terapeutiske midler, serum-halveringstiden av sammensetningen og den generelle helsetilstand av pasienten.

IFN-β-muteinet administreres fortrinnsvis i en sammensetning som inneholder et farmasøytisk akseptabelt bærerstoff. "Farmasøytisk akseptabelt bærerstoff" betyr et bærerstoff som ikke forårsaker noen uønskede virkninger i pasienten det administreres til. Slike farmasøytisk akseptable bærerstoffer er velkjent innen faget. Vi foretrekker humanserumalbumin.

IFN-β-muteinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan formuleres i farmasøytiske sammensetninger ved velkjente fremgangsmåter; jfr. f.eks. Remington's Pharmaceutical Sciences av E.W. Martin, som beskriver egnede formuleringer. Den farmasøytiske sammensetning med IFN-β-mutein kan formuleres i diverse former, bl.a. i flytende, gel-, lyofilisert eller enhver annen egnet form. Den foretrukne form vil være avhengig av den bestemte indikasjon som behandles, og vil være åpenbar for en person med kunnskaper innen faget.

Den farmasøytiske sammensetning med IFN-β-mutein kan administreres oralt, intravenøst, intramuskulært, intraperitonealt, intradermalt eller subkutant, eller på hvilken som helst annen akseptabel måte. Den foretrukne administrasjonsmåte vil være avhengig av den bestemte indikasjon som behandles, og vil være åpenbar for en fagperson.

Den farmasøytiske sammensetning med IFN-β-mutein kan administreres sammen med andre terapeutiske midler. Disse midler kan innlemmes som en del av samme farmasøytiske sammen-

setning, eller de kan administreres separat fra IFN-β-muteinet, enten samtidig eller ifølge en annen akseptabel behandlingsplan. Videre kan den farmasøytiske sammensetning med IFN-β-mutein, anvendes i tillegg til andre terapier.

Følgelig frembringer oppfinnelsen sammensetninger til behandling av virale infeksjoner, kreft eller svulster, abnormal cellevekst eller for immunomodulasjon i et egnet dyr, fortrinnsvis et pattedyr, mest foretrukket et menneske.

Det overveies også å anvende DNA-sekvensene som koder IFN-β-muteinene ifølge oppfinnelsen, ved genterapiapplikasjoner.

Planlagte genterapiapplikasjoner omfatter behandling av slike sykdommer hvor IFN-β forventes å gi en virksom terapi på grunn av sin antivirale aktivitet, f.eks. virale sykdommer, inklusive hepatitt og spesielt HBV, eller andre infeksjonssykdommer som reagerer på IFN-β eller infeksjonsstoffer som er følsomme for IFN-β. På lignende måte er det planlagt genterapiapplikasjoner for immunomodulasjon samt ved behandling av de sykdommer hvor IFN-β forventes å bringe en virksom terapi grunnet sin antiproliferative aktivitet, f.eks. svulster og kreft, eller andre tilstander som kjennetegnes ved uønsket celleproliferasjon, så som restenose.

Lokal levering av IFN-β under anvendelse av genterapi, kan bringe det terapeutiske middel til målområdet mens man unngår potensielle toksisitetsproblemer forbundet med ikkespesifikk administrasjon.

Både in vitro- og in vivo-genterapifremgangsmåter tas i betraktning.

Det er kjent flere fremgangsmåter ved overføring av potensielle terapeutiske gener til klart bestemte cellepopulasjoner, jfr. f.eks. Mulligan, "The Basic Science of Gene Therapy", Science, 260, s. 926-931 (1993). Disse fremgangsmåter omfatter:

1) Direkte genoverføring; jfr. f.eks. Wolff et al., "Direct Gene Transfer Into Mouse Muscle In Vivo", Science, 247, s. 1465-1468 (1990);

2) Liposommediert DNA-overføring; jfr. f.eks. Caplen et al., "Liposome-Mediated CFTR Gene Transfer to the Nasal Epithelium of Patients with Cystic Fibrosis", Nature Med., 3, s. 39-46 (1995); Crystal, "The Gene as a Drug", Nature Med., 1, s. 15-17 (1995); Gao og Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent for Efficient Transfection of Mammalian Cells", Biochem. Biophys. Res. Comm., 179, s. 280-285 (1991);

3) Retrovirusmediert DNA-overføring; jfr. f.eks. Kay et al., "In Vivo Gene Therapy of Hemophilia B: Sustained Partial Correction in Factor IX-Deficient Dogs", Science, 262, s. 117-119 (1993); Anderson, "Human Gene Therapy", Science, 256, s. 808-813 (1992);

4) DNA-virusmediert DNA-overføring. Slike DNA-viruser omfatter adenoviruser (fortrinnsvis Ad-2- eller Ad-5-baserte vektorer), herpesviruser (fortrinnsvis herpes simplex-virusbaserte vektorer) og parvoviruser (fortrinnsvis "defekte" eller ikkeautonome parvovirusbaserte vektorer, mer foretrukket adenoassosiert virusbaserte vektorer, mest foretrukket AAV-2-baserte vektorer); jfr. f.eks. Ali et al., "The Use of DNA Viruses As Vectors for Gene Therapy", Gene Therapy, 1, s. 367-384 (1994); US-patent nr. 4.797.368 og US-patent nr. 5.139.941.

Valget av et bestemt vektorsystem for å overføre det aktuelle gen, vil være avhengig av diverse faktorer. En viktig faktor er naturen av målcellepopulasjonen. Selv om retrovirale vektorer er blitt omfattende undersøkt og anvendt i et antall genterapiapplikasjoner, er disse vektorer generelt ikke egnet for å infisere celler som ikke deles. I tillegg har retroviruser et potensial for onkogenisitet.

Adenoviruser har den fordel at de har et bredt vertspektrum, kan infisere passive eller ferdig differensierte celler, så som neuroner eller hepatocytter, og virker i alt vesentlig ikke-onkogenisk; jfr. f.eks. Ali et al., "The Use of DNA Viruses As Vectors for Gene Therapy", Gene Therapy, 1, s. 367 (1994). Adenoviruser virker ikke å integreres i vertgenomet. Fordi de eksisterer ekstrakromosomalt, reduseres risikoen for insersjonell mutagenese vesentlig; Ali et al., "The Use of DNA Viruses As Vectors for Gene Therapy", Gene Therapy, 1, s. 373 (1994).

Adenoassosierte viruser oppviser lignende fordeler som adenoviralbaserte vektorer. AAV'ene oppviser imidlertid setespesifikk integrasjon på humant kromosom 19; jfr. Ali et al., "The Use of DNA Viruses As Vectors for Gene Therapy", Gene Therapy, 1, s. 377 (1994).

I en foretrukken utførelsesform anvendes det IFN-β-muteinkodende DNA ifølge oppfinnelsen ved genterapi for vaskulær glatt muskelcelleproliferasjon etter arteriell skade. Skade i arterieveggen fører til migrasjonen av glatte muskelceller til intima av arterieveggen, hvor de proliferer og syntetiserer ekstracellulære matrikskomponenter; jfr. f.eks. Chang et al., "Cytostatic Gene Therapy for Vascular Proliferative Disorders with a Constitutively Active Form of the Retinoblastoma Gene Product", Science, 267, s. 518 (1995). Denne proliferative respons har vært implisert i patogenesen av aterosklerose.

En klinisk vesentlig bakgrunn for arteriell skade følger perkutan ballong-angioplasti av koronærarteriene. Etter mekanisk utvidelse av arterien, finner det i flere tilfeller sted en cellulær proliferativ respons som fører til en lokal gjenvekst av celler, hvilket minsker hulrommet og forstyrrer blodstrømmen. Denne respons, kjent som restenose, har ikke reagert på konvensjonell behandling med blodplatemotvirkende midler, angiotensinomdannende enzymantagonister eller cytotoksiske legemidler hos mennesker; jfr. f.eks. Ohno et al., "Gene Therapy for Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation After Arterial Injury", Science, 265, s. 781 (1994).

Genterapi med DNA som koder IFN-β-muteinene ifølge oppfinnelsen, kan bli gitt samtidig med eller direkte etter koronær ballong-angioplasti. Denne fremgangsmåte utnytter den antiproliferative aktivitet av IFN-β-muteinene ifølge oppfinnelsen for å forebygge uønsket SMC-proliferasjon. En fagperson vil forstå et det ifølge denne utførelsesform kan anvendes hvilken som helst egnet genterapivektor som inneholder IFN-β-mutein-DNA. Det er kjent teknikker ved konstruksjon av en slik vektor; jfr. f.eks. Ohno et al., "Gene Therapy for Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation After Arterial Injury", Science, 265, s. 784 (1994); Chang et al., "Cytostatic Gene Therapy for Vascular Proliferative Disorders with a Constitutively Active Form of the Retinoblastoma Gene Product", Science, 267, s. 522 (1995). Prosedyren for koronær ballong-angioplasti er velkjent. Innføring av den IFN-β-mutein-DNA-holdige vektor til målarterieområdet kan utføres ved kjente fremgangsmåter, f.eks. som beskrevet i Ohno et al., "Gene Therapy for Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation After Arterial Injury", Science, 265, s. 784 (1994).

For en bedre forståelse av foreliggende oppfinnelse, bringes de følgende eksempler.

EKSEMPLER

Ekspresjonsvektor inneholdende human-IFN-β(Phe_{101})

Vi anvendte plasmidet pGB311 som ekspresjonsvektor. En inngående beskrivelse av pBG311 er gitt i Cate et al., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene in Animal Cells", Cell, 45, s. 685-698 (1986). Vektoren anvender SV40 tidlig promoter, spleisingssignal og polyadenylasjonssignal, og ble konstruert under anvendelse av pAT153 som stamme.

Et DNA-fragment inneholdende DNA-sekvensen vist på Figur 2 (SEKV. ID NR: 2) ble klonet i pBG311 og operativt bundet til SV40 tidlig promoter ved en DNA-sekvens som kodet signalsekvensen for naturlig IFN-β ifølge standard fremgangsmåter. Den erholdte ekspresjonsvektor ble nevnt pBeta-Phe. IFN-β-mutein-DNA-sekvensen (SEKV. ID NR. 2) koder et IFN-β-mutein med en aminosyresekvens som er identisk med naturlig IFN-β, unntatt at Val (V) i stilling 101 - når stillingene nummereres ifølge naturlig forekommende IFN-β - er substituert med Phe (F). Muteinet som kodes av denne sekvens nevnes IFN-β(Phe_{101}).

Kompetent *Escherichia coli* ("SURE", Stratagene) ble transformert med pBeta-Phe-plasmidet ifølge standard fremgangsmåter. Kolonier som inneholdt pBeta-Phe-plasmidet (dvs. som inneholdt en DNA-sekvens som kodet IFN-β(Phe_{101})), ble identifisert ved hybridisering til en oligonukleotid-probe som var spesifikk for IFN-β(Phe_{101}), under anvendelse av en standard fremgangsmåte (Grunstein og Hogness, 1975).

Amplifikasjonsvektor

Vi anvendte plasmidet pAdD26SV(A)-3 for å amplifisere IFN-β(Phe_{101})-genet i våre slutlige transformanter. Dette plasmid beskrives i Kaufman og Sharp, "Construction of a Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis of

Signals Utilized for Efficient Expression", Mol. Cell. Biol., 2, s. 1304-1319 (1982) og i US-patent nr. 4.740.461. Plasmidet uttrykker murin dihydrofolatreduktase (DHFR) under transkripsjonskontrollen av sen hovedpromoter (MLP) av Adenovirus 2 (Ad2). En 5'-spleisingsstilling, derivert fra et immunoglobulin-variabel region-gen er plassert mellom Ad2 MLP og DHFR-kodesekvensene. SV40-polyadenylasjonsstillingen finnes nedenfor DHFR-genet. Plasmidet inneholder prokaryot-replikasjonsorigoen (ori) og tetracyklinresistensgenet fra pBR322.

Transformasjon av en cellelinje

CHO-DUKX-B1-DHFR-cellelinjen ble kotransformert med pBeta-Phe-plasmidet og plasmidet pAdD26SV(a)-3. Denne cellelinje ble derivert fra den naturlige CHO-K1-cellelinje ved etylmetansulfonat- og UV-strålingsindusert mutagenese; jfr. Chasin og Urlaub, "Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, s. 4216-4220 (1980). Dihydrofolatreduktase katalyserer omdannelsen av folat til tetrahydrofolat. Celler uten funksjonell DHFR trenger eksogene ribonukleosider og deoksyribonukleosider for å vokse. Hemming av veksten kan induseres med metotreksat, en folatanalog, som bindes til og hemmer DHFR. Titrering av metotreksat kan føre til metotreksatresistens ved amplifikasjon av DHFR-genet (Kaufman og Sharp, "Construction of a Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis of Signals Utilized for Efficient Expression", Mol. Cell. Biol., 2, s. 1403-1319 (1982). Amplifikasjon og økt ekspresjon av gener nære DHFR finner ofte sted når DHFR amplifiseres. Derfor oppviser celler som er resistente mot høye metotreksatmengder, ofte økt spesifikk produktivitet av nærliggende gener.

pBeta-Phe-plasmidet (spaltet med Xmn1) og plasmidet pAdD26SV(a)-3 (spaltet med Stu1) ble blandet i et forhold på 10:1. DNA'et ble overført til CHO-DUKX-B1-DHFR-celler ved elektroporering. Cellene ble plassert på plater i ikke-

selektivt α^+-medium (α-MEM-base plus ribonukleosider og deoksyribonukleosider, 10 % føtalt kalveserum [FBS], 4 mM glutamin) og fikk vokse i 2 dager. Mediet ble deretter skiftet ut mot α^--medium (α-MEM-base uten ribonukleosider og deoksyribonukleosider, 10 % FBS, 4 mM glutamin) + 50 nM metotreksat (MTX). Cellene ble fjernet ved trypsinisasjon og plassert på plater med ca. 8×10^5 celler/10 cm vevkulturplate. Etter 14 dager ble klonene høstet og dyrket i 96 brønners vevkulturplater. Én klon ble ekspandert til en 12 brønners vevkulturplate og deretter, 7 dager senere, plassert i en 6 brønners vevkulturplate i nærvær av 250 nM MTX. Denne klon ble ekspandert i en T75-kolbe (dyrket i α^--medium + 250 nM MTX) og deretter amplifisert i 750 nM MTX. En subklon ble plassert inn i en 96 brønners vevkulturplate, ekspandert i en 48 brønners vevkulturplate, deretter en 6 brønners vevkulturplate og deretter en T75 vevkulturkolbe.

Rensing av IFN-β(Phe_{101})

IFN-β(Phe_{101}), fremstilt ved kultivering av ovennevnte subklon (eller andre som ligner den) og deretter utsondret inn i kulturmediet, kan renses ved immunoaffinitetskromatografi, i alt vesentlig som beskrevet av Okamura et al., "Human Fibroblastoid Interferon: Immunosorbent Column Chromatography and N-Terminal Amino Acid Sequence", Biochem., 19, s. 3831-3835 (1980).

CNBr-sefarose 4B-harpiks (2 g; 7 ml) fremstilles ved å suspendere i 1 mM HCl. Gelen vaskes med 1 mM HCl i 15 minutter på et herdet glassfilter. Anti-IFN-β-mAbs (så som BO2, Yamasa, Japan), kobles til CNBr-sefarose 4B-harpiks ved å inkubere i koblingsbuffer (100 mM $NaHCO_3$, pH 8,3, 500 mM NaCl) i 2 timer ved værelsestemperatur på en pendelplattform. Vanligvis kobles 1-2 mg IFN-β-mAbs pr. ml harpiks, men denne mengde kan variere. Den ubehandlede CNBr blokkeres med 100 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM NaCl, over natten ved 4°C. Alternativt blokkeres det ureagerte CNBr med 100 mM etanolamin under i alt vesentlig de samme betingelser.

Den koblede harpiks vaskes med tre sykluser med vekslende pH. Hver syklus består av en vasking med acetatbuffer (100 mM, pH 4) som inneholder 500 mM NaCl, etterfulgt av en vasking med Tris-buffer (100 mM, pH 8) som inneholder 500 mM NaCl.

En kolonne på 1 cm x 3 cm (2,3 ml bedvolum) prepareres med den koblede harpiks. Kolonnen ekvilibreres med PBS (> 5 kolonnevolumer). IFN-β(Phe_{101})-holdige prøver fortynnes 1:3 i ekvilibreringsbuffer, pH 6,8, og tilføres. Tilføringer følges av PBS, vaskes med 20 mM K_2HPO_4, 1 M NaCl, pH 6,8, og elueres med 200 mM natriumcitrat, pH 2. pH-verdien av eluatet ble justert til 6 ved å fortynne prøven med 500 mM Mes, pH 6.

Karakterisering ved peptidkartlegging

Et IFN-β(Phe_{101})-mutein som var blitt fremstilt og renset på en forskjellig og mindre foretrukket måte enn beskrevet ovenfor, ble karakterisert ved peptidkartlegging. En 30 µg alikvot IFN-β(Phe_{101})- eller naturlig IFN-β-prøve ble lyofilisert, suspendert i 200 µl endoproteinase-Lys-C-spaltningsbuffer (100 mM TRIS, pH 9, 0,5 mM EDTA), inkubert i 12 timer ved 22°C med 1,5 µg endoproteinase-Lys-C og underkastet kartleggingsanalyse på en C_8- reversfase HPLC-kolonne (0,45 x 25 cm). Kolonnen ble benyttet med en 30 minutters 0-70 % gradient acetonitril i 0,1 % TFA ved 1,4 ml/min. Utstrømningen fra kolonnen ble overvåket ved 214 nm. Figur 4, Panel A viser en del av peptidkartet for IFN-β(Phe_{101}), hvor pilen peker mot peptidet TFLEEK (SEKV. ID NR. 3). Denne topp forekom ikke i peptidkartet for naturlig IFN-β. Figur 4, Panel B, viser det tilsvarende område av peptidkartet for naturlig IFN-β, og pilen peker mot peptidet TVLEEK (SEKV. ID NR: 4). Identiteten av TFLEEK og TVLEEK ble verifisert ved proteinsekvensanalyse. Vi går ut ifra at IFN-β(Phe_{101})'et og det naturlige IFN-β var over 98 % rene. Proteinkonsentrasjonene ble beregnet fra absorbansen ved 280 nm under anvendelse av en ekstinksjonskoeffisi-

ent på 1,5 for en 1 mg løsning. For å stabilisere proteinene for biologiske undersøkelser, ble de fortynnet til 4 µg/ml i PBS som inneholdt 5 % FBS og 5 mM HEPES, pH 7,5.

Antiviral aktivitet av IFN-β(Phe_{101}) i CPE-assayet

Preparatet av IFN-β(Phe_{101}) som ble karakterisert ved peptidkartlegging, ble analysert for antiviral aktivitet ved et assay for cytopatisk effekt (CPE). Det ble fremstilt en naturlig rekombinant IFN-β-standard i "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM), 10 % FBS og 4 mM glutamin, i en konsentrasjon på 10000 enheter/ml, og denne ble lagret i alikvoter ved -70°C. På dag 1 ble standarden, kontrollen og IFN-β(Phe_{101})-prøvene fortynnet i DMEM, 10 % FBS og 4 mM glutamin i tre fortynningsserier: i) utgående fra 64 enheter/ml, etterfulgt av fortynning to ganger, ii) utgående fra 12 enheter/ml, etterfulgt av fortynning 1,5 gang og iii) utgående fra 6 enheter/ml, etterfulgt av fortynning 1,2 gang. 50 µl av fortynningene ble deretter tilsatt i kolonner til brønnene av 96 brønners mikrotiterplater. A549-celler ble tilsatt til hver brønn i en konsentrasjon på 10^5 celler/ml, 50 µl per brønn, i DMEM, 10 % FBS og 4 mM glutamin, og cellene ble inkubert ved 37°C, 5 % CO_2, i 15-20 timer.

Plateinnholdet ble rystet inn i en blekebøtte, og det ble tilsatt 100 µl encefalomyokarditisvirus (EMC-virus) i en egnet fortynning i medium til hver brønn. Viruset og cellene ble inkubert ved 37°C, 5 % CO_2, i 30 timer. Plateinnholdet ble deretter rystet inn i en blekebøtte, og det ble tilsatt 0,75 % krystallviolettfarge til platene. Etter 5-10 minutter ble platene vasket med destillert vann og fikk tørke før de ble undersøkt visuelt.

Prøvene og standardene ble testet i to eksemplarer på hver assayplate, hvilket gav to datapunkter pr. fortynningsserie og assaydag.

IFN-β(Phe_{101}) ble testet i 14 assayer i hver to eksemplarer. Naturlig rekombinant IFN-β ble anvendt som standard. På grunnlag av disse eksperimenter ble det for IFN-β(Phe_{101}) beregnet en spesifikk aktivitet på 4,8 x 10^8 enheter/mg med et 95 % konfidensintervall mellom 3,5-6,7 x 10^8. Naturlig IFN-β hadde en spesifikk aktivitet på ca. 2,0 x 10^8 enheter/mg, med et konfidensintervall mellom 1,6-2,5 x 10^8. Dataen på Figur 5 viser et lignende resultat.

Den spesifikke aktivitet av rekombinant IFN-β(Phe_{101}) er gjennomsnittlig ca. 2,5 ganger høyere enn den spesifikke aktivitet av rekombinant naturlig IFN-β, ifølge vårt antivirale assay.

Analyse av IFN-β(Phe_{101})'s receptorbinding

Det i CPE-assayet ovenfor anvendte IFN-β(Phe_{101}), ble også analysert for sin evne til å bindes til celler som uttrykker interferonreceptorer. For disse undersøkelser bedømte vi bindingen av både naturlig ^{125}I-IFN-β og ^{125}I-IFN-β(Phe_{101}), både til Daudi-celler og til A549-celler (Figur 3). IFN-β uten bærerstoff ble jodinert i alt vesentlig ifølge kloramin-T-metoden. Ureagert jod ble fjernet ved størrelsesutskillingskromatografi på en Superdex 75-kolonne som ble ekvilibrert i PBS inneholdende 1 mg/ml kalveserumalbumin. Konsentrasjonen av det jodinerte IFN-β ble bestemt ved CPE-assayet idet man antok en spesifikk aktivitet på 2 x 10^8 enheter/mg. Normalt ble det tilsatt 5 ng (1 µl; 300000 cpm) jodinert IFN-β (enten for seg selv eller i nærvær av et 50 gangers overskudd ikke-iodinert interferon) til 1,7 ml Eppendorf-rør i et totalt volum på mindre enn 10 µl. Den merkede ligand fikk bindes alene (-) eller måtte konkurrere med umerket IFN-β(Phe_{101}), α2-IFN (α2), γ-IFN (γ) eller naturlig rekombinant IFN-β (WT).

Det ble anvendt både Daudi-celler og A549-celler (American Type Culture Collection). Cellene ble suspendert i DMEM/5 % FBS i en konsentrasjon på 2 x 10^6 celler/ml. Til prøvene av

IFN-β ble det tilsatt 0,5 ml cellesuspensjon. Rørene ble blandet ved inversjon og inkubert ved omgivelsestemperatur i 45 minutter. Cellene ble deretter pelletert ved 1000 x g i 2 minutter og vasket to ganger med 0,5 ml DMEM/10 % FBS. Hver vasking ble etterfulgt av et sentrifugeringstrinn ved 1000 x g i 2 minutter. Cellene ble resuspendert i 0,1 ml, overført til rør for telling, og bindingen ble kvantifisert i en Beckman gamma 407-teller.

Dataen antyder at bindingen av IFN-β(Phe_{101}) er meget lik bindingen av naturlig IFN-β, på begge celletyper. Sammenlignbare mengder naturlig ^{125}I-IFN-β og ^{125}I-IFN-β(Phe_{101}) ble bundet, og de konkurrerte på lignende måte med ikkejodinert α-IFN, naturlig IFN-β og IFN-β(Phe_{101}). Bindingen ble ikke påvirket av tilsetningen av rekombinant human-γ-IFN.

Den antivirale aktivitet av IFN-β(Phe_{101}) nøytraliseres i alt vesentlig av antistoffer mot naturlig IFN-β

Et antall preparater av rekombinant IFN-β(Phe_{101})-mutein fremstilt i CHO-celler som beskrevet ovenfor, ble renset til ca. 90 % renhet ved kolonnekromatografi. Disse prøver ble fortynnet til 25 pg/ml. Naturlig rekombinant IFN-β, heri nevnt IFN-β(Val_{101}), ble fremstilt og renset på i alt vesentlig samme måte.

Standard antivirale og antistoffnøytralisasjonsassayer ble anvendt for å demonstrere at antistoffer mot naturlig IFN-β(Val_{101}) i det minste delvis nøytraliserer IFN-β-(Phe_{101}). Det bestemte antivirale assay og nøytralisasjonsassayet som vi anvendte, beskrevet nedenfor, er i alt vesentlig lik de antivirale og antistoffnøytralisasjonsassayer som beskrives i Europa-patentet EP B1 41313; jfr. s. 26, linjer 1-12; s. 29, linje 48 - s. 32, linje 3.

A. Preparering av celleholdige plater

A549-celler (ATCC CCL185) ble sådd ut i 96 brønners plater i en konsentrasjon på 3 x 10^4 celler/100 µl medium/brønn. Det anvendte medium var "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM), 10 % FBS og 4 mM glutamin. De celleholdige plater ble deretter inkubert ved 37°C, 5 % CO_2, i ca. 24 timer.

B. Preparering av moderplater

Moderplater som inneholdt enten en prøve eller en standard, ble deretter fremstilt med serielt fortynnede brønner (i hver to eksemplarer). Prøvebrønnene inneholdt enten renset rekombinant IFN-β(Phe_{101}) eller naturlig rekombinant IFN-β-(Val_{101}) i nærvær eller fravær av anti-IFN-β-polyklonsera fra kanin. Kontrollbrønnene inneholdt enten kun buffer eller rekombinant naturlig IFN-β (som standard) i nærvær eller fravær av et anti-LFA3-antistoff (dataen ikke vist).

De serielle fortynninger ble utført som følger. 200 µl kontroll eller naturlig eller mutein-IFN-β-prøve (i en konsentrasjon på ca. 25 pg/ml) ble tilsatt til hver brønn i rad A på hver plate. Den slutlige konsentrasjon av prøve i rad A var 8,5 pg/ml. Deretter ble det utført fortynninger på 1:1,5 nedover hver plate.

C. Antistoffer mot naturlig IFN-ß

Antistoffer mot naturlig IFN-β(Val_{101}) ble fremstilt i kaniner som var immunisert med rekombinant naturlig IFN-β-(Val_{101}) Anti-IFN-β-polyklonsera fra kanin ble isolert fra de immuniserte kaniner ved egnede intervaller, samlet og lagret inntil anvendelsen (Rabbit IFN-β serum pool 6/25/93; 5 ml/flaske, 0,02% azid; ref. 0.01742.062).

D. Prøve/Ab-inkubasjon

Anti-IFN-β-polyklonsera fra kanin ble tilsatt til de passende brønner på moderplatene. Den slutlige antistoff-for-

tynning var 1:1000. Antistoff/IFN-β-blandingen ble inkubert ved værelsestemperatur i 45 minutter.

E. Inkubasjon av celler med kontroll, prøve eller prøve/Ab

Mediene ble deretter sugd opp fra de preparerte cellehol-
5 dige plater og skiftet ut mot alikvoter (100 µl/brønn) av kontroll, IFN-β-prøve hhv. IFN-β/Ab-prøve fra de preparerte moderplater. De celleholdige plater ble inkubert ved 37°C, 5 % CO_2, i 16-24 timer.

F. Viralt angrep

10 Det følgende trinn var det virale angrep. Innholdet av de celleholdige plater ble deretter sugd opp, og det ble tilsatt 100 µl løsning av encefalomyokarditisvirus (EMCV) i en egnet fortynning til hver brønn. Viruset og cellene ble inkubert ved 37°C, 5 % CO_2, i 41-45 timer.

15 De celleholdige plater ble fremkalt under anvendelse av XTT/PMS-kolometrisk metode. En 1 mg/ml løsning av XTT (3,3-[1-(fenylamino)karbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis-(4-metoksy-6-nitro)benzensulfonsyre; Sigma) ble fremstilt i fosfatbufret saltvannløsning. En 1 mg/ml løsning av PMS (fenazinmetosul-
20 fat) ble fremstilt i vann. En PMS/XTT-løsning ble fremstilt ved 1:50. Fremkallingsløsningen ble fremstilt ved å fortynne PMS/XTT-løsningen 1:3 i fosfatbufret saltvannløsning. Tetrazoliumforbindelsen XTT reduseres av levende celler for å danne orangefarget formazon. Fargedannelsen korrelerer
25 direkte med antallet levedyktige celler.

De celleholdige plater ble sugd opp og vasket med 150 µl/brønn fosfatbufret saltvannløsning. Hver brønn mottok deretter 150 µl fremkallingsløsning. Platene ble inkubert ved 37°C, 5 % CO_2, i 30-60 minutter.

30 Absorbansen ved 450 nm ble målt på en "Molecular Devices $Thermo_{max}$" mikroplatemåler med Softmax-software. Resultatene

vises grafisk på Figur 5. Absorbansen er plottet mot IFN-β-konsentrasjonen.

Figur 5 viser at i fravær av anti-IFN-β-polyklonsera fra kanin, ble A549-cellene beskyttet fra EMCV av prøvene av mutein-IFN-β(Phe_{101}) (lukket firkant; ■) og naturlig IFN-β-(Val_{101}) (lukket ruter; ♦). Dette antydes av økningen i absorbans (hvilket tyder på flere levende celler) med økende konsentrasjon av mutein-IFN-β eller naturlig IFN-β.

Figur 5 viser også at i nærvær av anti-IFN-β-polyklonsera fra kanin, kunne prøvene av mutein-IFN-β(Phe_{101})(åpen firkant; □) og av naturlig IFN-β(Val_{101}) (åpen ruter; ◊) ikke beskytte A549-cellene fra EMCV. Dette vises av at absorbansverdiene er nær grunnlinjen for alle konsentrasjoner av mutein-IFN-β hhv. naturlig IFN-β, hvilket tyder på at nesten alle A540-celler var døde.

Oppsummert viser Figur 5 at den antivirale aktivitet av mutein-IFN-β(Phe_{101}) ble nøytralisert av antistoffer mot naturlig IFN-β (dvs. anti-IFN-β-antistoffer fra kanin).

Behandling av restenose ved IFN-β-mutein-genterapi

Utgangstesting av genterapi mot restenose utføres på prøvegris under anvendelse av rekombinant naturlig grise-IFN-β ifølge den følgende prosedyre.

Celleproliferasjonen måles ved immunohistokjemi. Alle dyrene får en intravenøs infusjon av BrdC (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), 25 mg/kg total dose, 1 time før dødstidspunktet. Immunohistokjemi med monoklonalt antistoff mot BrdC (1:1000 fortynning, Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, U.S.A.) utføres for å merke kjernene i prolifererende celler, som beskrevet av Goncharoff et al., J. Immunol. Methods, 93, s. 97 (1988). Identifikasjonen av vaskulære glatte muskelceller utføres ved immunohistokjemi med et antistoff mot glattmuskel-α-actin (1:500 fortynning,

Boehringer Mannheim, Tyskland), som beskrevet av Islk et al., Am. J. Pathol., 141, s. 1139 (1992).

Tamme Yorkshire-griser (12-15 kg) bedøves med zolazepamin-tiletamin (6,0 mg/kg) i kombinasjon med (2,2 mg/kg intramuskulær) "rompun" med 1 % lystgass. Iliofemoralarteriene blottes ved en steril kirurgisk fremgangsmåte, og en dobbeltballongkateter innføres i iliofemoralarterien som beskrevet i Nabel et al., Science, 249, s. 1285 (1990). Den proksimale ballong blåses opp til 300 mm Hg ifølge en tilknyttet trykkomsetter i 5 minutter. Ballongen tømmens, og kateteren føres lengre inn, slik at midtområdet mellom den proksimale og den distale ballong nå ligger i segmentet for den tidligere ballongskade. Begge ballonger blåses opp, og segmentet befuktes med heparinsaltvann. Det adenovirale podestoff dryppes i 20 minutter inn i kateterens midtområde. Kateteren fjernes, og den opprinnelige blodstrøm gjenopprettes.

De skadde arterier av alle grisene infiseres med 10^{10} plakkdannende enheter (PFU) pr. ml av en ADV-ΔE1-vektor inneholdende en innsetting som koder grise-IFN-β eller med en ADV-ΔE1-vektor som mangler denne innsetting. I hvert dyr transfekteres begge iliofemoralarterier med samme vektor ved en titer på 1 x 10^{10} PFU/ml, og det anvendes 0,7 ml i hvert dyr (slutlig dose på 7 x 10^{9} PFU).

21 eller 42 dager senere skjæres blodkarsegmentene i disse dyr ut. Hver arterie behandles på samme måte. Innpodingsområdet mellom de to ballonger skjæres i fem tverrsnitt med lik størrelse. Seksjonene 1 og 4 fikseres i metyl "Carnoy", og seksjonene 3 og 5 fikseres i formalin, og alle seksjoner legges i parafin og farges med hematoksylin-eosin. Det utføres ytterligere antistoffundersøkelser på de i metyl "Carnoy" hhv. i formalin fikserte arterier. Vev fra seksjon 2 hurtigfryses i flytende nitrogen og lagres ved -80°C for DNA-isolasjon. Målinger av det intimale og mediale areal

bestemmes i fire seksjoner fra hver arterie, ved blindmåling med to uavhengige måleapparater, og det beregnes et gjennomsnitt av målingene for hver arterie. Preparatsnitt av arterieprøver undersøkes med et mikroskopbasert videoavbildnings-analysesystem (Image-1 System, Universal Imaging, Weschester, PA, U.S.A.) som beskrevet av Nabel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, s. 10759 (1993).

Alternativt til den ovennevnte adenovirusbaserte Ad-ΔE1-vektor kan det også anvendes direkte genoverføring. En egnet konstruksjon er et plasmid fra RSV-ryggraden, hvor RSV-LTR-promoteren driver ekspresjonen av IFN-β, med SV-40-poly-A'-signal 3' til IFN-β-DNA-sekvensen; jfr. f.eks. Gorman et al., Science, 221, s. 551-553 (1983).

Ovennevnte prosedyre modifiseres da slik at vektoren inneholder en DNA-innsetting som koder human-IFN-β-muteinene ifølge foreliggende oppfinnelse for genterapi i mennesker.

Sekvenser

Det følgende er en oversikt over sekvensene som er oppført i sekvenslisten:

SEKV. ID NR: 1 Aminosyresekvensen av IFN-β(Phe_{101})
SEKV. ID NR: 2 DNA-sekvens som koder IFN-β(Phe_{101}), inklusive DNA-sekvensen som koder signalsekvensen av naturlig IFN-β
SEKV. ID NR: 3 Aminosyresekvens av peptidet TFLEEK
SEKV. ID NR: 4 Aminosyresekvens av peptidet TVLEEK

Deponeringer

E. coli K-12 som inneholder plasmidet pBeta-Phe (som inneholder en DNA-sekvens som koder IFN-β(Phe_{101}) og den naturlige IFN-β-signalsekvens) er blitt deponert. Deponeringen ble gjort i henhold til Budapestavtalen og ble deponert hos the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A. den 11. mars 1994. Deponeringen fikk tilgangsnummeret 69584.

SEKVENSOPPLISTING

(1) GENERELL INFORMASJON:

(i) SØKER: BIOGEN, INC.

(ii) OPPFINNELSENS TITTEL: Nye muteiner av IFN-β

(iii) ANTALL SEKVENSER: 5

(iv) KORRESPONDANSEADRESSE:
(A) ADRESSAT: James F. Haley, Jr.; Fish & Neave
(B) GATE: 1251 Avenue of the Americas
(C) BY: New York
(D) STAT: New York
(E) LAND: U.S.A.
(F) ZIP-KODE: 10020-1104

(v) MASKINLESELIG FORM:
(A) MEDIUM TYPE: diskett
(B) DATAMASKIN : IBM PC-kompatibel
(C) OPERASJONSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, Versjon 1.25

(vi) DATA FOR FORELIGGENDE SØKNAD:
(A) SØKNADSNUMMER: 96.3837
(B) INNGIVELSESDATO: 13. september 1996
(C) KLASSIFISERING: PCT/nasjonal fase

(viii) FULLMEKTIG/SAKSBEHANDLER
(A) NAVN: Haley Jr., James F.
(B) REGISTRERINGSNUMMER: 27.794
(C) REFERANSENUMMER: B179

(ix) TELEKOMMUNIKASJONSINFORMASJON:
(A) TELEFON: (212) 596-9000
(B) TELEFAKS: (212) 596-9090

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR: 1:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
(A) LENGDE: 166 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(C) KJEDETYPE: enkeltkjedet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: protein

(iii) HYPOTETISK: Nei

(iv) ANTI-SENSE: Nei

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR: 1:

```
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1               5                  10                  15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
            20                  25                  30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
        35                  40                  45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
    50                  55                  60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65                  70                  75                  80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
                85                  90                  95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
            100                 105                 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
        115                 120                 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
    130                 135                 140

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

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
                165
```

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR: 2:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
(A) LENGDE: 561 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) KJEDETYPE: enkeltkjedet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISK: Nei

(iv) ANTI-SENSE: Nei

(ix) KARAKTERISTISK TREKK:
(A) NAVN/NØKKEL: sig-peptid
(B) PLASSERING: 1...63

(ix) KARAKTERISTISK TREKK:
(A) NAVN/NØKKEL: mat-peptid
(B) PLASSERING: 64...561

(ix) KARAKTERISTISK TREKK:
(A) NAVN/NØKKEL: CDS
(B) PLASSERING: 1...561

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR: 2:

```
ATG ACC AAC AAG TGT CTC CTC CAA ATT GCT CTC CTG TTG TGC TTC TCC      48
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
-21 -20                 -15                 -10

ACT ACA GCT CTT TCC ATG AGC TAC AAC TTG CTT GGA TTC CTA CAA AGA      96
Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 -5                  1               5                  10

AGC AGC AAT TTT CAG TGT CAG AAG CTC CTG TGG CAA TTG AAT GGG AGG     144
Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
             15                  20                  25

CTT GAA TAC TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC CCT GAG GAG     192
Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
         30                  35                  40

ATT AAG CAG CTG CAG CAG TTC CAG AAG GAG GAC GCC GCA TTG ACC ATC     240
Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
     45                  50                  55

TAT GAG ATG CTC CAG AAC ATC TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT     288
Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 60                  65                  70                  75

AGC ACT GGC TGG AAT GAG ACT ATT GTT GAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC     336
Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
                 80                  85                  90

TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA TTC CTG GAA GAA AAA CTG GAG     384
Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Phe Leu Glu Glu Lys Leu Glu
             95                  100                 105

AAA GAA GAT TTC ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA     432
Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
         110                 115                 120

AGA TAT TAT GGG AGG ATT CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AGT     480
Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
     125                 130                 135

CAC TGT GCC TGG ACC ATA GTC AGA GTG GAA ATC CTA AGG AAC TTT TAC     528
His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
140                 145                 150                 155

TTC ATT AAC AGA CTT ACA GGT TAC CTC CGA AAC                      561
Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
                160                 165
```

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR: 3:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
(A) LENGDE: 187 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR: 3:

```
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
-21 -20                 -15                 -10

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 -5                  1                   5                  10

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
                15                  20                  25

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
            30                  35                  40

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
        45                  50                  55

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
    60                  65                  70                  75

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
                80                  85                  90

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Phe Leu Glu Glu Lys Leu Glu
            95                  100                 105

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
        110                 115                 120

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
    125                 130                 135

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
140                 145                 150                 155

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
                160                 165
```

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR: 4:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
(A) LENGDE: 6 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(C) KJEDETYPE: enkeltkjedet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISK: Nei

(iv) ANTI-SENSE: Nei

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR: 4:

Thr Phe Leu Glu Glu Lys
1 5

(2) INFORMASJON FOR SEKV. ID NR: 5:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
(A) LENGDE: 6 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(C) KJEDETYPE: enkeltkjedet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISK: Nei

(iv) ANTI-SENSE: Nei

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV. ID NR: 5:

Thr Val Leu Glu Glu Lys
1 5

Patentkrav

1. IFN-β-mutein med en aminosyresekvens som er identisk med naturlig IFN-β, unntatt at Val (V) i stilling 101 i naturlig IFN-β - når stillingene nummereres ifølge naturlig forekommende IFN-β - er substituert med Phe (F).

2. IFN-β-mutein ifølge krav 1 omfattende aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 1, hvor Val (V) i stilling 101 - når stillingene nummereres ifølge naturlig forekommende IFN-β - er substituert med Phe (F), hvilket mutein oppviser en antiviral aktivitet som i det minste delvis nøytraliseres av antistoffer mot naturlig IFN-β.

3. IFN-β-mutein ifølge krav 2, med formel:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (SEKV. ID NR: 1).

4. DNA-sekvens som koder et IFN-β-mutein ifølge krav 1, hvilket mutein oppviser en antiviral aktivitet som i det minste delvis nøytraliseres av antistoffer mot naturlig IFN-β.

5. DNA-sekvens som koder et IFN-β-mutein med en aminosyresekvens som er identisk med naturlig IFN-β, unntatt at Val (V) i stilling 101 i naturlig IFN-β - når stillingene

nummereres ifølge naturlig forekommende IFN-β - er substituert med Phe (F).

6. DNA-sekvens ifølge krav 5, som koder et IFN-β-mutein med formel:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (SEKV. ID NR: 1).

7. DNA-sekvens ifølge krav 6, hvor kodonet som koder aminosyren i stilling 101, er TTC.

8. DNA med formelen for SEKV. ID NR: 2.

9. Rekombinant DNA-molekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at DNA-sekvensen ifølge hvilket som helst av kravene 4-8 er operativt forbundet til en ekspresjonskontrollsekvens i det rekombinante DNA-molekyl.

10. Vert som er transformert med et rekombinant DNA-molekyl ifølge krav 9.

11. Fremgangsmåte ved fremstilling av et IFN-β-mutein, hvor Val (V) i stilling 101 i naturlig IFN-β - når stillingene nummereres ifølge naturlig forekommende IFN-β - er substituert med Phe (F), hvilket mutein oppviser en antiviral aktivitet som i det minste delvis nøytraliseres av

antistoffer mot naturlig IFN-β,
k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter trinnene å kultivere en vert ifølge krav 10 og å isolere IFN-β-muteinet.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 11,
k a r a k t e r i s e r t v e d at IFN-β-muteinet kodes av en DNA-sekvens som omfattes av formelen for SEKV. ID NR: 2, og verten er en kultivert dyrecelle.

13. Farmasøytisk sammensetning omfattende en antiviralt, antikreft, antisvulst eller immunomodulatorisk virksom mengde av IFN-β-muteinet ifølge et av kravene 1 til 3 og et farmasøytisk akseptabelt bærerstoff.

14. Anvendelse av en forbindelse ifølge ethvert av kravene 1 - 3 ved fremstilling av et medikament egnet til behandling av virale infeksjoner, kreft eller svulster, eller for immunomodulasjon.

15. Anvendelse ifølge krav 14, hvor muteinet har formel:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (SEKV. ID NR: 1).

16. Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 4 - 9 ved fremstilling av et medikament som er egnet for genterapeu-

tisk behandling av virale infeksjoner, kreftarter, svulster eller uønsket celleproliferasjon, eller for immunomodulasjon, i en bestemt cellepopulasjon eller et vev hos en pasient ved å transformere cellepopulasjonen eller vevet med en slik DNA-sekvens som koder et IFN-β-mutein.

17. Anvendelse ifølge krav 16 hvor DNA-sekvensen koder et IFN-β-mutein med formel:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (SEKV. ID NR: 1).

18. Anvendelse ifølge krav 17, hvor kodonet som koder aminosyren i stilling 101, er TTC.

19. Anvendelse av forbindelse ifølge ethvert av kravene 4 - 9 ved fremstilling av et medikament som er egnet til genterapeutisk behandling av virale infeksjoner, kreftarter, svulster eller uønsket celleproliferasjon eller for immunomodulasjon, i en bestemt cellepopulasjon eller et vev i en pasient ved å transformere cellepopulasjonen eller vevet med en DNA-sekvens som har sekvensen av nukleotidene 1-561 av SEKV. ID NR: 2 eller nukleotidene 64-561 av SEKV. ID NR: 2.

20. Anvendelse ifølge et av kravene 15-19, hvor den virale infeksjon er hepatitt.

21. Anvendelse ifølge krav 20, hvor hepatittarten er forårsaket av hepatitt B virus.

22. Anvendelse ifølge et av kravene 15-19, hvor den uønskede celleproliferasjon er restenose.

23. Anvendelse ifølge et av kravene 15-19, hvor kreftarten er gliom.

24. Anvendelse ifølge et av kravene 15-19, hvor kreftarten er melanom.

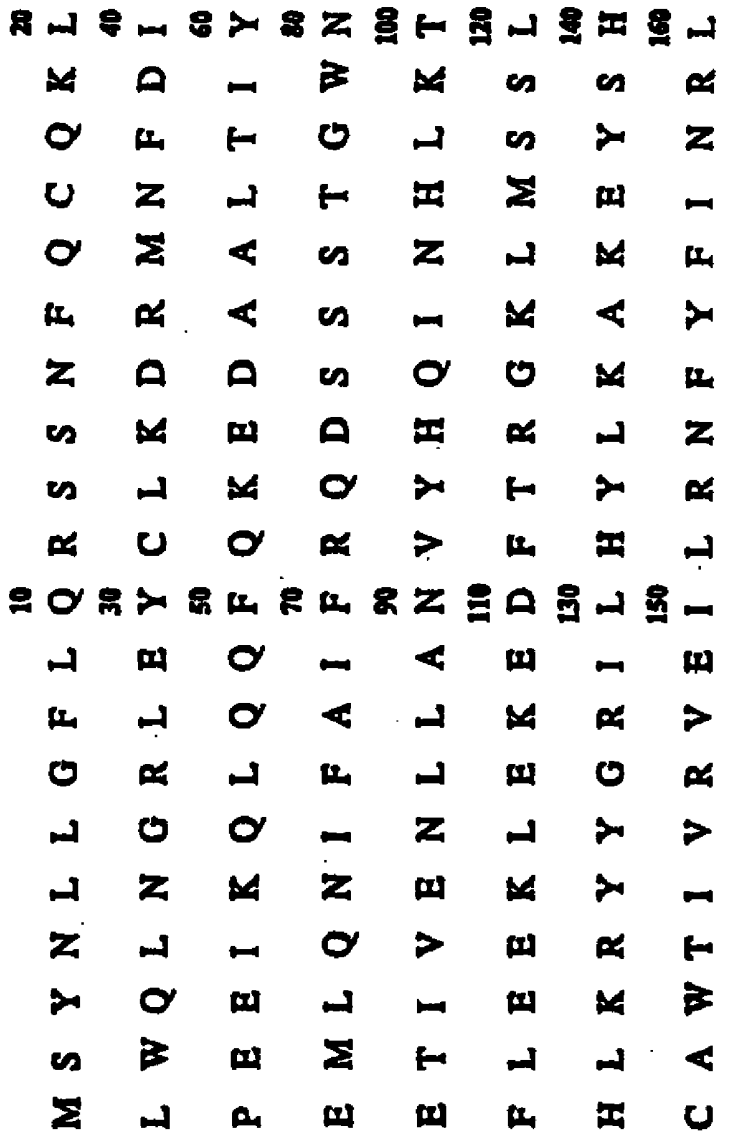

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160
M S Y N L L G F L Q R S S N F Q C Q K L
L W Q L N G R L E Y C L K D R M N F D I
P E E I K Q L Q L Q F Q K E D A A L T I Y
E M L Q N I F A I F R Q D S S S T G W N
E T I V E N L L A N V Y H Q I N H L K T
F L E E K L E E K E D F T R G K L M S S L
H L K R Y Y G R I L H Y L K K A K E Y S H
C A W T I V R V E I L R N F Y F I N R L
T G Y L R N

FIG. 1

```
  -20             -15             -10             -5
ATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAATTGCTCTCCTGTTGTGCTTCTCCACTACAGCT
M  T  N  K  C  L  L  Q  I  A  L  L  L  C  F  S  T  T  A

      1           5              10              15
CTTTCCATGAGCTACAACTTGCTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGCAATTTTCAGTGT
L  S  M  S  Y  N  L  L  G  F  L  Q  R  S  S  N  F  Q  C

      20              25              30              35
CAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATG
Q  K  L  L  W  Q  L  N  G  R  L  E  Y  C  L  K  D  R  M

          40              45              50              55
AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCC
N  F  D  I  P  E  E  I  K  Q  L  Q  Q  F  Q  K  E  D  A

             60              65              70
GCATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCA
A  L  T  I  Y  E  M  L  Q  N  I  F  A  I  F  R  Q  D  S

75              80              85              90
TCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCTATCAT
S  S  T  G  W  N  E  T  I  V  E  N  L  L  A  N  V  Y  H

  95              100             105             110
CAGATAAACCATCTGAAGACATTCCTGGAAGAAAAACTGGAGAAAGAAGATTTCACC
Q  I  N  H  L  K  T  F  L  E  E  K  L  E  K  E  D  F  T

      115             120             125             130
AGGGGAAAACTCATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCAT
R  G  K  L  M  S  S  L  H  L  K  R  Y  Y  G  R  I  L  H

         135             140             145             150
TACCTGAAGGCCAAGGAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATC
Y  L  K  A  K  E  Y  S  H  C  A  W  T  I  V  R  V  E  I

             155             160             165
CTAAGGAACTTTTACTTCATTAACAGACTTACAGGTTACCTCCGAAAC
L  R  N  F  Y  F  I  N  R  L  T  G  Y  L  R  N
```

FIG. 2

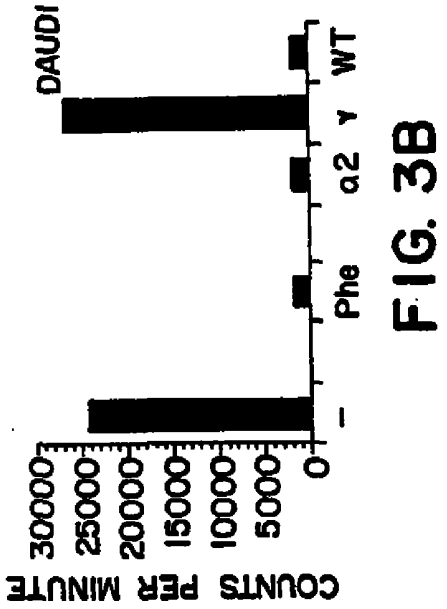


FIG. 3B

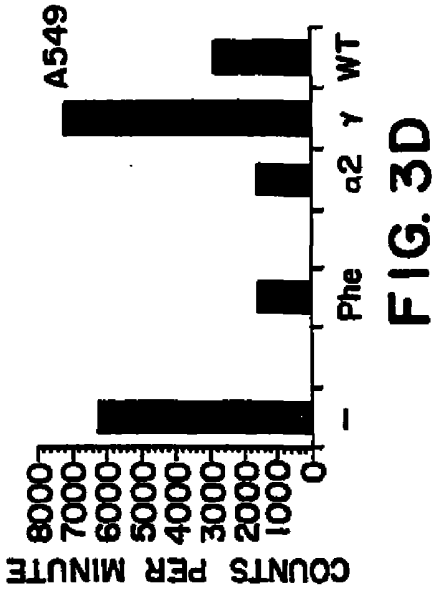


FIG. 3D

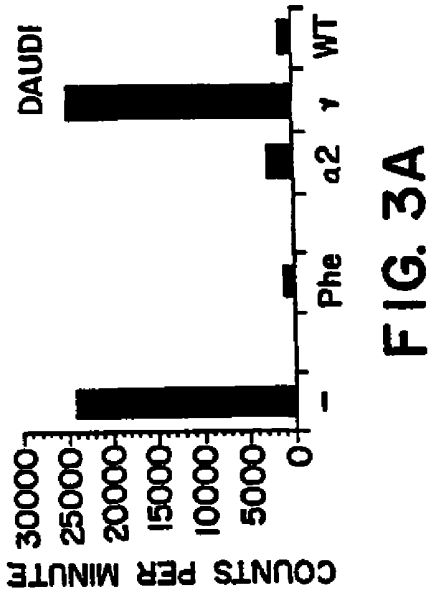


FIG. 3A

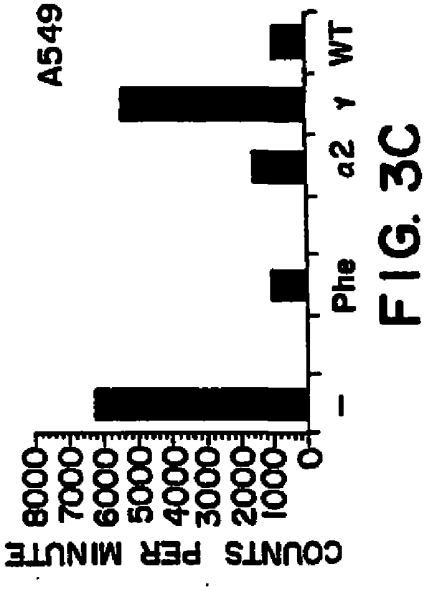


FIG. 3C

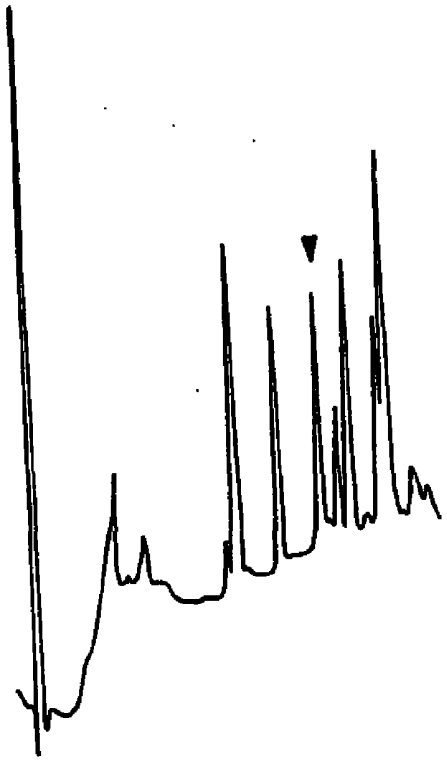


FIG. 4A

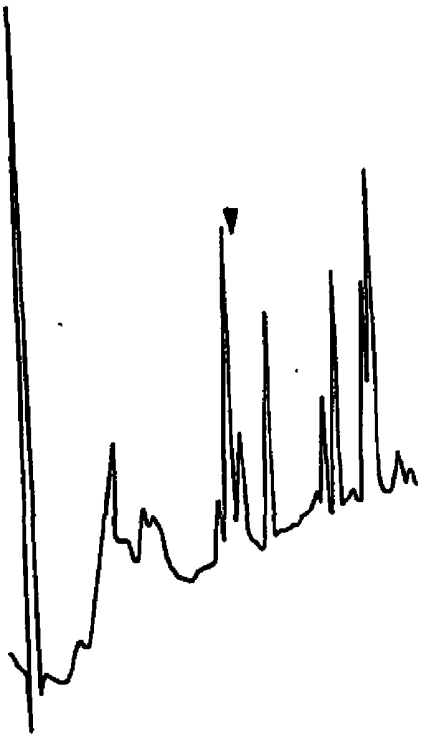


FIG. 4B

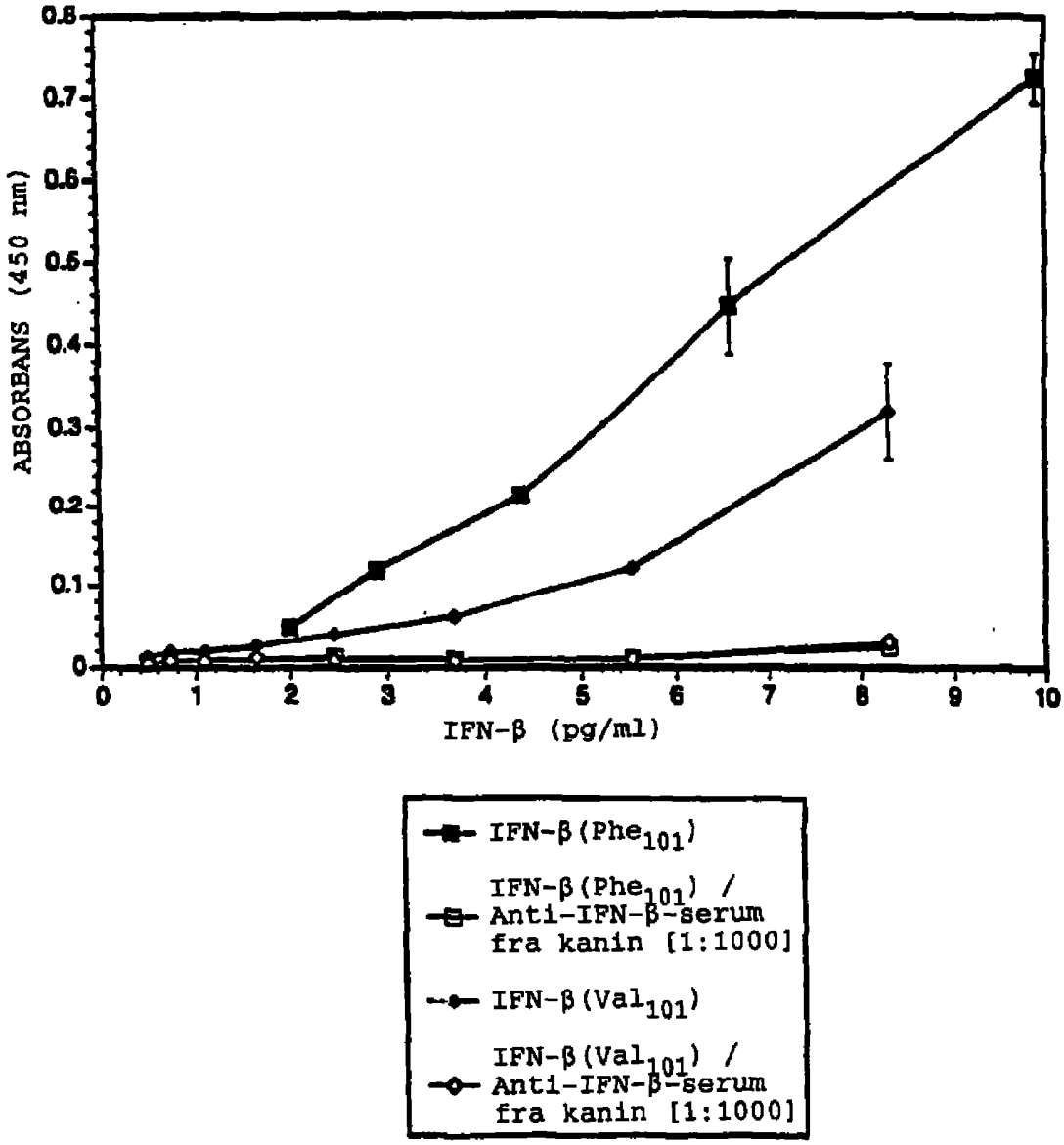

ABSORBANS (450 nm)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
IFN-β (pg/ml)
IFN-β(Phe101)
IFN-β(Phe101) / Anti-IFN-β-serum fra kanin [1:1000]
IFN-β(Val101)
IFN-β(Val101) / Anti-IFN-β-serum fra kanin [1:1000]

FIG. 5