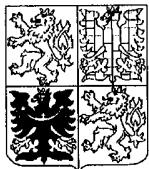


# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

- (22) Přihlášeno: **15.10.1999**  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.10.1998 16.02.1999**  
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/104491 1999/120237**  
(33) Země priority: **US US**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.09.2001**  
**(Věstník č. 9/2001)**  
(86) PCT číslo: **PCT/US99/24200**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/23472**

(21) Číslo dokumentu:

**2001 - 1330**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. C1. <sup>7</sup>:

C 07 K 14/565  
C 07 K 19/00  
C 12 N 15/62  
A 61 K 38/21  
A 61 P 25/02  
A 61 P 31/12  
A 61 P 35/00  
A 61 P 37/00

(71) Přihlašovatel:  
BIOGEN, INC., Cambridge, MA, US;

(72) Původce:  
Whitty Adrian, Hopkinton, MA, US;  
Runkel Laura, Cambridge, MA, US;  
Brickelmaier Margot, Boxford, MA, US;  
Hochman Paula, Newton, MA, US;

(74) Zástupce:  
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Fúzní proteiny interferonu- beta- 1a a jejich použití**

(57) Anotace:

Fúzní polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci X-Y-Z, nebo její část, obsahující aminokyselinovou sekvenci glykosylovaného interferonu-beta (X), přičemž Y je volitelná spojovací část a Z je polypeptid obsahující alespoň část polypeptidu jiného než je glykosylovaný interferon-beta. Výhodně X je lidský interferon-beta-1a. Jsou také popsány mutanty interferonu-beta-1a a farmaceutický prostředek s obsahem tohoto fúzního polypeptidu a jeho použití pro inhibici angiogeneze.

17.07.01

PV 2001-1336

## Fúzní proteiny interferonu-beta-1a a jejich použití

### Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká fúzního polypeptidu, který má aminokyselinovou sekvenci X-Y-Z nebo alespoň její část, kterážto sekvence obsahuje aminokyselinovou sekvenci glykosylovaného interferonu-beta (X), přičemž Y je volitelná spojovací část a Z je polypeptid obsahující alespoň část polypeptidu jiného než je glykosylovaný interferon-beta. Výhodně je X lidský interferon-beta-1a. Vynález se také týká mutant interferonu-beta-1a.

### Dosavadní stav techniky

Použití polypeptidů a proteinů pro systémové léčení specifických nemocí je nyní běžně přijímanou lékařskou praxí. Role, jakou hrají látky tohoto typu v terapii je tak důležitá, že mnohé výzkumy jsou zaměřeny na syntézu velkého množství těchto láttek technologií rekombinantní DNA. Mnohé z těchto molekul jsou endogenní molekuly, které jsou velmi účinné a specifické ve svém biologickém účinku.

Hlavním faktorem, který omezuje užitečnost láttek proteinového charakteru pro jejich zamýšlené aplikace, je to, že při parenterálním podávání jsou z těla za velmi krátký čas eliminovány. K tomu dochází proto, že jsou metabolizovány proteázami, nebo se na jejich eliminaci podílí běžná clearance metabolickými cestami eliminace proteinů, jako je např. filtrace v ledvinách. Problémy spojené s uvedenými způsoby podávání proteinů jsou ve farmaceutickém průmyslu

dobře známy a byly proto užity různé strategie, jak je řešit.

Peptidová rodina, která je cílem klinického výzkumu a mnohých snah o zlepšení podávání a bioasimilace, je rodina interferonů. Interferony byly testovány při mnoha nemocech. Použití humánního interferonu beta, jednoho člena této rodiny, je již zavedeno při léčení roztroušené sklerózy mozkomíšní (*sclerosis multiplex*). Dvě formy rekombinantního interferonu beta byly povoleny v Evropě a v USA pro léčení této nemoci. Jedna forma je interferon beta 1a (ochranná známka AVONEX®, výrobce Biogen, Inc., Cambridge, MA). Termíny "interferon-beta-1a" nebo "IFN-beta-1a" nebo IFN- $\beta$ -1a" nebo "interferon- $\beta$ -1a" jsou v popisu vynálezu užívány zcela zaměnitelně. Jinou formou je interferon-beta-1b (ochranná známka BETASERON®, Berlex, Richmond, CA), dále označovaný jako "interferon-beta-1b". Interferon beta-1a je produkován v savčích buňkách pomocí přirozené sekvence lidského genu a je glykosylován, zatímco interferon beta-1b je produkován v buňkách *E. coli* pomocí modifikované sekvence lidského genu, který obsahuje substituci, kde cystein je nahrazen serinem v pozici 17, a není glykosylován.

Již dříve byla přímým způsobem srovnána relativní aktivita *in vitro* interferonu beta-1a a interferonu beta-1b ve funkčním testu a bylo ukázáno, že specifická aktivita interferonu beta-1a je přibližně 10x vyšší než specifická aktivita interferonu beta-1b (Runkel et al., 1998, Pharm. Res. 15: 641-649). Ve studiích, jejichž cílem bylo zjistit strukturní příčiny rozdílných aktivit, byla identifikována glykosylace jako jediný známý strukturní rozdíl mezi uvedeným dvěma produkty, který ovlivňuje specifickou aktivitu. Vliv sacharidů se projevoval zejména účinkem na stabilizaci struktury. Stabilizující účinek sacharidů na strukturu byl evidentní při experimentech s tepelnou denaturací a v analýze

SEC. Nepřítomnost glykosylace také korelovala se zvýšenou agregací a zvýšenou citlivostí k tepelné denaturaci. Enzymatické odstranění sacharidů z interferonu beta-1a pomocí PNGázy F vedlo k extenzivní precipitaci deglykosylovaného produktu.

Tyto studie ukazují, že i přes konzervativní aminokyselinovou sekvenci interferonu beta-1a a interferonu beta-1b se jedná o odlišné biochemické jednotky a většiny znalostí o interferonu beta-1b nemůže být aplikována na interferon beta-1a a naopak.

#### Podstata vynálezu

Vynález využívá výhod glykosylovaného interferonu-beta ve srovnání s neglykosylovanou formou. Zejména byl vyvinut přípravek obsahující interferon-beta-1a se zvýšenou aktivitou vzhledem k interferonu beta-1b, který má také prospěšné vlastnosti fúzního proteinu obecně, aniž by došlo ke ztrátě aktivity ve srovnání s formami interferonu beta-1a, které nejsou ve formě fúzního proteinu. Tudíž byly provedeny takové modifikace, že produkty (tj. fúzní proteiny interferonu beta-1a) si uchovávají celou nebo většinu své biologické aktivity, a přitom bylo dosaženo následujících vlastností: změněná farmakokinetika a farmakodynamika vedoucí k delšímu biologickému poločasu a změnám tkáňové distribuce (např. schopnost zůstat delší dobu v cévách). Takový přípravek představuje podstatný pokrok v oboru medicíny a farmacie a byl by významným příspěvkem pro léčení nemocí, kde interferon prokázal svou užitečnost jako je např. *sclerosis multiplex*, fibróza a další zánětlivá a autoimunitní onemocnění, různé druhy rakovin, hepatitida a další virové nemoci a nemoci

charakterizované neovaskularizací. Zejména schopnost zůstávat po delší dobu v cévním systému umožňuje, aby byl interferon-beta 1a použit k inhibici angiogeneze a potenciálně také k přestoupení hematoencefalické bariéry.

Předkládaný vynález se zejména týká izolovaného polypeptidu, který má aminokyselinovou sekvenci X-Y-Z, kde X je polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci, nebo alespoň její část, odpovídající aminokyselinové interferonu-beta, Y je volitelná spojovací část a Z je polypeptid obsahující alespoň část polypeptidu jiného než je interferon-beta. Volitelná část (skupina) Y a nutná část Z jsou navázány buďto na N-nebo C-konec interferonu-beta (X). Výhodně je X lidský interferon-beta-1a.

Ve výhodných provedeních Z je alespoň část konstantního úseku imunoglobulinu a může pocházet z imunoglobulinu vybraného ze třídy IgM, IgG, IgD, IgA a IgE. Pokud je imunoglobulin ze třídy IgG, pak jde o jeden z IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4. Konstantní úsek lidského IgM a IgE obsahuje 4 konstantní úseky, a sice CH1 (kloub), CH2, CH3 a CH4, zatímco konstantní úsek lidského IgG, IgA a IgD obsahuje jen 3 konstantní úseky, a sice CH1 (kloub), CH2 a CH3. V nejvýhodnějším fúzním proteinu podle vynálezu obsahuje konstantní úsek alespoň úsek kloubu a domény CH2 a CH3.

V jiném provedení je část Z alespoň část polypeptidu, který obsahuje domény podobné imunoglobulinu. K příkladům takových polypeptidů patří CD1, CD2, CD4 a členy hlavních histokompatibilních antigenů I. a II. třídy.

Dalším provedením vynálezu je fúzní protein mající amino-koncový úsek, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci interferonu-beta nebo její část, a karboxy-koncový úsek, který obsahuje alespoň část proteinu jiného než je interferon-beta. Karboxy-koncový úsek je výhodně alespoň část

konstantního úseku imunoglobulinu pocházejícího ze třídy imunoglobulinů IgM, IgG, IgD, IgA nebo IgE. V nejvhodnějším fúzním proteinu konstantní úsek obsahuje alespoň kloubový úsek a domény CH2 a CH3.

Dalším provedením vynálezu je fúzní protein, jehož interferon-beta část (tj. X ve vzorci uvedeném výše) byla mutována, čímž vznikly muteiny se selektivně zvýšenou antivirovou a/nebo antiproliferační aktivitou nebo s jinými výhodnými vlastnostmi ve srovnání s nemutovanými formami interferonu-beta-1a.

Ještě dalším provedením předkládaného vynálezu je izolovaná DNA kódující fúzní protein popsaný výše. Vynález se týká také rekombinantní DNA, která obsahuje izolovanou DNA kódující výše popsaný fúzní protein a expresní kontrolní sekvenci (tj. sekvenci řídící expresi), kde expresní kontrolní sekvence je operativně spojena s DNA. Vynález zahrnuje také hostitelské buňky transformované rekombinantní DNA podle vynálezu.

Předkládaný vynález se dále týká způsobu přípravy rekombinantního polypeptidu, který spočívá v tom, že se poskytne populace hostitelských buněk podle vynálezu, tato populace hostitelských buněk se kultivuje v podmínkách, kde je exprimován polypeptid kódovaný rekombinantní DNA, a nakonec se tento rekombinantní polypeptid izoluje.

Další aspekt vynálezu se týká fúzního proteinu interferonu-beta-1a, který obsahuje interferon-beta-1a a další polypeptid, se kterým není v přírodě asociován, v podstatě čisté formě, přičemž fúzní protein (zkráceně fúze) má antivirovou aktivitu, která je přibližně s antivirovou aktivitou interferonu-beta-1a postrádajícího další polypeptid.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu je farmaceutický

přípravek obsahující terapeuticky účinné množství fúzního proteinu interferonu-beta-1a.

Ještě další aspekt vynálezu se týká inhibice angiogeneze a neovaskularizace užitím polypeptidů podle vynálezu.

#### Popis obrázků

Obr. 1. cDNA sekvence a dedukovaná aminokyselinová sekvence fúze interferonu-beta s histidinovou značkou (také označ. Jako "his IFN-beta" nebo "His<sub>6</sub>-značený")

Na obrázku jsou uvedeny úplná DNA sekvence a proteinová sekvence histidinem značeného IFN-beta-1a. Štěpená signální sekvence VCAM-1 zanechá 3 zbytky amino-konce (SerGlyGly) "upstream" od histidinové značky (His<sub>6</sub>, pozice 4 až 9). Sekvence enterokinázové spojky (linkeru) (AspAspAspAspLys) je od histidinové značky oddělena oddělovací sekvencí (spacerem) (SerSerGly, pozice 10 až 12). Přírodní sekvence proteinu IFN-beta-1a představuje sekvence Met18 až Asn183.

Obr. 2. cDNA sekvence a dedukovaná aminokyselinová sekvence fúze interferonu-beta-1a/Fc

Na obrázku jsou uvedeny úplná DNA sekvence a proteinová sekvence fúze "lidský IFN-beta-1a/myší Fc". Sekvence lidského IFN-beta-1a proteinu představuje zbytky 1 až 166 (pozice DNA sekvence 1 až 498). Sekvence enterokinázové spojky (linkeru) (AspAspAspAspLys) zaujímá aminokyselinové zbytky 167 až 171 (pozice DNA sekvence 499 až 513). Sekvence těžkého řetězce myšího IgG2a zaujímá aminokyselinové zbytky 172 až 399 (pozice DNA sekvence 514 až 437).

Obr. 3. Vazba mutanty interferonu-beta se substituovaným alaninem na dimerní fúzní protein obsahující extracelulární doménu receptoru interferonu typu I, IFNAR2/Fc

Vazebné afinity alaninem substituované mutanty IFN (A1 až E) pro receptor IFNAR2 byly stanoveny postupem jak je popsáno v příkladu 1 (část D). Histogram představuje vazebné afinity v testu ve srovnání s vazebnými afinitami divokého typu his-IFN-beta (v % d.t., divokého typu). Hodnoty % d.t. byly vypočteny následovně: (afinita divokého typu his-IFN-beta/afinita mutovaného IFN-beta) x 100. Jsou uvedeny hodnoty % d.t. (O) pro jednotlivé experimenty (n=3) a průměrné hodnoty % d.t. (x) pro experimentální soubor. Mutanty A2, AB1, AB2 a E neváží IFNAR2/Fc v koncentraci 500 x vyšší než je EC50 divokého typu (d.t.) his-IFN-beta (\*).

Obr. 4. Vazba mutanty interferonu-beta-1 se substituovaným alaninem na povrchový komplex receptoru interferonu typu I (komplex IFNAR1/2) exprimovaný na buňkách Daudi z Burkittova lymfomu

Receptorově vazebné vlastnosti mutanty se substituovaným alaninem (A1-E) byly stanoveny pomocí vazebného testu pro povrchový buněčný receptor založeného na analýze FACS, jak byl popsán v příkladu 1 (část D). Histogram představuje vazebné afinity v testu ve srovnání s vazebnými afinitami divokého typu his-IFN-beta (v % d.t., divokého typu). Hodnoty % d.t. pro každou mutantu byly vypočteny následovně: (afinita divokého typu his-IFN-beta/ afinita mutovaného IFN-beta) x 100. Jsou uvedeny hodnoty % d.t. (O) pro jednotlivé experimenty a průměrné hodnoty % d.t. (x) pro experimentální soubor.

Obr. 5. Antivirová aktivita mutant interferonu-beta se substituovaným alaninem

Antivirová aktivita mutant se substituovaným alaninem (A1-E) byla stanovena na lidských buňkách A549 infikovaných EMC virem jak bylo popsáno v příkladu 1 (část E). Histogram představuje aktivitu v testu ve srovnání s aktivitou divokého typu his-IFN-beta (v % d.t., divokého typu). Hodnoty % d.t. pro každou mutantu byly vypočteny následovně: (koncentrace divokého typu his-IFN-beta(50% cpe)/koncentrace mutovaného IFN-beta(50% cpe) x 100. Jsou uvedeny hodnoty % d.t. (O) pro vícenásobné pokusy a průměrné hodnoty z pokusného souboru (x).

Obr. 6. Antiproliferační aktivita mutant interferonu-beta se substituovaným alaninem

Antiproliferační aktivita mutant se substituovaným alaninem (A1-E) byla stanovena na Daudi buňkách Burkittova lymfomu jak bylo popsáno v příkladu 1 (část E). Histogram představuje aktivity v testu ve srovnání s aktivitou divokého typu his-IFN-beta (v % d.t., divokého typu). Hodnoty % d.t. pro každou mutantu byly vypočteny následovně: (koncentrace divokého typu his-IFN-beta (50% inhibice růstu)/koncentrace mutovaného IFN-beta(50% inhibice růstu) x 100. Jsou uvedeny hodnoty % d.t. (O) pro vícečetné experimenty a průměrné hodnoty % d.t. (x) pro experimentální soubor.

Obr. 7. Relativní antivirové a antiproliferační aktivity mutant interferonu-beta se substituovaným alaninem

Relativní aktivity mutant se substituovaným alaninem (A1-E) v testu antivirové (osa x) a antiproliferační (osa y) aktivit byly srovnány. Pro toto srovnání byly užity hodnoty průměrného % divokého typu his-IFN-beta (% d.t., x) uvedené

na obr. 5 a 6. Mutanty, které vykazují koordinované změny v obou aktivitách se objeví přímo na vertikální linii nebo v její blízkosti. Mutanty vykazující ztrátu/přírůstek antivirové aktivity, která není úměrná změně v antiproliferační aktivitě, se objeví výrazně mimo diagonálu (DE1, D, C1). Významnost byla stanovena na základě směrodatných odchylek příslušných použité průměrné hodnotě % d.t.

#### Obr. 8. Antivirová aktivita fúze interferon-beta-1a/Ig

Aktivita interferonu-beta-1a (byl použit AVONEX®) nebo fúze interferon-beta-1a/myší Ig2a v koncentracích uvedených na ose x byly hodnoceny v antivirovém testu užitím buněk lidského plicního karcinomu (A549) infikovaných virem EMC. Po dvoudenní inkubaci za přítomnosti viru byly živé buňky obarveny MTT a misky byly vyhodnoceny na čtecím zařízení při 450 nm, a absorbance, která je odrazem životnosti buněk, je uvedena na ose y. Směrodatné odchylky jsou uvedeny jako svislé úsečky. Koncentrace interferonu-beta-1a (byl použit jako surový meziprodukt AVONEX®), která poskytla 50 % maxima při 450 nm a tudíž při které došlo k 50% usmrcení buněk virem („50% cytopatický účinek“) byla 0,4 pM a 50% cytopatický účinek pro fúzovaný interferon-beta-1a byl přibližně 0,15 pM.

#### Obr. 9. Měření antivirové aktivity interferonu-beta v plazmě myší ošetřených fúzí interferonu-beta-1a/Fc nebo interferonem-beta-1a

Myším bylo injikováno buďto 50000 jednotek interferonu-beta-1a (surový meziprodukt AVONEX®) nebo 50000 jednotek fúze interferonu-beta-1a/Fc. Krev z těchto zvířat byla získána retroorbitálním odběrem v různých časech po injekci, jak ukazuje osa x. Pro každý časový bod byla odebrána krev

alespoň ze třech myší, byla připravena plazma a zamražena až do stanovení aktivity interferonu-beta v antivirovém testu s buňkami lidského plicního karcinomu (A549) po infekci virem encefalomyokarditidy. Živé buňky byly obarveny roztokem MTT, destičky byly pak změřeny ve 450 nm ke stanovení absorbance, která je odrazem životnosti buněk a aktivity interferonu-beta. Na každé destičce byly také připraveny standardní (kalibrační) křivky užitím interferonu-beta-1a jako AVONEX® a byly použity ke kvantitativnímu stanovení aktivity interferonu-beta v každém vzorku. Na grafu jsou ukázána data z jednotlivých zvířat.

Obr. 10. Úplná DNA sekvence a proteinová sekvence otevřených čtecích rámců přímé fúze lidského IFN-beta a lidského IgG1Fc (ZL5107).

Obr. 11. Úplná DNA sekvence a proteinová sekvence otevřeného čtecího rámce fúzního proteinu „lidský IFN-beta/G4S linker/lidský IgG1Fc (ZL6206).

Všechna odborná literatura citovaná v popisu je formou odkazu zahrnuta do popisu, pokud není uvedeno jinak. V popisu vynálezu jsou užívány následující termíny:

#### I. Definice

"Interferon" (zkráceně označovaná také jako IFN) je malý, druhově specifický, jednořetězcový polypeptid, který se tvoří v buňkách savců jako reakce na expozici různých induktorům jako jsou např. viry, polypeptidy, mitogeny apod. Nejvhodnější interferon podle vynálezu je glykosylovaný

lidský interferon-beta, který je glykosylován na 80. zbytku (Asn80) a výhodně je připraven technikami rekombinantní DNA. Výhodný glykosylovaný interferon je označován "interferon-beta-1a" (nebo také "IFN-beta-1a", "IFN- $\beta$ -1a", "interferon beta 1a" nebo "interferon- $\beta$ -1a", přičemž všechny uvedené názvy jsou užívány zaměnitelně). Termín "interferon-beta-1a" podle vynálezu zahrnuje i mutované formy interferonu (viz příklad 1) za předpokladu, že i tyto mutanty jsou glykosylované na 80. zbytku (Asn80). Metody přípravy proteinů technikami rekombinantní DNA jsou známy, včetně přípravy různých interferonů, viz např. patenty U.S. č. 4 399 216, 5 149 636 a 5 179 017 (Axel et al.) a 4 470 461 (Kaufman).

Výhodné interferon-beta-1a polynukleotidy, které lze užít podle předkládaného vynálezu, byly odvozeny ze sekvencí interferonu divokého typu různých obratlovců, výhodně savců, a byly získány metodami, které jsou odborníkovi známé a byly popsány, viz např. patent U.S. 5 641 656 (udělený 24.6.1997, DNA kódující ptačí interferonový pro-protein typu I a zralý ptačí interferon typu I), patent U.S. 5 605 688 (25. února 1997 - rekombinantní psí a koňské interferony typu I), patent U.S. 5 231 176 (27. července 1993, DNA molekula kódující lidský leukocytární interferon), patent U.S. 5 071 761 (10. 12. 1991, DNA sekvence kódující subsekvence lidských lymfoblastoidních interferonů LyIFN-alfa-2 a LyIFN-alfa-3), patent U.S. 4 970 161 (13. listopadu 1990, DNA sekvence kódující lidský interferon gama), patent U.S. 4 738 931 (19. dubna 1988, DNA sekvence obsahující gen lidského interferonu beta), patent U.S. 4 695 543 (22. září 1987, lidský gen alfa-interferonu Gx-1) a U.S. 4 456 748 (26. června 1984, DNA sekvence kódující subsekvence různých přirozeně se vyskytujících leukocytových interferonů).

Ve vynálezu se mohou užít také mutanty interferonu-

beta-1a. Mutace se připravují v oboru známými metodami cílené mutageneze. Kromě toho vynález poskytuje funkčně ekvivalentní polynukleotidy interferonu-beta-1a, které kódují funkčně ekvivalentní polypeptidy interferonu-beta-1a.

První polynukleotid interferonu-beta-1a je "funkčně ekvivalentní" ve srovnání s druhým polynukleotidem interferonu-beta-1a, pokud splňuje alespoň jednu z následujících podmínek:

- a) "funkčně ekvivalentní" je první polynukleotid, který hybridizuje s druhým polynukleotidem za standardních hybridizačních podmínek a/nebo je degenerovanou sekvencí vzhledem k sekvenci druhého polynukleotidu, nejvýhodněji kóduje mutantu interferonu mající (terapeutickou) aktivitu interferonu-beta-1a,
- b) "funkčně ekvivalentní" je první polynukleotid, který kóduje expresi aminokyselinové sekvence kódované druhým polynukleotidem.

Lze shrnout, že obecný termín "interferon" zahrnuje, avšak není omezen pouze na ně, všechna agens uvedená v předchozím textu, a také jejich funkční ekvivalenty. Termín "funkční ekvivalent" v popisu vynálezu se týká proteinu interferonu-beta-1a nebo polynukleotidu kódujícího interferon-beta-1a, který má stejný nebo lepší prospěšný účinek na savčího příjemce jako původní interferon, k němuž se funkční ekvivalent vztahuje. Odborníkovi je zřejmé, že funkčně ekvivalentní protein může být připraven rekombinantní technikou, tj. expresí "funkčně ekvivalentní" DNA. Tudíž předmětem předkládaného vynálezu jsou také interferony kódované přirozeně se vyskytující DNA, a také kódované DNA, která se přirozeně nevyskytuje, ale kóduje stejný protein jako je kódován přirozeně se vyskytující DNA. Díky degeneraci nukleotidových kódujících sekvencí se mohou užít jiné

polynukleotidy pro kódování interferonů. K nim patří celé nebo části výše uvedených sekvencí, které byly změněny substitucí různých kodonů, které kódují stejný aminokyselinový zbytek v sekvenci, jde tedy o umlčenou záměnu. Takové změněné sekvence se považují za ekvivalenty těchto sekvencí. Tak např. Phe (F) je kódován dvěma kodony, a sice TTC nebo TTT, Tyr (Y) je kódován TAC nebo TAT a His (H) je kódován CAC nebo CAT. Na druhé straně Trp (W) je kódován jediným kodonem TGG. Tudíž je jasné, že pro danou sekvenci DNA kódující konkrétní interferon existuje mnoho degenerovaných DNA sekvencí, které ho kódují. Tyto degenerované sekvence jsou také předmětem předkládaného vynálezu.

"Fúze" (také fúzní polypeptid nebo fúzní protein) označuje kolineární spojení dvou nebo více proteinů nebo jejich fragmentů prostřednictvím peptidové kostry, a to výhodně tak, že se exprimuje polynukleotidová molekula kódující tyto proteiny. K výhodným fúzním proteinům patří interferon-beta-1a nebo jeho fragment kovalentně spojený s druhou částí, která je odlišná od interferonu. Specificky fúzní protein nebo fúze "interferon-beta/Ig" je protein obsahující molekulu interferonu-beta podle předkládaného vynálezu (tj. interferonu-beta-1a), nebo její fragment, jejíž N-konec nebo C-konec je navázán na N-konec imunoglobulinového řetězce, přičemž část N-konce imunoglobulinu je nahrazen interferonem-beta-1a. Druhem interferon-beta/Ig fúzního proteinu je fúzní protein "interferon-beta/Fc", což je protein obsahující molekulu interferonu-beta podle předkládaného vynálezu (tj. interferonu-beta-1a) spojenou s alespoň částí konstantní domény imunoglobulinu. Výhodná Fc fúze obsahuje obsahující molekulu interferonu-beta podle vynálezu spojenou s fragmentem protilátky obsahujícím C

koncovou doménu těžkého imunoglobulinového řetězce.

Termín "fúzní protein" znamená také protein interferonu-beta chemicky vázaný prostřednictvím mono- nebo heterofunkční molekuly ke druhé části, která je odlišná od proteinu interferonu-beta, a je připraven *de novo* z purifikovaného protein, jak bude dále popsáno.

Termín "rekombinantní" znamená v popisu vynálezu protein pocházející z rekombinantrních savčích expresních systémů. Protein exprimovaný ve většině bakteriálních kultur, jako je např. *E. coli*, bude bez glykanů, a proto takový expresní systém není výhodný. Protein exprimovaný v kvasinkách může obsahovat oligosacharidové struktury, které jsou odlišné od struktur exprimovaných v savčích buňkách.

Termín "biologicky aktivní" užívaný v předkládaném popisu jako charakteristika interferonu-beta-1a znamená, že příslušná molekula sdílí s provedeními vynálezu zde popsanými homologii v sekvenci aminokyselin dostatečnou k tomu, že vykazuje antivirovou aktivitu při měření *in vitro* antivirovým testem stejného typu, jaký je v příkladu 1 (viz popis dále).

Termín "léčivý přípravek" nebo "farmaceutický přípravek" v popisu vynálezu označuje přípravky obsahující proteiny podle vynálezu a další fyziologicky kompatibilní přísady. Léčivý/farmaceutický přípravek dále obsahuje excipienty jako je např. voda, minerály a nosiče jako např. proteiny.

Termín "účinné množství" činidla nebo přípravku označuje takové množství, které poskytuje požadovaný výsledek nebo projevuje vliv na určité onemocnění, které je léčeno.

"Aminokyselina" je monomerní jednotka peptidu, polypeptidu nebo proteinu. Existuje dvacet aminokyselin, které se nacházejí v přirozeně se vyskytujících peptidech, polypeptidech nebo proteinech, a všechny jsou L-isomery. Vynález zahrnuje také analogy aminokyselin a D-isomery

aminokyselin tvořících proteiny a jejich analogy.

"Derivatizovaná" aminokyselina je přírodní aminokyselina nebo aminokyselina nevyskytující se v přírodě, kde normálně se vyskytující postranní řetězce nebo koncové skupiny (nebo cukerná část v případě interferonu-beta-1a) jsou modifikovány chemickou reakcí. K takovým modifikacím patří např. gama-karboxylace, beta-karboxylace, PEGylace, sulfatace, sulfonace, fosforylace, amidizace, esterifikace, N-acetylace, karbobenzylace, tosylace a další modifikace, které jsou odborníkům známy. Takže "derivatizovaný polypeptid" je polypeptid obsahující jednu nebo více derivatizovaných aminokyselin a/nebo jeden nebo více derivatizovaných cukrů, pokud jde o glykosylovaný polypeptid.

"Protein" je polymer složený v podstatě z kterýchkoliv z dvaceti proteinových aminokyselin. I když termín "polypeptid" se často užívá k označení relativně velkých polypeptidů a termín "peptid" se často užívá k označení relativně malých polypeptidů, použití těchto termínů v oboru se často překrývá a je proměnné. V tomto textu se užívá termín "protein" k označení peptidů, proteinů i polypeptidů, pokud není výslovňě uvedeno jinak.

"Funkční ekvivalent" aminokyselinového zbytku je aminokyselina, která má podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, jako aminokyselinový zbytek, který byl nahrazen funkčním ekvivalentem.

Termín "mutanta" (případně "mutace") označuje jakoukoliv změnu v genetickém materiálu organismu, konkrétně je to jakákoliv změna (tj. delece, substituce, adice nebo alterace) v polynukleotidové sekvenci divokého typu nebo jakákoliv změna v proteinu divokého typu. Termín "mutein" se užívá zaměnitelně s termínem mutanta.

Termín "divoký typ" označuje přirozeně se vyskytující

polynukleotidovou sekvenci exonu proteinu nebo její část, nebo aminokyselinovou sekvenci proteinu nebo její část, tak jak se normálně vyskytuje *in vivo*.

"Standardní hybridizační podmínky" jsou podmínky definované koncentrací solí a teplotou v podstatě shodné s podmínkami 0,5 x SSC až 5 x SSC a 65 °C, a to jak pro vlastní hybridizaci tak i promývání. Termín "standardní hybridizační podmínky" zde užívaný je proto operační definice zahrnující celou řadu různých hybridizačních podmínek. Podmínky s vysokou stringencí (přísností) znamenají např. hybridizaci v pufru pro screening plaků (0,2% polyvinylpyrrolidon, 0,2% Ficoll 400, 0,2% hovězí sérový albumin (BSA), 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 1M NaCl, 0,1% hydrogenfosforečnan sodný, 1% SDS) s 10% dextran-sulfátem a 100 µg/ml denaturované sonikované DNA lososího spermatu při 65 °C po 12 až 20 hodin a promývání v 75mM NaCl/7,5mM citrát sodný (0,5 x SSC)/1% SDS při 65 °C. Podmínky s nízkou stringencí jsou např. hybridizace v pufru pro screening plaků s 10% dextran-sulfátem a 110 µg/ml denaturované sonikované DNA lososího spermatu při 55 °C po 12 až 20 hodin a promývání v 300mM NaCl/30mM citrát sodný (2,0 x SSC)/1% SDS při 55 °C (viz Current Protocols in Molecular Biology, John Willey and Sons, Inc., New York, 6.3.1. - 6.3.6., 1989).

"Expresní kontrolní sekvence" je polynukleotidová sekvence, která řídí a reguluje expresi genů, když je s těmito geny operativně spojena.

"Operativně spojena" znamená v případě polynukleotidové sekvence (DNA, RNA), že je "operativně spojena" s expresní kontrolní sekvencí, když expresní kontrolní sekvence řídí a reguluje transkripci a translaci této polynukleotidové sekvence. Termín "operativně spojena" znamená, že před

polynukleotidovou sekvencí, která má být exprimována, je vhodný startovací signál (např. ATG), a že sekvence je ve správném čtecím rámci, který dovoluje expresi polynukleotidové sekvence pod kontrolou expresní kontrolní sekvence, a tudíž produkci požadovaného polypeptidu kódovaného izolovanou polynukleotidovou sekvencí.

"Expresní vektor" je polynukleotid, většinou DNA plazmid nebo fág (jako nejběžnější příklady z dalších), který dovoluje expresi alespoň jednoho genu, když je vektor vnesen do hostitelské buňky. Vektor může ale nemusí být schopen replikace v hostitelské buňce.

Termín "izolovaný" (užívaný v předkládané přihlášce zaměnitelně s termínem "v podstatě čistý"), pokud se týká nukleových kyselin, tj. polynukleotidových sekvencí, které kódují polypeptidy, znamená RNA nebo DNA polynukleotid, část genomového polynukleotidu, cDNA nebo syntetický polynukleotid, který v důsledku svého původu nebo zacházení s ním: I) není spojen se všemi polynukleotidy se kterými je spojen v přírodě (např. je přítomen v hostitelské buňce jako expresní vektor nebo jeho část), II) je spojen s nukleovou kyselinou nebo jinou chemickou skupinou, které se odlišují od těch, se kterými je spojen v přírodě, nebo III) nevyskytuje se v přírodě. Jako "izolovaná" se dále označuje polynukleotidová sekvence, která je : I) amplifikovaná *in vitro* např. metodou polymerázové řetězové reakce (PCR), II) syntetizovaná chemicky, III) rekombinantně připravená klonováním nebo IV) purifikovaná, např. štěpením a gelovou separací.

Takže "v podstatě čistá nukleová kyselina" je nukleová kyselina která není bezprostředně souvisle spojena s jednou nebo oběma sekvencemi, se kterými je normálně souvisle spojena v přírodně se vyskytujícím genomu organismu, ze

kterého je izolována. V podstatě čistá DNA je také rekombinantní DNA, která je částí hybridního genu kódujícího další sekvence.

Termín "izolovaný" (užívaný v předkládané přihlášce zaměnitelně s termínem "v podstatě čistý"), pokud jde o polypeptidy, znamená polypeptid nebo jeho část, který v důsledku svého původu nebo zacházení s ním: I) je přítomen v hostitelské buňce jako expresní produkt úseku expresního vektoru, nebo II) je spojen s jinými proteiny nebo chemickými skupinami, než se kterými je spojen v přírodě, nebo III) nevyskytuje se v přírodě. Jako "izolovaný" se dále označuje polypeptid, který I) byl chemicky syntetizován, II) byl exprimován v hostitelské buňce a purifikován od asociovaných proteinů. Výhodně je izolovaný polypeptid purifikován také od dalších láttek, jako jsou např. protilátky nebo gelová matrix (polyakrylamid), které se užívají k purifikaci.

"Heterologní promotor" je promotor, který v přírodě není spojen s genem nebo purifikovanou nukleovou kyselinou.

Termín "homologní" je zde užíván jako synonymum pro "identický" a týká se sekvenční podobnosti dvou polypeptidů nebo molekul nebo dvou nukleových kyselin. Když je jedna určitá pozice ve dvou srovnávaných sekvencích obsazena stejnou bazí nebo aminokyselinou (např. pozice ve dvou molekulách DNA je obsazena adeninem nebo pozice ve dvou polypeptidech je obsazena lysinem), pak dvě srovnávané molekuly jsou v této pozici homologní. Procento homologie mezi dvěma sekvencemi je funkcí počtu shodných nebo homologních pozic sdílených dvěma sekvencemi dělený celkovým počtem pozic a vynásobený 100. Tak např. jestliže 6 z 10 pozic je shodných nebo-li homologních, pak tyto sekvence jsou z 60 % homologní. Nebo např. DNA sekvence CTGACT a CAGGTT sdílejí 50% homologii (3 pozice ze 6 jsou shodné). Obecně se

srovnání provádí, když jsou sekvence vzájemně přiřazeny tak, aby bylo dosaženo maximální homologie. Takové přiřazení a srovnání lze provést metodou, kterou publikoval Needleman et al. (J. Mol. Biol. 48: 443-453, 1970), a která je standardně implementována v příslušných počítačových programech jako je např. program "Align" (DNASTar, Inc.). Homologní sekvence sdílejí shodné nebo podobné zbytky aminokyselin, kde podobné aminokyselinové zbytky jsou konzervativní substituce nebo tzv. "povolené" bodové mutace odpovídajících aminokyselinových zbytků vzhledem k odpovídající přiřazené referenční sekvenci. V tomto smyslu "konzervativní substituce" aminokyselinového zbytku v referenční sekvenci znamená substituci aminokyselinou, která je fyzikálně nebo funkčně podobná odpovídajícímu zbytku v referenční sekvenci, tedy např. má podobnou velikost, tvar, elektrický náboj, chemické vlastnosti včetně schopnosti vytvářet kovalentní nebo vodíkové vazby apod. Zvláště výhodné jsou kovalentní substituce, které splňují kritéria definovaná jako "přijatelné bodové mutace" v publikaci Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure 5, Suppl. 3, Chapter 22: 352-354, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington D.C., 1978.

Termíny "polynukleotidová sekvence" a "nukleotidová sekvence" jsou užívány v popisu zaměnitelně.

Termíny "angiogeneze" a "neovaskularizace" jsou užívány v nejširším významu a znamenají vytváření nových krevních cév. Zejména angiogeneze se týká také vytváření nových krevních cév v místě nádoru.

Termíny "IFNAR2", "IFNAR1" a "IFNAR1/2" označují proteiny, které tvoří interferonový receptor typu I na povrchu buněk. Extracelulární část (ektodoména) receptoru IFNAR2 sama může vázat interferon beta nebo alfa.

Při provádění předkládaného vynálezu byly použity

standardní metody buněčné biologie, buněčných kultur, molekulární biologie, mikrobiologie, rekombinantní DNA, proteinové chemie a imunologie, které jsou odborníkům známy. Tyto metody byly publikovány v odborné literatuře. Viz např. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. (Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; DNA Cloning, Volumes I and II (D.N. Glover, ed.), 1985; Oligonucleotide Synthesis, (M.J. Gait, ed.), 1984; U.S. Patent No. 4,683,195 (Mullis et al.,); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames and S.J. Higgins, eds.), 1984; Transcription and Translation (B.D. Hames and S.J. Higgins, eds.), 1984; Culture of Animal Cells (R.I. Freshney, ed). Alan R. Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1986; A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal), 1984; Methods in Enzymology, Volumes 154 and 155 (Wu et al., eds), Academic Press, New York; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds.), Academic Press. London, 1987; Handbook of Experiment Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.), 1986; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

## II. Produkce a exprese fúzních proteinů

Předkládaný vynález se týká systému pro vytváření fúzních proteinů interferonu-beta-1a. Vynález se zejména týká těchto proteinů a také molekul rekombinantní DNA používaných pro jejich produkci.

Polypeptidy podle vynálezu lze produkovat různými metodami, které jsou odborníkům známy. Tak např. interferon-

beta-1a úplné délky nebo zkrácený interferon-beta-1a mohou být připraveny známými metodami rekombinantní DNA užitím cDNA (viz dále).

Gen kódující požadovaný polypeptid interferonu-beta-1a může být konstruován na základě aminokyselinové sekvence požadovaného polypeptidu. Pro syntézu genu se pak užijí standardní metody. Tak např. aminokyselinové sekvence se užije pro konstrukci "zpětně přeloženého" genu. Oligomer DNA obsahující nukleotidovou sekvenci kódující interferon-beta-1a může být syntetizován v jediném kroku. Alternativně může být připraveno několik menších oligonukleotidů kódujících části požadovaného interferonu-beta-1a a ty se pak ligací spojí dohromady. Výhodně se DNA sekvence kódující interferon-beta-1a připraví jako několik samostatných oligonukleotidů, které se následně navzájem pospojují (viz příklad 2). Jednotlivé nukleotidy typicky obsahují 5'- nebo 3'-přesahy (přesahující úseky), které umožňují spojení na základě komplementarity.

Po sestavení výhodné geny budou charakteristické tím, že budou rozpoznávány restrikčními endonukleázami (včetně jedinečných restrikčních míst pro přímé vkládání do klonovacího nebo expresního vektoru), preferovaným využitím kodonů vzhledem k hostitelskému expresnímu organismu, který se bude užívat (výhodně savčí buňky), a tím, že po transkripci produkovat stabilní a účinně translatovanou RNA. Správné sestavení lze ověřit sekvencováním, restrikčním mapováním a nebo expresí biologicky aktivního polypeptidu ve vhodném hostiteli.

Savčí cDNA pro interferon-beta může být izolována pomocí vhodné DNA sekvence lidského interferonu-beta-1a jakožto sondy pro screening konkrétní savčí cDNA knihovny mezidruhovou hybridizací. V předkládaném vynálezu byl užit interferon-beta ze savců jako jsou např. primáti, člověk,

myš, pes, kočka, kráva, kůň a prase. Savčí interferon-beta lze získat meziroduhou hybridizací, a sice užitím jednořetězcové cDNA pocházející DNA lidského interferonu-beta jakožto hybridizační sondy k izolaci cDNA pro interferon-beta ze savčích cDNA knihoven. K metodám, které mohou být použity pro izolaci a klonování sekvencí interferonového genu, patří metody popsané ve výše citovaných patentech USA. Relevantní je zejména patent U.S. 4,738,931 (19. Duben 1988), popisující DNA obsahující gen lidského interferonu-beta.

Předkládaný vynález se také týká molekul rekombinantní DNA, které obsahují výše uvedené sekvence DNA.

Molekuly rekombinantní DNA podle vynálezu jsou schopné řídit expresi polypeptidu podle vynálezu v hostiteli, který je jimi transformován. Aby bylo dosaženo exprese, musí sekvence DNA kódující fúzní polypeptid podle vynálezu být operativně spojena s expresní kontrolní sekvencí. Aby bylo dosaženo odpovídající transkripce rekombinantního konstruktu podle vynálezu, do rekombinantního vektoru se výhodně vloží vhodná sekvence promotor/enhanceru, za předpokladu, že sekvence promotor/enhancer je schopna řídit transkripci sekvence nukleové kyseliny kódující glykosylovaný interferon-beta. K promotorům, které se mohou užít k řízení exprese fúzních proteinů založených na imunoglobulinu patří, aniž by tento výčet byl omezující, časný promotor SV40 (Benoist a Chambon, 1981, Nature 290:304-310), promotor obsažený v 3'-koncové dlouhé terminální repetici (LTR) viru Rousova sarkomu (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797), thymidin-kinázový promotor z herpes viru (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:144-1445), regulační sekvence metallothioneinového genu (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42), rostlinné expresní vektory obsahující promotor nopalinsyntetázy (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-

213) nebo 35S RNA promotor z viru mozaiky květáku (Gardner, et al., 1981, *Nucl. Acids Res.* 9:2871), a také promotor fotosyntetického enzymu ribulózabisfotkarboxylázy (Herrera-Estrella et al., 1984, *Nature* 310:115-120); promotorové elemety z kvasinek nebo jiných hub jako je např. Gal4 promotor, promotor ADC (alkoholdehydrogenázy), promotor PGK (fosfoglycerolkinázy), promotor alkalické fosfatázy, a také následující zvířecí transkripční kontrolní úseky, které vykazují tkáňovou specifitu a byly užity u transgenních zvířat: kontrolní úsek genu elastázy I, který je aktivní v buňkách pankreatu (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425515); zesilovače (enhancers) nebo promotory genu pro insulin, které jsou aktivní v beta-buňkách pankreatu (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); enhancers nebo promotory imunoglobulinových genů, které jsou aktivní v lymfatických buňkách (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); úsek promotoru a enhanceru časných genů cytomegaloviru (Boshart et al., 1985, *Cell* 41:521530); kontrolní úsek myší virus nádoru prsní žlázy, který je aktivní v buňkách varlat a prsu, a lymfatických a žírných buňkách (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); kontrolní úsek albuminového genu, který je aktivní v játrech (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); kontrolní úsek genu pro alfafetoprotein, který je aktivní v játrech (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 235:53-58); kontrolní úsek genu alfa 1-antitrypsinu, který je aktivní v játrech (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); kontrolní úsek beta-globinového genu, který je aktivní v myeloidních buňkách (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338-

340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); kontrolní úsek genu pro myelinový bazický protein, který je aktivní v oligodendrocytech mozku (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); kontrolní úsek lehkého řetězce 2 myosinu, který je aktivní v kosterním svalstvu (Sani, 1985, Nature 314:283-286); a kontrolní úsek genu hormonu uvolňujícího gonadotropiny, který je aktivní v hypothalamu (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378). Prokaryotické expresní systémy, jako např. LAC promotor nebo beta-laktamázový promotor (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731) nejsou výhodné pro předkládaný vynález, neboť takto exprimovaný interferon-beta by nebyl glykosylovaný. Nicméně prokaryotické expresní systémy, které umožní glyksoylaci interferonu-beta buďto v prokaryotickém nebo eukaryotickém hostiteli, jsou také předmětem předkládaného vynálezu.

Expresní vektory, které mohou být použity, jsou například, aniž by však tento výčet byl omezující, následující vektory nebo jejich deriváty: lidské nebo zvířecí viry jako je virus vakcínie, vektory založené na adenovierch nebo retrovirech, hmyzí viry jako bakuloviry, kvasinkové vektory, bakteriofágové vektory (např. lambda) a plazmidové a kosmidové DNA vektory, abychom jmenovali alespoň některé. Specificky k užitečným expresním vektorům pro výhodné eukaryotické hostitele patří vektory obsahující expresní kontrolní sekvence z SV40, hovězího papillomaviru a cytomegaloviru. Uvnitř každého specifického vektoru se vyberou různá místa pro vložení požadované DNA sekvence. Tato místa jsou většinou definována restrikčními endonukleázami, které v těchto místech štěpí DNA. Odborníkovi je toto dobře známo. Je také jasné, že daný expresní vektor užitečný pro vynález nemusí mít restrikční endonukleázová místa pro

inzerci vybraného fragmentu DNA. Místo toho se vektor spojí s fragmentem alternativním způsobem.

Expresní vektor, místo vybrané pro inzerci vybraného fragmentu DNA a operativní spojení k expresní kontrolní sekvenci jsou určeny mnoha různými faktory jako je např. počet míst štěpitelných konkrétním restrikčním enzymem, velikost polypeptidu, citlivost polypeptidu k proteolytické degradaci apod. Výběr vektoru a inzerčních míst pro danou DNA je pak dán balancí těchto faktorů.

Rekombinantní konstrukty podle vynálezu se vnesou do buněk, které jsou schopné exprimovat fúzní protein, metodami, které jsou odborníkům známy. K těmto metodám patří transformace (např. metodou s DEAE-dextranem nebo kalciumfosfátem), transfekce, mikroinjekce, infekce, vstřelování do buňky a elektroporace buňky. Může být užita jakákoli hostitelská buňka, za předpokladu, že sekvence rekombinantní nukleové kyseliny bude adekvátně transkribována do RNA v buňkách tohoto typu a že tyto buňky jsou schopny glykosylovat protein. Kromě toho jakékoli konstrukty rekombinantní nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být užity k vytvoření transgenních zvířat, s výjimkou člověka, schopných produkovat fúzní proteiny založené na imunoglobulinu. Ve výhodném provedení vynálezu jsou hostitelské buňky savčí buňky jako jsou např. buňky COS nebo CHO.

Úspěšnou inkorporaci těchto polynukleotidových konstruktů do daného expresního vektoru je možno identifikovat obecně třemi možnými postupy: (a) DNA-DNA hybridizací, (b) přítomností či absencí funkcí "markerových" genů, a (c) expresí vložené sekvence. V prvním z uvedených případů se přítomnost genu interferonu-beta-1a v expresním vektoru detekuje hybridizací DNA-DNA užitím sondy, která

obsahuje sekvence homologní s vloženým genem fúzního proteinu. Ve druhém případě se rekombinantní systém vektor/hostitel identifikuje a selektuje na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti určité markerové funkce (např. thymidinkinázová aktivita, resistance k antibiotikům jak např. G418, transformovaný fenotyp, vytváření okluzních tělísek u bakuloviru apod.) způsobené vložením cizorodého genu do vektoru. Tak např. když je polynukleotid vložen do vektoru tak, že přerušuje sekvenci markerového genu, rekombinanty obsahující inzert jsou identifikovány na základě absence funkce markerového genu. Ve třetím případě je rekombinantní expresní vektor identifikován testováním exprese cizorodého genového produktu z rekombinantního vektoru. Takové testy jsou např. založeny na fyzikálních nebo funkčních vlastnostech genového produktu v biologických testovacích systémech.

Je třeba mít na paměti, že ne všechny kombinace hostitel/expresní vektor fungují se stejnou účinností při exprese DNA kódující polypeptid podle vynálezu. Avšak odborník může provést konkrétní výběr kombinace hostitel/expresní vektor při uvážení principů stanovených v předkládaného vynálezu aniž by se odchýlil od vynálezecké myšlenky předkládaného vynálezu.

Výhodné provedení předkládaného vynálezu zahrnuje fúzní proteiny a sekvence DNA, které tyto proteiny kódují. Tyto fúzní proteiny mají amino-koncový úsek charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí interferonu-beta-1a a karboxykoncový úsek obsahující doménu proteinu jiného než je interferon-beta-1a. Generický vzorec výhodného fúzního proteinu je protein mající aminokyselinovou sekvenci X-Y-Z, kde X je polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci, nebo alespoň její část, odpovídající aminokyselinové sekvenci

lidského interferonu-beta, Y je volitelná spojovací část (linker) a Z je polypeptid obsahující alespoň část polypeptidu jiného než je lidský interferon-beta. V jednom provedení část Z je část polypeptidu, který obsahuje imunoglobulinu podobnou doménu. K příkladům takových polypeptidů patří CD1, CD2, CD4 a členy I. a II. třídy antigenů hlavního histokompatibilního systému (pro příklady těchto polypeptidů viz také přihlášku U.S. 5 565 335, Capon et al.).

Část Z obsahuje např. několik histidinových zbytků, nebo výhodné Fc úsek imunoglobulinu, přičemž "Fc" je definován jako fragment protilátky obsahující C-koncovou doménu těžkého řetězce imunoglobulinu.

V nejvýhodnějším provedení fúzního proteinu podle vynálezu je polypeptid interferonu-beta-1a fúzován prostřednictvím svého C-konce s alespoň částí Fc úseku imunoglobulinu. Interferon-beta-1a tak vytváří amino-koncovou část a Fc vytváří karboxy-koncovou část fúzního proteinu. V těchto fúzních proteinech je výhodně omezen na kloubový úsek konstantní domény a domény CH2 a CH3. Fc fragment těchto fúzních protein může být také omezen na část kloubového úseku, která je schopna tvořit intermolekulární disulfidické můstky, a domény CH2 a CH3, nebo odpovídající funkční ekvivalent. Takové konstantní úseky mohou pocházet z jakéhokoliv savce (výhodně člověka) a mohou být získány z jakékoliv třídy a/nebo izotypu protilátky včetně IgA, IgD, IgM, IgE and IgGI, IgG2, IgG3 a IgG4.

Molekuly rekombinantní nukleové kyseliny kódující Ig fúze lze připravit jakoukoliv metodou v oboru známou (viz Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) nebo užitím veřejně dostupných klonů. Metody přípravy

genů, které kódují konstantní úseky těžkých a lehkých řetězců imunoglobulinu, byly popsány např. v Robinson, R. et al., mezinárodní patentová přihláška PCT publikovaná jako W087/02671. Sekvence cDNA kódující molekulu interferonu nebo její fragment může být přímo spojena s DNA sekvencí kódující konstantní úsek těžkého řetězce imunoglobulinu nebo může být spojena prostřednictvím spojovací sekvence (linkeru). V jiném provedení vynálezu je rekombinantní expresní systém vytvořen tak, že obsahuje sekvenci kódující interferon-beta ve správném čtecím rámci se syntetickým úsekem pro kloubovou oblast protilátky. Kromě toho může být potřebné vložit, jako část rekombinantního vektorového systému, nukleové kyseliny odpovídající 3'-koncový úsek lemující imunoglobulinový gen obsahující místa pro štěpení a polyadenylaci RNA a "downstream" sekvence. A dále může být potřebné vložit signální sekvenci do polohy "upstream" od kódující sekvence imunoglobulinového fúzního proteinu, aby se umožnila sekrece fúzní molekuly z buněk transformovaných rekombinantním vektorem.

Předkládaný vynález poskytuje dimerní fúzní molekuly a také monomerní nebo multimerní molekuly obsahující fúzní proteiny. Takové multimerní molekuly mohou být připraveny užitím takových Fc úseků Ig molekul, nebo jejich částí, které jsou obvykle multivalentní jako jsou např. pentamery IgM nebo dimery IgA. Je zřejmé, že polypeptid J řetězce je potřebný pro vytvoření a stabilizaci pentamerů IgM a dimerů IgA. Alternativně multimery fúzních proteinů interferonu-beta-1a mohou být připraveny užitím proteinu s afinitou k Fc úseku Ig molekul, jako je např. protein A. Tak např. mnohé fúzní proteiny interferon-beta-1a/imunoglobulin mohou být navázány na agarózové perličky s proteinem A.

Tyto polyvalentní formy jsou užitečné, neboť mají mnoho vazebných míst pro receptor interferonu-beta-1a. Např. bivalentní rozpustný interferon-beta-1a je složen ze dvou tandemově se opakujících sekvencí aminokyselin 1 až 166 v sekvenci id. č. 2 (nebo kódovaných úsekem 1 až 498 sekvence id. č. 1) (část X v generickém vzorci) oddělených spojovacím úsekem (část Y), a tato repetice je spojena s alespoň částí konstantní domény imunoglobulinu (část Z). Pozměněné polyvalentní formy mohou být zkonstruovány, např. chemickým navázáním fúze interferon-beta-1a/Ig na klinicky přijatelnou nosičovou molekulu, polymer vybraný ze skupiny obsahující Ficoll, polyethylenglykol nebo dextran, a sice obvyklými metodami konjugace. Alternativně může být interferon-beta-1a chemicky konjugován s biotinem, a tento konjugát biotin-interferon-beta-Fc se pak naváže na avidin, čímž vznikne tetravalentní molekula avidin/biotin/interferon-beta. Fúze interferon-beta-1a/Ig může být také kovalentně navázána na dinitrofenol (DNP) nebo trinitrofenol (TNP), a výsledný konjugát pak precipitován pomocí anti-DNP nebo anti-TNPIgM, čímž se vytvoří dekamerní konjugáty s valencí 10 pro vazebná místa k receptoru interferonu-beta.

Proteiny interferonu-beta-1a a jejich fragmenty a fúzní proteiny podle vynálezu mohou být izolovány a purifikovány obvyklými metodami, jako je např. extrakce, precipitace, chromatografie, afinitní chromatografie, elektroforéza apod. Např. interferonové proteiny a jejich fragmenty se mohou purifikovat tak, že se jejich roztok nanese na kolonu obsahující imobilizovaní receptory interferonu (viz např. patent USA č. 4,725,669). Navázané molekuly interferonu se pak eluují užitím chaotropní soli nebo užitím vodného roztoku kyseliny octové. Imunoglobulinové fúzní proteiny mohou být purifikovány tak, že procházejí přes obsahující imobilizovaný

protein A nebo protein G, které selektivně váží úsek Fc fúzního proteinu (viz např. Reis, K. J., et al., J. Immunol. 132:30983102 (1984); PCT přihláška publikovaná jako WO87/00329). Chimerická protilátka se pak eluuje užitím chaotropní soli nebo užitím vodného roztoku kyseliny octové.

Alternativně se molekuly fúzního proteinu interferonu a imunoglobulinu pro získání v podstatě čistého proteinu purifikují na koloně s anti-interferonovou protilátkou nebo na koloně s anti-imunoglobulinovou protilátkou.

Termínem "v podstatě čistý" je míněn protein zbavený nečistot, které jsou s ním v přirozeném stavu spojeny. V podstatě čistý stav je možné dokázat výskytem jediného pásu při elektroforéze.

Příkladem užitečného fúzního proteinu interferon-beta-la/Ig podle vynálezu je protein sekvence id. č. 2, který je sekernován v buněčné kultuře eukaryotických buněk obsahujících expresní plazmid pCMG261 (viz příklad 2). Tento protein se skládá ze zralého lidského interferonu-beta-1a fúzovaného s částí kloubového úseku a konstantními doménami CH<sub>2</sub> a CH<sub>3</sub> myšího Ig. Přitom obsahuje úsek myšího imunoglobulinu dostatečný k tomu, aby byl rozpoznán Fc vazebným proteinem, a sice proteinem A.

Další fúzní proteiny podle vynálezu obsahující lidský interferon-beta-1 jsou uvedeny: (a) jako sekvence id. č. 3 a 4, ukazující cDNA a dedukovanou aminokyselinovou sekvenci his-označené fúze interferonu-beta-1a (také ukázána na obr. 1), a (b) sekvence id. č. 1 pro cDNA kódující fúzní protein interferon-beta-la/Ig se sekvencí id. č. 2 (ukázán také na obr. 2).

Výhodné proteiny interferonu-beta-1a podle vynálezu obsahující novou "spojovací" sekvenci DNA id. č. 5 a aminokyselinovou sekvenci id. č. 6 představující kodony 11

tripletů na obou stranách spoje mezi DNA lidského interferonu-beta a DNA kódující konstantní úsek lidského imunoglobulinu (viz příklad 5: sekvence id. č. 41 a 42). Specificky, sekvence id. č. 5 kódující lidský interferon-beta-1a končí nukleotidovým tripletem 568-570 (AAC) a DNA kódující konstantní úsek lidského IgG1 začíná tripletem (GAC) počínaje nukleotidem č. 574 v sekvenci id. č. 41. Odpovídající dedukovaná aminokyselinová "spojovací" sekvence je uvedena jako sekvence id. č. 6 a je založena na sekvenci id. č. 42. Byla definována i další jedinečná "spojovací" sekvence, která zahrnuje linkerovou sekvenci ve výsledném DNA konstraktu (viz příklad 5: sekvence id. č. 43 a 44). Tato sekvence "spojovací" DNA a příslušná aminokyselinová sekvence jsou uvedeny jako sekvence id. č. 7 a 8, které ukazují kodony 11 tripletů na obou stranách spoje přímo mezi koncem sekvence interferonu-beta-1a (nukleotid č. 570 v sekvenci id. č. 43) a sekvencí linkeru (nukleotidy 571 až 585 v sekvenci id. č. 43, GGGGS v sekvenci id. č. 8).

"Spojovací" DNA sekvence mohou být užity jako DNA sondy a jsou to minimální DNA potřebné pro hybridizaci za standardních podmínek s jakoukoliv DNA sekvencí kódující fúzní protein interferon-beta-1a/Ig. Nicméně za předpokladu, že celá sonda hybridizuje s oběma stranami spojovací sekvence a obě strany spoje interferon-beta/konstantní úsek se podílejí na hybridizaci, mohou existovat i menší sekvence. Navíc odborníkovi je zřejmé, že DNA sekvence větší než sekvence id. č. 7 jsou také vhodné pro hybridizaci. Odborník může snadno otestovat, zda konkrétní sonda, jak např. sekvence id. č. 5 nebo 7, je schopna hybridizace na obou stranách spojení, a to tak, že označí 5'-konec buďto jednořetězcového "sense" oligonukleotidu nebo jednořetězcového "anti-sense" oligonukleotidu vhodně značeným

fosfátem z ATP užitím polynukleotidkinázy. Sekvence podle vynálezu musí hybridizovat s oběma, a tudíž být označena oběma oligonukleotidovými sondami. Odborníkovi je také zřejmé, že vynález zahrnuje také plně degenerované sekvence kódující spojovací sekvenci id. č. 5 nebo 7.

### III. Další varianty interferonových fúzních polypeptidů

K derivátům proteinů podle vynálezu patří také různé strukturní formy primárních proteinů, které si uchovávají biologickou aktivitu. Díky přítomnosti ionizovatelné aminoskupiny a karboxylové skupiny mohou být fúzní proteiny interferonu-beta např. ve formě kyselých nebo bazických solí, nebo mohou být v neutrální formě. Jednotlivé aminokyselinové zbytky mohou být modifikované oxidací nebo redukcí. A dále primární aminokyselinová struktura (včetně N- a/nebo C-koncových úseků) nebo glykanová část interferonu-beta mohou být modifikovány (derivativovány") vytvářením kovalentních nebo agregovaných konjugátů s jinými chemickými skupinami, jako jsou např. glykosylové skupiny, polyalkylenglykolové polymery jako např. polyethylenglykol (PEG: viz současně projednávané přihlášky stejného přihlašovatele č. 60/104,491 a 60/720,237), lipidy, fosfáty, acetyllové skupiny apod., a nebo vytvářením mutací aminokyselinových sekvencí.

K dalším derivátům interferonu-beta/Ig patří kovalentní nebo agregované konjugáty interferonu-beta nebo jeho fragmentů s jinými proteiny nebo polypeptidy, které jsou připojeny syntézou v rekombinantní kultuře jako dodatečné C- nebo N-konce. Tak např. konjugovaný peptid může být signální (nebo tzv. vedoucí) polypeptidová sekvence v N-koncovém úseku proteinu, která při translaci (kotranslačně) nebo po translaci (posttranslačně) směruje

přenos proteinu z místa jeho syntézy do místa jeho působení uvnitř buňky nebo vně buněčné membrány nebo buněčné stěny (např. vedoucí sekvence alfa-faktoru kvasinek). Receptorové proteiny interferonu-beta mohou obsahovat peptidy přidané pro usnadnění purifikace nebo identifikace interferonu-beta (např. fúze histidin/interferon-beta-la). Aminokyselinová sekvence interferonu-beta může být také spojena s peptidem Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988.) Tato sekvence je silně antigenní a poskytuje epitop rezervabilně vázaný specifickou monoklonální protilátku, což umožňuje rychlé testování a snadné čištění exprimovaného rekombinantního proteinu. Tato sekvence je také specificky štěpena enterokinázou z hovězí sliznice v místě zbytku bezprostředně následujícím po dvojici Asp-Lys.

K dalším analogům patří fúzní proteiny interferonu-beta s Fc nebo jejich biologicky aktivní fragmenty, jejich sekvence interferonu-beta se liší od sekvencí uvedených jako sekvence id. č. 2, 4, 6 nebo 8 jednou nebo více konzervativními záměnami aminokyselin nebo jednou či více nekonzervativními záměnami, a nebo delecemi nebo inzercemi, které nenarušují biologickou aktivitu izolovaného proteinu. Ke konzervativním substitucím typicky patří substituce jedné aminokyseliny druhou aminokyselinou s podobnými vlastnostmi, jako jsou např. substituce v rámci následujících skupin: valin, alanin a glycin; leucin a isoleucin; kyselina asparagová a glutamová, asparagin a glutamin; serin a threonin; lysin a arginin; a fenylalanin a tyrosin. K nepolárním hydrofobním aminokyselinám patří alanin, leucin, isoleucin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan a methionin. K polárním neutrálním aminokyselinám patří glycín, serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin a glutamin. K pozitivně

nabitým (bazickým) aminokyselinám patří arginin, lysin a histidin. K negativně nabitým (kyselým) aminokyselinám patří kyselina asparagová a kyselina glutamnová. Další konzervativní substituce jsou odborníkovi jasné. Tak např. pro konzervativní substituci aminokyseliny alaninu je možné vybrat kteroukoliv z aminokyselin jako je D-alanin, glycín, beta-alanin, L-cystein a D-cystein. Pro lysin lze vybrat jako náhradu kteroukoliv z aminokyselin D-lysin, arginin, D-arginin, homo-arginin, methionin, D-methionin, ornitin a D-ornitin. Obecně substituce, u kterých se dá očekávat, že způsobí změny ve funkčních vlastnostech izolovaných polypeptidů, jsou případy, kdy: (i) polární zbytek, např. serin nebo threonin, je nahrazen (nebo se užije k nahrazení) hydrofobním zbytkem, např. leucinem, isoleucinem, fenylalaninem nebo alaninem (ii) cysteinový zbytek je nahrazen (nebo se užije k nahrazení) jiným zbytkem a nebo (iii) zbytek mající elektropozitivní vedlejší řetězec např. lysin, arginin nebo histidin, je nahrazen (nebo se užije k nahrazení) zbytkem majícím elektronegativní vedlejší řetězec, jako je např. kyselina glutamová nebo asparagová, nebo (iv) zbytek mající objemný vedlejší řetězec, jako je např. fenylalan, je nahrazen (nebo se užije k nahrazení) zbytkem, který nemá takový vedlejší řetězec, např. glycinem. Vynález také zahrnuje izolované molekuly, které jsou alelickými variantami, přirozenými mutantami, indukovanými mutantami nebo proteiny, které jsou kódovány DNA hybridizující za podmínek vysoké či nízké stringence s nukleovými kyselinami kódujícími polypeptid se sekvencemi id. č. 2, 4, 6 nebo 8.

Původci připravili další mutanty interferonu-beta-1a, které jsou dalšími variantami části interferonu-beta-1a v proteinu podle vynálezu. Tyto interferon-beta-1a části

mohou být zvláště užitečné, pokud projevují nové vlastnosti, které nemá interferon-beta-1a divokého typu (viz příklad 1). Stručně shrnuto, byla provedena mutační analýza lidského interferonu-beta-1a s cílem mapovat aminokyselinové zbytky nutné pro aktivitu a vazbu receptoru. Dostupnost trojrozměrné krystalové struktury lidského interferonu-beta-1a (viz Karpusas et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 11813-11818) umožnila identifikovat, pro alaninové (nebo serinové) substituce zbytky, které jsou vystaveny rozpouštědlu a jsou dostupné pro interakce s receptorem interferonu-beta, a přitom zachovat aminokyselinové zbytky podílející se na vytváření intramolekulárních vazeb. Byl připraven panel 15 alaninových "sklenovacích" mutant, kde bylo nahrazeno 2 až 8 zbytků v určitých oblastech šroubovic (A, B, C, D, E) a smyček (AB1, AB2, AB3, CD1, CD2, DE1, DE2) interferonu-beta-1a (viz příklad 1).

Amino-koncová histidinová značka ("his" tag) byla vložena pro afinitní purifikaci mutant exprimovaných v savčích buňkách (sekvence id. č. 2, obr. 1). Funkční důsledky těchto mutací byly vyhodnoceny pomocí antivirových a antiproliferačních testů. Byl také vyvinut neradioaktivní vazebný test pro analýzu schopnosti mutant vázat se na receptor interferonu-beta na povrchu buněk (buněčný povrchový receptor IFNAR1/2). Navíc byl užit test založený na ELISA-testu užívající fúzní protein "ektodoméma IFNAR2/Fc" k navázání interferonu pro mapování povrchových interakcí mezi interferonem-beta-1a a IFNAR2 (viz příklad 2). Tyto mutační analýzy ukázaly, že N- a C-konce leží v části molekuly interferonu-beta, která není důležitá pro vazbu receptoru nebo pro biologickou funkci.

Byly identifikovány tři druhy účinků, které byly způsobeny cílenou mutagenezí. Tyto účinky mohou být za

určitých okolností výhodné při vývoji interferonových léčiv. Tyto tři účinky byly následující: (a) mutanty s vyšší antivirovou aktivitou než interferon-beta-1a divokého typu s his-značkou (např. mutanta C1), (b) mutanty aktivní jak v antivirovém tak antiproliferačním testu, ale jejich antiproliferační aktivita byla neúměrně nízká ve srovnání s antivirovou aktivitou, vzhledem k interferonu-beta-1a divokého typu s his-značkou (např. mutanty C1, D a DE1), a (c) funkčně antagonistické mutanty (např. A1, B2, CD2 a DE1), které vykazují antivirovou i antiproliferační aktivitu, která byla neúměrně nízká ve srovnání s vazebnou aktivitou k receptoru, vzhledem k interferonu-beta-1a divokého typu.

Kromě toho i spojení mezi interferonovou částí (X) a druhou částí (Z), která je odlišná od interferonu-beta-1a (např. Fc fragment imunoglobulinu) může být způsobeno chemickou reakcí, která bude vázat obě molekuly tak dlouho, dokud si imunoglobulin a interferon-beta-1a zachovají své aktivity. K takovým chemickým spojením patří např. kovalentní vazba, afinitní vazba, interkalace, koordinační vazba a vytvoření komplexu. Příkladem spojovacích činidel (tj. linkeru Y v generickém vzorci), která vytvoří kovalenmtní vazby mezi interferonovou a imunoglobulinovou částí patří organické sloučeniny jako např. thioestery, karbodiimididy, sukcinimidestery, diisokyanáty jako je tolylen-2,6-diisokyanát, glutaraldehydy, diazobenzeny a hexamethylen-diaminy jako je např. bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylendiamin, bifunkční deriváty imidoesterů jako je dimethyladipimidát, a biaktivní sloučeniny fluoru jako je 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzen. Tento výčet není samozřejmě vyčerpávajícím seznamem různých tříd chemických vazebných činidel v oboru známých. Mnohá z nich jsou také komerčně dostupná jako např. N-sukcinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionát (SPDP),

hydrochlorid 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)karbodiimidu (EDC); 4-sukcinimidyoxykarbonyl-alfa-methyl-alfa-(2-pyridyl-dithio)-toluen (SMPT: Pierce Chem. Co., katalog. č. 21558G).

#### IV. Využití vynálezu

Fúzní proteiny podle vynálezu se mohou využít ve farmaceutických přípravcích tam, kde je potřeba užit léčení interferonem. Tyto molekuly mají výhody fúzních proteinů, zejména fúzních proteinů s Ig, jde zejména o změněnou farmakokinetiku a farmakodynamiku, která vede k prodlouženému biologickému poločasu a prodloužené době setrvání v cévním systému. Kromě toho zvláště výhodné proteiny glykosylovaného interferonu-beta-1a, ačkoliv jsou strukturně podobné interferonu-beta-1b, mají mnohonásobně vyšší biologickou aktivitu než neglykosylovaný interferon-beta-1b (viz Runkel et al., 1998, Pharm. Res. 15: 641-649).

Produkty podle vynálezu byly shledány užitečnými pro udržení biologického poločasu terapeutického interferonu-beta-1a, a mohou být pro terapeutické podávání upraveny např. rozpuštěním ve vodě nebo v jiném vhodném kapalném médiu. Podávání se provádí parenterálním nebo perorálním způsobem nebo ve formě aerosolu. Pro perorální podávání mohou být připraveny jemné koloidní suspenze pro dosažení depotního účinku při parenterálním podávání, nebo při perorálním podávání, zatímco aerosolové přípravky jsou povahou kapalné přípravky nebo ve formě suchého prášku. Fúze interferonu-beta-1a podle předkládaného vynálezu by měly mít dobrou stabilitu při skladování v suchém lyofilizovaném stavu nebo jako kapalné přípravky.

Terapeutické proteiny podle předkládaného vynálezu mohou být užity k profylaxi nebo k léčení jakékoli nemoci

nebo poruchy, pro které je účinnou složkou interferon-beta-1a. kromě toho fúzní proteiny podle vynálezu se mohou užít pro diagnózu složek, stavů nebo nemocí v biologických systémech nebo vzorcích, stejně tak jako pro diagnostiku v jiných než fyziologických systémech.

Při terapeutickém využití předkládaný vynález předpokládá využití k léčení zvířete, která buďto již trpí nebo je latentně náchylné k onemocnění a vyžaduje tudíž takové léčení, které spočívá v tom, že se zvířeti podává účinné množství fúzního proteinu podle vynálezu, které je terapeuticky účinné pro danou nemoc nebo poruchu. K subjektům, které budou léčeny fúzními proteiny podle vynálezu patří zvířata a především člověk. V závislosti na nemoci nebo stavu, které mají být léčeny, zvířeti se podává fúzní protein interferonu-beta-1a podle vynálezu v jakékoli terapeuticky účinné a bezpečné dávce, kterou odborník snadno stanoví bez nutnosti nadměrného experimentování. Vzhledem k mezidruhové bariéře pro interferony typu I je nebytné připravit fúzní proteiny interferonu-beta-1a podle vynálezu vždy s interferony z odpovídajícího biologického druhu.

Antiproliferační buněčná aktivita interferonu-beta-1a je dobře známa. Konkrétně některé fúze interferonu-beta-1a popsané v předkládané přihlášce jsou užitečné k léčení nádorových a rakovinných onemocnění, jako je např. osteogenní sarkom, lymfom, akutní lymfocytární leukémie, karcinom prsu, melanom a nasofaryngeální karcinom, a také autoimunitních onemocnění jako je např. fibróza, lupus a roztroušená skleróza mozkomíšní. Také se dá očekávat, že antivirová aktivita, kterou projevují fúzní proteiny podle vynálezu, se využije k léčení virových onemocnění, jak je např. infekce ECM, chřipka a další infekce respiračního traktu, hepatitida a rabies. Také se dá očekávat, že

imunomodulační aktivita, kterou projevují fúzní proteiny podle vynálezu, se využije k léčení autoimunitních a zánětlivých onemocnění jako je např. fibróza a roztroušená skleróza mozkomíšní. Schopnost interferonu-beta-1a inhibovat vytváření nových krevních cév (tj. inhibovat angiogenezi a neovaskularizaci) předurčuje fúzní proteiny podle vynálezu k použití při léčení angiogenních nemocí jako je např. diabetická retinopatie, retinopatie předčasně narozených, makulární degenerace, odvržení štěpu rohovky, neovaskulární glaukom, retrorentální fibroplázie, rubeóza a Osler-Weberův syndrom. Kromě toho antiendoteliální aktivita interferonu je již nějakou dobu známa a jeden z možných mechanismů působení interferonu může být narušení aktivity endotelových buněk tím, že inhibuje produkci nebo aktivitu angiogenních faktorů produkovaných nádorovými buňkami. Některé cévní nádory, jako např. hemangiomy, jsou zvláště citlivé k léčení interferonem. Léčení interferonem alfa je zatím jediným doloženým způsobem léčení této nemoci. Lze očekávat, že léčení fúzními proteiny interferonu-beta-1a podle vynálezu poskytne značný farmaceutický prospěch ve smyslu zlepšené farmakokinetiky a farmakodynamiky, neboť konjugáty zůstávají v cévách po delší dobu než nekonjugované interferony, což umožňuje mnohem účinnější terapii při použití konjugátů jako antiangiogenního léčiva (viz příklad 9).

Fúze polymer-interferon-beta-1a podle vynálezu mohou být podávány jako takové a nebo ve formě farmaceuticky přijatelných esterů, solí nebo jiných fyziologicky aktivních derivátů. V těchto farmaceutických přípravcích je interferon-beta-1a výhodně užíván společně s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči, a volitelně jakýmkoliv dalšími terapeutickými složkami. Nosič musí být farmaceuticky přijatelný v tom smyslu, že musí být kompatibilní s ostatními

složkami v přípravku a nesmí být nadměrně škodlivý pro příjemce. Přípravek interferonu-beta-1a se podává v množství účinném pro dosažení požadovaného farmakologického účinku, jak již bylo popsáno výše, a v takových dílčích množstvích, aby bylo dosaženo požadované denní dávky.

K vhodným lékovým formám patří formy pro parenterální i jiné podávání, k vhodným specifickým způsobům podávání patří např. podávání perorální, rektální, bukální, topické, nazální, oftalmické, subkutánní, intramuskulární, intravenózní, transdermální, intrathekální, intraartikulární, intraarteriální, subarachnoidální, bronchiální, lymfatické, vaginální a intrauterinní. Výhodné jsou lékové formy pro perorální, nazální a parenterální podávání.

Pokud je interferon-beta-1a užit v přípravku, který obsahuje tekutý roztok, přípravek se výhodně podává perorálně nebo parenterálně. Pokud je interferon-beta-1a užit v přípravku, který je ve formě tekuté suspenze nebo suchého prášku formulován společně s biologicky kompatibilním nosičem, pak se může výhodně podávat perorálně, rektálně nebo bronchiálně.

Pokud je interferon-beta-1a užit v přípravku přímo jako tuhá látka ve formě prášku, výhodně se může podávat perorálně. Alternativně se může podávat nazálně nebo bronchiálně, pomocí nebulizace prášku v nosičovém plynu, kdy se vytváří disperze prášku v plynu, kterou pacient vdechuje, a sice užitím vhodného nebulizačního zařízení.

Přípravky obsahující fúzní proteiny podle předkládaného vynálezu se výhodně formulují do jednotkových lékových forem, a sice jakýmkoliv metodami, které jsou odborníkům ve farmaci známy. Tyto metody obecně obsahují krok, kdy se účinná složka smísí s nosičem a případně dalšími pomocnými složkami. Typicky se přípravky připravují uniformním a

dokonalým smísením účinné složky (či více účinných složek) s kapalným nosičem, jemně rozmělněným tuhým nosičem nebo oběma, a pak se produkt podle potřeby formuluje do požadovaných lékových forem.

Přípravky podle vynálezu vhodné pro perorální podávání jsou v podobě diskrétních jednotek jako jsou např. tobolky, oplatky, tablety nebo pastilky, kdy každá taková forma obsahuje předem stanovené množství účinné složky v podobě prášku nebo granulátu, nebo v tekuté formě, vodné nebo bezvodé, jako je např. sirup, elixír, emulze nebo pěna.

Tablety se připravují lisováním nebo odléváním, případě s jednou nebo více pomocnými složkami. Lisované tablety se připravují lisováním na vhodných zařízeních, kde se užívá účinná složka ve volně sypké formě jako je prášek nebo granulát, která se případně míší s pojídly, rozvolňujícími činidla, lubrikanty a inertními ředidly, povrchově aktivními činidly a uvolňovacími činidly. odlévané tablety obsahují směs práškového polymerového konjugátu s vhodným nosičem a připravují se odléváním pomocí vhodného zařízení.

Sirup se připraví přidáním účinné látky do koncentrovaného vodného roztoku cukru, např. sacharózy, ke kterému se přidají ještě další pomocné přísady. K takovým přísadám patří příchutě, konzervační činidla, činidla zpomalující krystalizaci cukru a činidla zvyšující rozpustnost ostatních složek jako jsou např. polyhydroxyalkoholy, jako je glycerol nebo sorbitol.

Lékové formy vhodné pro parenterální podávání výhodně obsahují sterilní vodné přípravky aktivního proteinu, které jsou výhodně isotonické s krví příjemce (např. fyziologický solný roztok). Takové přípravky obsahují také suspendující činidla a zahušťovadla nebo jiné mikročásticové systémy, které jsou určeny k zacílení sloučeniny na krevní složky nebo

do jednoho či více orgánů. Přípravky jsou buďto v jednodávkové nebo vícedávkové lékové formě.

Přípravky ve formě nosního spreje obsahují purifikované vodné roztoky aktivního konjugátu s konzervačními a isotonickými činidly. Tyto přípravky mají obvykle pH a tonicitu upravené tak, aby kompatibilní s nosní sliznicí.

Lékové formy pro rektální podávání jsou obvykle čípky, kde vhodným nosičem je kakaové máslo, hydrogenované tuky nebo hydrogenované mastné karboxylové kyseliny.

Oftalmické přípravky jako např. oční kapky jsou připraveny podobně jako nosní spreje, s tím rozdílem že pH a tonicia jsou nastaveny kompatibilně pro oko.

Topické přípravky obsahují konjugáty podle vynálezu rozpuštěné nebo suspendované v jednom nebo více médiích, jako je např. minerální olej, vazelína, polyhydroxyalkoholy nebo jiná farmaceutická báze pro topické přípravky.

Kromě výše uvedených složek mohou přípravky podle vynálezu ještě dále obsahovat jednu nebo více doplňkových složek jako jsou např. ředidla, pufry, příchutě, rozvolňující činidla, povrchově aktivní látky, zahušťovadla, lubrikanty, konzervační látky (včetně antioxidantů) a další.

Tudíž předkládaný vynález poskytuje fúzní proteiny vhodné pro *in vitro* stabilizaci interferonu-beta-1a v roztoku, což je příklad výhodné, jiné než terapeutické aplikace vynálezu. Fúzní proteiny mohou být také využity ke zvýšení tepelné stability a odolnosti proti enzymatické degradaci interferonu-beta-1a a poskytují tak způsob, jak zvýšit dobu skladovatelnosti, stabilitu při teplotě místnosti a trvanlivost reagencií a souprav užívaných pro výzkum.

Následující příklady slouží k ilustraci vynálezu a nijak jeho předmět neomezují. Je zřejmé, že zejména *in vivo* experimenty se zvířaty zde popsané mohou být provedeny

různými způsoby, takže jsou možné různé modifikace a variace základních metod zde popsaných. Tak např. v příkladu 7 může odborník užít jiný neopterinový test nebo může změnit druh či počet primátů v pokusu. Všechny takové modifikace a variace spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

### Příklady provedení vynálezu

#### Příklad 1

Studie struktury/aktivity lidského interferonu-beta-1a s použitím substitučních mutací alanin/serin: analýza vazebných míst receptoru a funkčních domén

#### Přehled

Byla prováděna obsáhlá mutační analýza lidského interferonu-beta-1a (IFN-beta-1a) s cílem mapovat zbytky nutné pro aktivitu a vazbu receptoru. Dostupnost trojrozměrné (3-D) krystalové struktury lidského IFN-beta (Karpusas, M. et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 11813-11818) umožnila původcům identifikovat substituce alaninu (nebo serinu) zbytků vystavených rozpouštědlu dostupných pro receptorové interakce a ponechat aminokyseliny zapojené do intramolekulárních vazeb. Byl navržen panel 15 alaninových substitucí, které nahradily 2 až 8 zbytků v průběhu rozdílných oblastí každého helixu (A, B, C, D) a smyček (AB, CD2, DE). Pro účely afinitní purifikace byla začleněna aminokoncová histidinová značka obsahující 6 histidinových zbytků, jakož i enterokinázová spojovací sekvence (linker) pro odstranění amino-koncové extenze. Výsledné interferony jsou

nazývány jako „interferon(IFN)-beta se značkou his“ nebo „His-interferon-beta“ nebo „His<sub>6</sub>-interferon-beta“ apod.

Byly konstruovány různé mutace expresních plazmidů IFN-beta se značkou his s použitím genového konstruktu s divokým typem IFN-beta jako templátu pro mutagenezi. Strategie mutageneze vyžadovala nejdříve vnesení štěpného místa jedinečného restrikčního enzymu prostřednictvím genu IFN-beta se značkou his, a pak nahrazení přesných sekvencí DNA mezi vybranými restrikčními místy syntetickými oligonukleotidovými duplexy, které kódovaly alaninové (nebo serinové) substituční mutace. Nakonec byly mutované geny IFB subklonovány do plazmidu, který řídil expresi savčích buněk v buněčné linii 293 z lidských ledvin.

Funkční následky těchto mutací byly hodnoceny antivirovými a antiproliferačními testy. Byl vyvinut neradioaktivní vazebný test pro IFN, který analyzoval vazbu těchto mutant k povrchovému receptoru („IFNAR1/2 komplex“) buněk Daudi lidského Burkittova lymfomu. Navíc byl vyvinut test pro mapování povrchů při interakcích mezi mutanty his-IFN-beta a IFNAR2, který používal fúzní protein IFNAR2/FC, složený z extracelulární domény proteinu IFNAR2 receptoru IFN fúzované ke kloubové doméně, doménám CH2 a CH3 lidského IgG1.

#### 1. Vytvoření genu interferonu-beta jako templátu pro mutagenezi

Při strategii původců pro tvoření mutant IFN-beta substituované alaninem (nebo serinem) nejdříve vznikl modifikovaný gen IFN-beta, který kódoval protein divokého typu, ale který nesl štěpná místa jedinečných restrikčních enzymů v genu. Jedinečná místa byla použita pro záměnu sekvencí divokého typu syntetickými oligonukleotidovými duplexy, které kódovaly mutované kodony. Aby se získala

expresní kazeta lidského IFN-beta-1a vhodná pro tvorbu mutovaných genů, byla cDNA IFN-beta (GenBank přístupové č. E00029) amplifikována pomocí PCR. Bylo nezbytné počáteční klonování genu IFN-beta do plazmidu pMJB107, derivátu pACYC184, (viz Rose, et. al., 1988, Nucleic Acids Res., 16(1), 355), aby se mohla provádět místně cílená mutageneze genu v plazmidu, kterému chyběla specifická restrikční místa vytvářená během mutageneze.

Primery pro PCR použité pro subklonování kódujících sekvencí genu lidského IFN-beta také umožnily původcům zavést enterokinázovou spojovací sekvenci v protisměru a v rámci s genem IFN-beta:

5' PCR primer:

5' -TTCTCCGGAGACGATGATGACAAGATGAGCTACAAC TTGCTTGGATT CCTACAAAGAAGC-3'  
(sekvence id. č. 9: „BET-021“), a

3' PCR primer:

5' -GCCGCTCGAGTTATCAGTTCCGGAGGT AACCTGTAAGTC-3'  
sekvence id. č. 10: „BET-022“)

a hraniční oblasti míst restrikčních enzymů (BspEI a XhoI) užitečné pro klonování do míst plazmidu pMJB107. Výsledná DNA byla nazvana PCR fragment A.

Výkonná signální sekvence z lidské adhezivní molekuly cévní buňky-1 (VCAM-1) a značka ("tag") šesti histidinů byly vneseny do konečného konstruktu z druhého fragmentu DNA vytvořeného z pDSW247 (fragment B). Plazmid pDSW247 je derivát pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), ze kterého byl odstraněn gen EBNA-1 a který nese signální sekvenci VCAM-1 (VCAMss) fúzovanou v protisměru a v rámci se značkou šesti histidinů. Primery PCR, které byly použity pro vytvoření kazetové skupiny VCAMss-1/histidinová značka, byly KID-369 (5' PCR primer):

5' -AGCTTCCGGGGGCCATCATCATCATCATAGCT-3'

(sekvence id. č.: 11) a KID-421 (3' PCR primer):

5' -CCGGAGCTATGATGATGATGATGGCCCCCGGA-3'

(sekvence id. č.:12)

začleňující hraniční štěpná místa restrikčních enzymů (NotI a BspEI), která umožnila excizi fragmentu B DNA.

Pro vytvoření plazmidového vektoru, který nesl signální sekvenci VCAM-1, značku his a gen interferon-beta, prováděli původci trojcestnou ligaci s použitím DNA fragmentů purifikovaných přes gel z plazmidového vektoru pMJB107 (štěpeného NotI a XhoI), PCR fragmentu A (štěpeného BspEI a XhoI) a fragmentu B (štěpeného NotI a BspEI). Ligovaný plazmid byl použit pro transformaci buněk *E. coli* bud' JA221 nebo XL1-Blue a byly vybírány kolonie rezistentní na ampicilin a testovány na výskyt inzertů analýzou restrikčních map. Byla izolována DNA pomocí Maxiprepu a sekvence inzertu byla ověřena sekvencováním DNA. Výsledný konstrukt byl nazván pCMG260.

## 2. Příprava mutant lidského interferonu-beta v pCMG260 substitucí alaninu

Plazmid pCMG260 byl použit jako templát pro několikrát opakovanou mutagenezi (U.S.E. Site Directed Mutagenesis Kit (Boehringer-Mannheim), která zavedla jedinečná restrikční štěpná místa do pozic v průběhu kódující sekvence proteinu IFN-beta, ale nezměnila výslednou sekvenci proteinu. Mutované plazmidy byly použity pro transformaci bud' JA221 nebo XL1-Blue kmene *E. coli* a rekombinantní kolonie byly vybírány podle rezistence na chloramfenikol. Kolonie rezistentní na chloramfenikol byly dále testovány na výskyt požadovaného místa jedinečného restrikčního enzymu pomocí analýzy restrikčních map DNA. Výsledný plazmid IFN-beta, pCMG275.8, obsahoval úplnou sadu jedinečných štěpných míst restrikčních

enzymů a DNA sekvence genu byla ověřena. Kompletní sekvence DNA modifikovaného genu interferon-beta se značkou his, společně s kódující sekvencí proteinu divokého typu, jsou uvedeny na obrázku 1.

Kompletní soubor alaninových substitučních mutací je uveden v tabulce 1 (další stránka). Názvy mutant specifikují strukturální oblasti (helixy a smyčky), do kterých byly vneseny mutace. Panel veškerých mutací alaninových (serinových) substitucí má za následek mutace 65 až 165 aminokyselin lidského IFN-beta.

Panel mutant byl vytvořen z pCMG275.8 nahrazením segmentů DNA mezi jedinečnými restrikčními místy syntetickými oligonukleotidovými duplexy, které nesly genetickou kódující informaci uvedenou v tabulce 2 (viz níže). Aby se vytvořily plazmidy s různými alaninovými substitučními mutantami, byly spolu ligovány vektor pCMG275.8 purifikovaný přes gel (štěpený příslušným restrikčním enzymem, jak uvedeno na seznamu dále v textu, pro každou strukturální oblast IFN-beta) a oligonukleotidové duplexy (kódující sekvence vláken jsou uvedeny v tabulce 2). Ligační směsi byly použity pro transformaci JA221 kmene *E. coli* a rekombinantní kolonie byly vybírány podle rezistence na ampicilin. Kolonie rezistentní na ampicilin byly testovány na výskyt inzertů s mutacemi prostřednictvím screeningu na příslušná místa restrikčních enzymů. Pro dvě mutanty (A2 a CD2) strategie klonování vyžadovala použití dvou duplexů syntetických oligonukleotidů (uvedených v tabulce 2), které nesly komplementární přesahující konce, aby bylo možné ligovat je k sobě navzájem, a ke kostře vektoru IFN-beta v trojcestné ligaci. Následující seznam ukazuje místa, která byla použita ke klonování mutovaných oligonukleotidů z tabulky 2. Schéma klonování

(pododdíl B) ukazuje pozice těchto jedinečných míst v genu interferonu beta.

A helix	BspEI až MunI nebo BglII až PstI
Smyčka AB	MunI až PstI nebo MunI až BsaHI
B helix	BspHI až BsaI nebo BsaHI až BsaI
C helix	BsaI až XbaI
Smyčka CD2	XbaI až BspHI nebo XbaI až DraIII
D helix	BspHI až DraIII
Smyčka DE	BspHI až PvuI
E helix	PvuI až BstEII

17.07.03

49

Tabulka 1

Pozice alaninových substitučních mutací <sup>HU</sup>IFN- $\beta$

	1	10	20	30	40	50	
IFN- $\beta$	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKE						
A1	-A-AA--A-A-						
A2	-----AA-AA--AA-----						
AB1	-----			AAA-AA			
AB2	-----				AA-A--A		
AB3	-----					AAAAA-AAA	
	helix A				AB loop		
	60	70	80	90	100		
IFN- $\beta$	DAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKE						
B1	-----A--AS-----						
B2	-----AAA-----						
C1	-----			AS--AA-S			
C2	-----				A--A--AA		
CD1	-----					AA--AAA	
	helix B					CD loop	
	110	120	130	140	150	160	
IFN- $\beta$	DFTRGALMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYRINRLTGYLRN						
CD2	AA-A--A--A-----						
D	-----A-AA--A-----						
DE1	-----AA-----						
DE2	-----AA-----						
E	-----				A--A--A--A-----		
	CD loop		helix D		helix E		

K tab. 1: Řádek označený IFN- $\beta$  ukazuje divoký typ sekvence lidského IFN- $\beta$ . Alaninové nebo serinové substituce zbytků IFN- $\beta$  jsou ukázány pro každou mutantu a čárky, pod relevantními oblastmi, označují sekvence divokého typu. Struktury helixů a smyček jsou uvedeny jako plné čáry pod mutantami. Smyčka DE překlenuje mezeru mezi helixy D a E. Byly vytvořeny dvě další alaninové substituční mutanty (H93A, H97A a H121A) a byly analyzovány v antivirových testech pro stanovení účinku mutací těchto histidinů, které tvoří cheláty se zinkem v krystalové struktuře dimeru. Obě tyto mutanty si podržely plnou aktivitu divokého typu v antivirových testech, což svědčí pro to, že zinkem zprostředkovaná tvorba dimeru není důležitá pro aktivitu IFN- $\beta$ .

17.07.01

50

Tabulka 2

A1	sekv. id.	CCGGAGACGATGATGACAAGATGGCTTACGCCGCTCTGGAGCCCTACAA č.13 BET-053
A2	sekv. id.	GATCTAGCAATGCTGCCTGTGCTGCCCTCCTGGCTGCCTGAATGGGAGG č.14 CTTGAATACT BET-039
	sekv. id.	GCCTCAAGGACAGGATGAACCTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTG č.15 CA BET-041
AB1	sekv. id.	AATTGAATGGGAGGGCTGCAGCTTCGCTGCAGACAGGATGAACTTGAC č.16 ATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCA BET-080
AB2	sekv. id.	AATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGGCTGCATTTGCT č.17 ATCCCTGCAGAGATTAAGCAGCTGCA BET-082
AB3	sekv. id.	AATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATGAACTTGAC č.18 A BET-084
	sekv. id.	TCCCTGAGGAGATTGCTGCAGCTGCAGCTTCGCTGCAGCTGA č.19 BET -086
B1	sekv. id.	CGCCCGTGTGACCATCTATGAGATGCTCGCTAACATCGTAGCATTTCA č.20 GACAAGATTCATCTAGCACTGGCTGGAA BET-110
B2	sekv. id.	CGCCGCATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTGCTATTTCG č.21 CTGCAGCTTCATCTAGCACTGGCTGGAA BET-112
C1	sekv. id.	GGAATGCTTCAATTGTTGCTGCACCTCCTGAGCAATGTCTATCAGATA č.22 AACCATC TGAAGACAGTTCTAG BET-114
C2	sekv. id.	GGAATGAGACCATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCGCTCATCAGATA č.23 GCACATCTGGCTGCAGTTCTAG BET-092
CD1	sekv. id.	CTAGCTGAAAATGGCTGCAGCTGATTCACCAGGGAAAATC č.24 BET-094

CD2 sekv. id. CTAGAAGAAAATGGAGAAAGAACAGCTACCGCTGGAAAAGCAATGA  
č.25 GCGCGCTGCACCTGAAAAGA  
BET-096

sekv. id. TATTATGGGAGGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGAGTACTCACAC  
č.26 TGT  
BET-106

D1 sekv. id. CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGCAATTGCTGCATAC  
č.27 CTGGCAGCCAAGGAGTACTCACACTGT  
BET-108

DE1 sekv. id. CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTA  
č.28 CCTGAAGGCCGCTGCATACTCACACTGTGCTGGACGAT  
BET-116

DE2 sekv. id. CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTA  
č.29 CCTGAAGGCCAAGGAGTACGCTGCATGTGCTGGACGAT  
BET-118

E1 sekv. id. CGTCAGAGCTGAAATCCTAGCAAACTTGCATTGCAAGACTTACAG  
č.30  
BET-104

#### B. konstrukce expresních plazmidů EBNA 293

Gen divokého typu a mutovaný gen IFN-beta, fúzované se signální sekvencí VCAM-1, značkou his a enterokinázovou spojovací sekvencí, byly purifikovány přes gel jako restrikční fragmenty NotI a BamHI o velikosti 761 páru bází. Purifikované geny byly subklonovány do plazmidového vektoru pDSW247, což je derivát pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), štěpeného NotI a BamHI, jak je ukázáno ve schématu. Plazmid pDSW247 je expresní vektor pro přechodnou expresi proteinu v buňkách EBNA 293 z lidských ledvin (Invitrogen, Carlsbad, CA). Obsahuje cytomegalovirový promotor časného genu a EBV regulační prvky, které jsou nezbytné pro vysokou hladinu genové exprese v tomto systému, jakož i markery selekce pro *E. coli* (rezistence na ampicilin) a pro buňky EBNA 293 (rezistence na hygromycin). Ligované plazmidy byly použity pro transformaci bud' JA221 nebo XL1-Blue kmenů *E. coli*

a kolonie rezistentní na ampicilin byly vybírány a testovány na výskyt inzertů analýzou restrikčních map. Byla izolována DNA pomocí maxiprepu a sekvence inzertů byly ověřeny sekvencováním DNA. Pozitivní klony projevující požadované mutované sekvence byly použity pro transfekci buněk EBNA 293 lidských ledvin tak, jak je popsáno níže.

Obecné klonovací a expresní strategie jsou uvedeny na obrázku 12.

#### C. Exprese a kvantifikace IFN-beta-1a alaninových substitučních mutant

Lidské buňky EBNA 293 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Chittenden, T. 1989, J. Virol. 63, 3016-3025) byly udržovány jako subkonfluentní kultury v Eagleho médiu modifikovaném dle Dulbecca doplněném 10% fetálním bovinním sérem, 2mM glutaminem a 250 g/ml geneticinu (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Expresní plazmidy pDSW247 byly přechodně transfekovány do buněk EBNA 293 s použitím protokolu s lipofektaminem (Gibco/BRL, Life Technologies). Kondicionovaná média byla sklízena 3-4 dny po transfekci, buněčná debris byla odstraněna centrifugací a koncentrace his-IFN-beta byla kvantifikována testem ELISA.

ELISA byla prováděna s použitím polyklonálních králičích protilátek (metodou proteinu A purifikované IgG, protilátky byly pěstovány proti purifikovanému lidskému IFN-beta-1a) pro navázání na 96-jamkové destičky pro testy ELISA a biotinylovaná forma téhož polyklonálního králičího IgG byla použita jako sekundární reagencie pro umožnění detekce interferonu s použitím křenové peroxidázy konjugované se streptavidinem (HRP: Jackson ImmunoResearch, W. Grove, PA). Pro vytvoření standardních křivek koncentrace byla použita řada ředění interferonu-beta-1a. Kondicionovaná média z EBNA

transfektant obsahující his-IFN-beta byla naředěna tak, aby se získaly vzorky s koncentracemi v rozmezí od 10 ng/ml do 0,3 ng/ml v testu ELISA. Aby byly koncentrace IFN-beta v médiu zjištěné testem ELISA potvrzeny, byla provedena analýza westernovým přenosem. Redukované supernatanty z tkáňových kultur a standardy IFN-beta-1a byly podrobeny SDA-PAGE na gelech s gradientem 10-20% (Novex, San Diego, CA) a přeneseny na membrány PDVF. Imunoreaktivní pásy byly detekovány králičím polyklonálním antisérem anti-IFN-beta-1a (č.447, Biogen. Inc., druhé antisérum, které bylo pěstováno proti IFN-beta-1a), a pak následovalo ošetření oslím proti-králičím IgG konjugovaném s HRP (Jackson ImmunoResearch, W. Grove, PA).

#### D. Hodnocení mutant interferonu-beta na vazbu k receptoru

Vlastnost vázat receptor mutant interferonu-beta popsaných v části C byla hodnocena s použitím dvou odlišných vazebných testů. Jeden test měřil vazbu mutant interferonu-beta k fúznímu proteinu, IFNAR2/Fc, zahrnujícímu extracelulární doménu lidského receptoru IFNAR2 fúzovanou k části konstantní oblasti lidského IgG. IFNAR2-Fc byl exprimován v buňkách ovaríí čínského křečka (CHO) a purifikován prostřednictvím afinitní chromatografie s protein A Sepharose podle instrukcí výrobce (Pierce Chem. Co., Rockford, IL, kat. č. 20334). Vazba mutant interferonu-beta k IFNAR2-Fc byla měřena v testu ELISA. Destičky pro test ELISA byly připraveny přes noc ve 4 °C navázáním 50 µl/jamku myší proti-lidské IgG1 monoklonální protilátky (CDG5-AA9, Biogen, Inc.) v koncentraci 10 g/ml ve vazebném pufru (50mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM CaCl<sub>2</sub>, pH 9,6) na 96-jamkové destičky s plochým dnem. Destičky byly dvakrát promyty s PBS obsahujícím 0,05% Tween-20, a blokovány s 0,5% netučným

sušeným mlékem v PBS 1 hodinu při teplotě místnosti. Po dvou dalších promytích bylo do každé jamky přidáno 50  $\mu$ l 1 g/ml IFNAR2-Fc v 0,5% mléce v PBS obsahujícím 0,05% Tween-20 a inkubováno 1 hodinu při teplotě místnosti a destičky pak byly ještě dvakrát promyty. Vazba mutant interferonu-beta k IFNAR2-Fc byla měřena přidáním 50  $\mu$ l/jamku mutanty interferonu-beta v kondicionovaném médiu, sériově ředěné Eagleho médiem modifikovaným dle Dulbecca (DMEM) doplněném 10% fetálním bovinním sérem, a inkubací 2 hodiny ve 4 °C. Ředění mutanty interferonu-beta se typicky pohybovalo od přibližně 1 M dolů k 10pM. Po promytí byl interferon-beta navázaný na destičky detekován přidáním 50  $\mu$ l/jamku koktejlu skládajícího se z 1:1000 ředěné králičí polyklonální anti-interferonové protilátky (č.447) plus oslího proti-králičího IgG značeného křenovou peroxidázou (HRP) (Jackson ImmunoResearch), a probíhala inkubace 15 minut ve 4 °C. Po dvou promytích byl přidán HRP substrát a destička byla inkubována ve 4 °C před odečtem na čtecím zařízení pro destičky ELISA při absorbanci 450 nm. Data byla vynesena jako absorbance proti koncentraci mutant interferonu-beta a afinita vazby mutanty interferonu-beta k IFNAR2-Fc byla určována vynesením dat do jednoduché hyperbolické vazebné rovnice. Výsledky z těchto analýz jsou ukázány na obrázku 3, na kterém je vazebná afinita každé mutanty, zjištovaná alespoň ve třech nezávislých pokusech, vyjádřena jako procento afinity měřené pro His<sub>6</sub>-divoký typ interferonu-beta-1a. Druhý test vazby receptoru byl použit pro měření afinity, se kterou se mutanty interferonu-beta vážou na buňky Daudi exprimující oba receptorové řetězce, IFNAR 1 a IFNAR2, které dohromady obsahují receptor pro interferon-beta. Tento test založený na FACS používal blokující monoklonální protilátku namířenou proti extracelulární doméně IFNAR1, EA12

(Biogen, Inc.) pro odlišení neobsazeného (volného receptoru od receptoru, na který byl navázán interferon-beta. Buňky Daudi ( $20 \mu\text{l}$  při  $2,5 \times 10^7$  buněk/ml) byly naneseny na 96-jamkové destičky pro test ELISA se dnem ve tvaru V a inkubovány 1 hodinu ve  $4^\circ\text{C}$  s různými koncentracemi mutanty interferonu-beta ( $20 \mu\text{l}$  v pufru FACS, 5% FBS, 0,1%  $\text{NaN}_3$  v PBS). Žádoucí sériová ředění mutant interferonu-beta se pohybovala v rozmezí od 0,5 M do 0,5 pM. Ke každé jamce bylo přidáno 100 ng biotinylované myší anti-IFNAR1 monoklonální protilátky EA12 ( $10 \mu\text{l}$ ) a destičky byly inkubovány další dvě minuty při teplotě místnosti před dvojím promytím puforem FACS ( $4^\circ\text{C}$ ). Pak byly buňky inkubovány 30 minut ve  $4^\circ\text{C}$  s  $50 \mu\text{l}/\text{jamku}$  naředěného streptavidinu konjugovaného s R-fykoerythrinem (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), dvakrát promyty puforem FACS, resuspendovány ve  $300 \mu\text{l}$  pufru FACS obsahujícím 0,5% paraformaldehydu a přeneseny do polystyrenových zkumavek 12x75 (Falcon 2052). Pak byly vzorky analyzovány průtokovou cytometrií na přístroji FACScan (Becton Dickinson). Data byla vynesena do grafu jako průměrná intenzita fluorescence kanálu (MFCI) proti koncentraci mutanty interferonu-beta, vazebné afinity byly definovány jako koncentrace mutanty interferonu-beta poskytující 50% inhibici barvení protilátky. Každá mutanta byla testována několikanásobně. Obrázek 2 ukazuje vazebnou afinitu k receptoru pro každou mutantu interferonu-beta, zjištěnou touto metodou, vyjádřenou jako procento afinity měřené pro  $\text{His}_6$ -divoký typ interferonu-beta-1a v každém pokusu.

#### E. Hodnocení funkce mutant interferonu-beta

Mutanty interferonu-beta byly také testovány na funkční aktivitu s použitím *in vitro* testů pro antivirovou aktivitu a

na schopnost interferonu-beta inhibovat buněčnou proliferaci. Pro každou mutantu byly prováděny minimálně tři antivirové testy, každý v trojím opakování. His<sub>6</sub>-divoký typ interferonu-beta-1a byl do každého pokusu zahrnut jako reference. Antivirové testy byly prováděny ošetřením buněk A549 z lidského plicního karcinomu (ATCC CCL 185) přes noc dvojkovým sériovým ředěním mutant interferonu-beta v koncentracích, které překlenovaly rozsah mezi plnou antivirovou ochranou a žádnou ochranou před usmrcením buněk virem. Následující den byly buňky stimulovány pod dobu dvou dnů virem encefalomyokarditidy (ECMV) v ředění, které mělo za následek úplnou smrt buněk při chybění interferonu. Destičky pak byly vyvíjeny s metabolickým barvivem MTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-fenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxyanilid) (M-5655, Sigma, St. Louis, MO). Zásobní roztok MTT byl připraven v koncentraci 5 mg/ml v PBS a sterilizován filtrací a 50 µl tohoto roztoku bylo naředěno do tkáňových kultur (100 µl na jamku). Po inkubaci při teplotě místnosti po dobu 30-60 minut byl roztok MTT/médium odstraněn, buňky byly promyty se 100 µl PBS a nakonec byla metabolizovaná barva solubilizována ve 100 µl 1,2N kyseliny chlorovodíkové v 90% isopropanolu. Životaschopné buňky (jak prokázáno přítomností barviva) byly kvantifikovány při absorbanci ve 450 nm. Data byla analyzována vynesením do grafu absorbance proti koncentraci mutanty interferonu-beta a aktivita každé mutanty byla definována jako koncentrace, ve které bylo usmrcono 50 % buněk. Obrázek 5 ukazuje aktivitu každé mutanty vyjádřenou jako procento aktivity měřené pro divoký typ interferonu-beta-1a se značkou his v každém pokusu.

U mutant interferonu-beta byla také hodnocena funkce v antiproliferačním testu. Buňky Daudi lidského Burkittova

lymfomu (ATCC č. CCL 213) byly vysety v koncentraci  $2 \times 10^5$  buněk/ml in RPMI 1620 doplněném 10% definovaným fetálním telecím sérem (Hyclone, Logan, Utah), a 2mM L-glutaminem. Každá jamka také obsahovala danou koncentraci mutanty interferonu-beta v konečném celkovém objemu 100  $\mu$ l média na jamku, použité koncentrace interferonu-beta byly vybrány tak, aby překlenuly rozsah od maximální inhibice proliferace Daudi buněk k žádné inhibici (tj. plná proliferace). Každá koncentrace testované mutanty interferonu-beta byla použita v duplikátech a ve všech pokusech byla zařazena série neošetřených buněk v duplikátech. Buňky byly inkubovány dva dny ve 37 °C, v inkubátorech s 5% CO<sub>2</sub>, a potom byl do každé jamky přidán 1 Ci thymidinu s tritem ((methyl-<sup>3</sup>H)thymidin, Amersham TRK758) v 50  $\mu$ l média a inkubován další 4 hodiny. Buňky byly sklízeny s použitím přístroje LKB pro sklízení buněk z destiček a byla měřena inkorporace thymidinu s tritem při použití čtecího zařízení pro destičky LKB beta. Duplikáty experimentálních hodnot byly zprůměrněny a určeny standardní odchylky. Data byla vynesena do grafu jako průměrné počty za minutu proti koncentraci mutanty interferonu-beta a aktivita každé mutanty byla definována jako koncentrace požadovaná poskytnout 50 % maximální pozorované inhibice růstu. Pro každou mutantu byly prováděny několikanásobné testy. Obrázek 6 ukazuje výsledky vyjádřené jako procento aktivity nalezené pro divoký typ interferonu-beta-1a se značkou his v každém pokusu.

#### F. Vlastnosti mutant interferonu-beta

Bylo zjištěno, že divoký typ interferonu-beta-1a s histidinovou značkou měl v antivirových a antiproliferačních testeck aktivitu, která byla přibližně 3krát nižší než odpovídající aktivita nalezená u neznačeného

divokého typu interferonu-beta-1a. Protože ze všech mutant interferonu-beta obsahovaly A1-E na svých N-koncích totožnou sekvenci značky his, byla účinky mutací na vlastnosti molekuly určovány srovnáním aktivit těchto mutant v antivirových, antiproliferačních a vazebných testech s aktivitou pozorovanou pro divoký typ interferonu-beta-1a se značkou his. Při provádění tohoto srovnávání původci předpokládali, že odchyly aktivit mutant A1-E, ve srovnání s divokým typem interferonu-beta-1a se značkou his, jsou kvalitativně a kvantitativně přibližně stejné, jako účinek, který by téže mutanty měly v nepřítomnosti N-koncové značky his. Odpovídající předpoklad pro značené nebo fúzní konstrukty jiných rozpustných cytokinů je obecně pokládán za platný odborníky pracující s technikou alaninové skenovací mutageneze ("alanine scanning mutagenesis"), zejména když *in vitro* funkční aktivita značeného nebo fúzního konstruktu je blízká aktivitě divokého typu cytokinu, jak je tomu v tomto případě (viz například Pearce, K.H. Jr, et al., J. Biol. Chem., 272, 20595-20602, 1997, a Jones, J.T., et al., J. Biol. Chem. 273, 11667-11674, 1998).

Data ukázaná na obrázcích 3-6 naznačují tři typy účinku, který byl vyvolán cílenou mutagenezí. Tento účinek může být výhodný pro vývoj interferonových léčiv za jistých okolností. Tyto tři typy účinku jsou: a) mutanty s vyšší antivirovou aktivitou než je aktivita divokého typu interferonu-beta-1a (např. mutanta C1), b) mutanty, které projevují aktivitu v obou testech, antivirovém a antiproliferačním, ale u kterých je antiproliferační aktivita disproporčně nízká vzhledem k antivirové aktivitě ve srovnání s divokým typem interferonu-beta-1a (např. mutanty C1, D a DE1), a c) funkční antagonisté (např. A1, B2, CD2 a DE1), které vykazují antivirovou a antiproliferační aktivitu, která je

disproporčně nízká vzhledem k vazbě receptoru ve srovnání s divokým typem interferonu-beta-1a. Je možné pozorovat, že některé mutanty spadají do více než jedné skupiny. Tyto skupiny jsou uvedeny v přehledu níže. I když původci charakterizovali tyto skupiny mutant vzhledem k těmto příkladům uvedeným v seznamu, je nutné si uvědomit, že další mutace v těchto oblastech mohou mít za následek podobný nebo dokonce zvýšený vliv na aktivitu:

a) Mutanta C1 má antivirovou aktivitu, která je přibližně 6 krát větší než aktivita divokého typu interferonu-beta-1a se značkou his. Předpovídá se, že tato mutanta a další stejného typu jsou užitečné pro snížení množství interferonu-beta, které musí být podáváno pro dosažení daného stupně antivirového účinku. Očekává se, že snížení množství podávaného proteinu zredukuje imunogeničnost proteinu a může také snížit vedlejší účinky toxicity, která není založena na mechanismu účinku. Je předpovídáno, že mutace v této skupině jsou výhodné v situacích, kdy terapeutický prospěch podávání interferonu-beta vyplývá z jeho antivirových účinků a kdy antiproliferační účinky přispívají k toxicitě nebo nežádoucím vedlejším účinkům.

b) Relativní aktivity (% divokého typu) alaninových substitučních mutant v antivirovém a antiproliferačním testu jsou srovnány na obrázku 7. U většiny mutant (které jsou uvedeny na diagonální čáře) lze pozorovat koordinovaně změněné aktivity (tj. antivirové a antiproliferační aktivity, které se liší o stejný faktor od aktivit divokého typu interferonu-beta-1a se značkou his). Ale několik mutant vykazuje větší odchylky v aktivitě v jednom testu relativně ke druhému, ve srovnání s divokým typem interferonu-beta-1a se značkou his, jak je dokázáno posunem od diagonální linie. Tyto tři mutanty jsou uvedeny v tabulce níže. Mutanta C1

vykazuje antivirovou aktivitu, která je ~6 krát větší, než je aktivita divokého typu interferonu-beta-1a se značkou his, ale jeho aktivita v antiproliferačním testu je podobná aktivitě divokého typu. Mutanta C1 má tudíž antivirovou aktivitu, která je zvýšena faktorem 5,2 proti jeho antiproliferační aktivitě, relativně k divokému typu interferonu-beta-1a se značkou his. Podobně mutanta D projevuje 65 % aktivity divokého typu v antivirovém testu, ale pouze 20 % aktivity divokého typu v antiproliferačním testu, a tudíž má antivirovou aktivitu, která je zvýšena 3,4 krát proti jeho antiproliferační aktivitě ve srovnání s divokým typem. Mutanta DE1 projevuje 26 % aktivity divokého typu v antivirovém testu, ale pouze 8,5 % v antiproliferačním testu, a má tedy antivirovou aktivitu, která je zvýšena 3,0 krát proti jeho antiproliferační aktivitě ve srovnání s divokým typem interferonu-beta-1a se značkou his. Když jsou podávány v koncentraci postačující pro dosažení požadovaného stupně antivirové aktivity, ukazují tyto mutanty proteinů podstatně nižší úroveň antiproliferační aktivity než protein divokého typu. Předpovídá se, že mutace v této skupině, jako ty ve skupině a), jsou výhodné v situacích, kdy terapeutický prospěch podávání interferonu-beta vyplývá z jeho antivirových účinků a kdy antiproliferační účinky přispívají k toxicitě nebo nežádoucím vedlejším účinkům.

Mutanta	Antivirová (AV) aktivita (% divokého typu)	Antiproliferační (AP) aktivita (% divokého typu)	AV/AP
C1	571	109	5,2
D	65	19	3,4
DE1	26	8,5	3,0

c) Mutanty s antivirovou a antiproliferační aktivitou, která je nízká vzhledem k vazbě receptoru, ve srovnání s divokým typem interferonu-beta-1a se značkou his (viz tabulka níže). Mutanta A1 projevuje antivirovou a antiproliferační aktivity, které jsou 2,0 krát a 1,8 krát větší než aktivity pozorované u divokého typu interferonu-beta-1a se značkou his, ale váže se na analogický receptor na buňkách Daudi s afinitou, která je 29 krát větší než u divokého typu. Vazba této mutanty na receptor IFN-beta je tudíž zvýšena přibližně 15 krát ve srovnání s antivirovou a antiproliferační aktivitou proteinu. Podobně mutanty B2, CD2 a DE1 vykazují zvýšení vazby proti antivirové aktivitě 4,6 krát, 4,6 krát a 18 krát, podle pořadí, a proti antiproliferační aktivitě 3,5 krát, 15 krát a 54 krát. Předpovídá se, že tyto proteiny jsou užitečné jako funkční antagonisté aktivity endogenního IFN-beta, a možná dalších endogenních interferonů typu I, protože mají schopnost vázat a obsadit receptor a navíc vyvolat pouze malou část funkční odpovědi v cílových buňkách, jaká by byla pozorována u divokého typu IFN-beta.

Mutanta	Antivirová aktivita (AV) (% wt)	Antiproliferační aktivita (AP) (% wt)	Vazebná aktivita k buňkám (% hmot.)	Vazba/AV	Vazba/AP
A1	200	180	2900	15	16
B2	7,1	9,2	33	4,6	3,5
CD2	150	46	690	4,6	15
DE1	26	8,5	460	18	54

### G. Vztah mutací k trojrozměrné struktuře interferonu

Zatímco publikované krystalové struktury neglykosylované formy myšího interferonu-beta (T. Senda, S. Saitoh a Y. Mitsui, Refined Crystal Structure of Recombinant Murine Interferon- at 2.15 Resolution, J. Mol. Biol., 253, 187-207, 1995) a lidského interferonu alfa-2b (R. Radhakrishnan, L.J. Walter, A. Hruza, P. Reichert, P.P. Trotta, T.L. Nagabhushan a M.R. Walter, Zinc Mediated Dimer of Human Interferon- 2b Revealed by X-ray Crystallography, Structure, 4, 1453-1463, 1996) poskytly modely pro polypeptidovou kostru lidského interferonu-beta, původci nedávno dořešili strukturu interferonu-beta-1a v jeho glykosylovaném stavu (M. Karpusas, M. Nolte, C.B. Benton, W. Meier, W.N. Lipscomb, a S.E Goelz, The Crystal Structure of Human Interferon- at 2,2 Resolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 11813-11818, 1997).

Výsledky mutačních analýz původců mohou být shrnuty vzhledem k trojrozměrné struktuře interferonu-beta-1a (zde neuvedeno). Některé mutace vyvolaly snížení aktivity (2 až 5 krát snížení). Mutované oblasti odpovídaly substitucím uvedeným v tabulkách 1 a 2.

Mutace, které jsou nejvýznamnější, co se týče jejich účinku na funkci, měly za následek dramatické snížení jak aktivity, tak vazby buněčného povrchového receptoru. Mutace v této oblasti (A2 helix, AB a AB2 smyčky a E helix) odpovídají mutacím ve vazebném místu IFNAR2, protože žádná z těchto mutant nevázala v testech původců IFNAR/Fc.

I když tyto mutace, které byly důležité pro vazbu IFNAR2, také ovlivnily buněčnou vazbu, vazebné vlastnosti buněčného povrchu jsou také ovlivněny zbytky v dalších oblastech molekuly (B1 helix, C2 helix). Na trojrozměrných modelech (zde neuvedených), které zobrazují působení

alaninových substitučních mutant, je možné pozorovat, že N-koncová oblast, C-koncová oblast a glykosylovaná oblast C helixu molekuly IFN-beta-1a neleží ve vazebném místě receptoru. Mutace v těchto oblastech nesnížily biologickou aktivitu nebo vazbu buněčného povrchového receptoru.

## Příklad 2

Konstrukce plazmidů pro expresi fúzního proteinu interferon-beta-1a (IFN-beta/Fc)

Pro vytvoření expresního plazmidu byla použita technologie PCR kódujícího DNA sekvenci lidského IFN-beta fúzovanou k Fc části molekuly těžkého řetězce myšího IgG2a. Plazmidový vektor pDSW247 (viz příklad 1) je derivát pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), ze kterého byl odstraněn gen EBNA-1. Tento plazmid byl použit pro konstrukci expresního vektoru použitelného pro přechodnou expresi proteinu v buňkách EBNA 293 z lidských ledvin (Invitrogen, Carlsbad, CA, Shen, E.S., et. al., 1995, Gene, 156, 235-239). Byl navržen tak, aby obsahoval signální sekvenci lidské adhezivní molekuly cévní buňky I (VCAM-1) v rámci a v protisměru od sekvence interferonu beta a sekvencí Ig.

Expresní kazeta fúzního proteinu byla sestavena z několika fragmentů DNA. Aby se získal fragment DNA kódující lidský gen IFN-beta, byl použit cDNA subklon lidského IFN-beta (GenBank přístupové č. E00029) jako templát pro PCR s použitím primerů:

5' -GGTGGTCTCACATGAGCTACAAC TTGCTTGGATT CCTACAAAGAAGC  
(sekvence id. č. 31: "BET-025") a

5' -GCCCTCGAGTCGACCTTGTACATCATCGTCGTTCGGAGGTAACCTGTAAG

(sekvence id. č. 32: "BET -026") ,

které také obsahovaly štěpné místo restrikčního enzymu (BsaI) v protisměru od prvního kodonu IFN-beta. 3' PCR primer (sekvence id. č. 32 BET-026) pro gen IFN-beta eliminoval terminační kodon IFN-beta a inkorporoval jak do rámce enterokinázovou spojovací sekvenci (DDDDK) tak terminální místo restrikčního enzymu (XhoI), použitelné pro subklonování do expresního vektoru. Místo BsaI zavedené v protisměru od kódující sekvence IFN-beta umožnilo původcům ligovat signální sekvenci VCAM-1 do protisměru a v rámci s kódující sekvencí genu IFN-beta. Tato signální sekvence VCAM-1 byla také vytvářena pomocí PCR s použitím páru primerů:

5' -CAAGCTTGCTAGCGGCCGCGG-3' (sekvence id. č. 33: "BET-023" a 5' -GGTGGTCTCACATGGCTTGAGAAGCTGC-3' (sekvence id. č. 34: "BET-024") , které obsahovaly 5' štěpné místo restrikčního enzymu (NotI, pro ligaci do klonovacího místa NotI v pDSW247) a 3' štěpné místo restrikčního enzymu (BsaI, pro ligaci do 5' PCR fragmentu interferonu-beta-1a). Templat pro PCR byla cDNA lidské adhezivní molekuly cévní buňky I (VCAM-1) (GenBank přístupové číslo X53051).

Aby byl vytvořen fúzní gen IFN-beta-1a/Fc, byly prováděny následující postupy. Fragment myšího IgG2a byl odstraněn z pEAG293 gelovou purifikací DNA fragmentu po štěpení SalI+BamHI. Plazmid pEAG293 je subklon kloubové domény, domén CH2 a CH3 myšího IgG2a (GenBank přístupové číslo V00798) v Bluescript IIISK+ (Stratagene, LaJolla CA, katalog. č. 212205). Následující páry primerů pro PCR:

5' -AGGTSMARCTGCAGSAGTCW-3' (sekvence id. č. 35) , kde S=C nebo G, M=A nebo C, R=A nebo G, W=A nebo T, a

5' -CTGAGCTCATTTACCCGGAGTCCGGGAGAAAGCTCTT-3' (sekvence id. č. 36) vytvořily hraniční místa SalI a NotI na 5' a

3' koncích kazety, v příslušném pořadí. Kazeta myší domény IgG2a Fc se liší od sekvence z GenBank v jedné bázi (kodon V369), vytvářející umlčenou mutaci. Z této IgG2a Fc kazety je tudíž exprimován divoký typ proteinu Fc.

DNA fragment obsahující signální sekvenci VCAM-1 fúzovanou ke genu huIFN-beta s C-koncovou enterokinázovou spojovací sekvencí byl vystřížen z pCMG258 štěpením s NotI až BamHI a purifikován na gelu. Místo SalI se vyskytovalo na původním plazmidu pDSW247 a je lokalizováno ihned po směru a v rámci s kódující sekvencí IFN-beta. Plazmidový vektor pDSW247 byl připraven purifikací na gelu fragmentu NotI + BamHI (viz příklad 1). Aby se sestavil konečný expresní vektor kódující fúzi IFN-beta-1/IgG2, byla prováděna trojcestná ligace s použitím výše uvedených fragmentů. Tento expresní plazmid byl nazván pCMG261 a obsahoval signální sekvenci VCAM-1 ve fúzi s genem pro zralý lidský IFN-beta, enterokinázovou spojovací sekvenci a Fc doménu myšího IgG2a. Kompletní DNA (sekvence id. č. 1) a proteinová (sekvence id. č. 2) sekvence fúzního proteinu jsou uvedeny na obrázku 2.

### Příklad 3

#### Produkce fúzního proteinu interferonu-beta-1a v savčích buňkách

Expresní vektor rekombinantního IFN-beta/Fc, pCMG261, byl přechodně transfekován do buněk EBNA 293 z lidských ledvin, aby byla dosažena exprese fúzního proteinu IFN-beta-1a podle vynálezu. Tento rekombinantní expresní plazmid byl transfekován podle lipofektaminového protokolu (katalog. č. 18324-020, Life Technologies) do buněk EBNA 283 z lidských

ledvin podle protokolu výrobce (Life Technologies, Gaithersburg, MD, Hawley-Nelson, P., Ciccarone, V., Gebeyehu, G. Jesse, J., Felgner, P.L., 1993, Focus 15.73) s použitím 1 až 3 g plazmidové DNA pro 100mm misky pro tkáňové kultury pro buňky EBNA 293. Den po lipofektaminové transfekci buněk byla média nahrazena růstovým médiem (Eagleho médium modifikované dle Dulbecca, 10% fetální bovinní sérum, 4mM glutamin, 250 g Gentecinu/ml (Life Technologies, Gaithersburg, MD)). Kondicionovaná média byla sklízena 3 až 4 dny později a byla určována koncentrace IFN-beta-1-Fc tak, jak je popsáno níže.

Produkce fúzního proteinu IFN-beta/Fc v jiných savčích buňkách a expresních systémech pro prokaryotické buňky může být také prováděna po přenesení proteinové kódující oblasti pro fúzní protein do příslušných expresních vektorů pro tyto systémy. Alternativní expresní systémy zahrnují savčí buněčné jako jsou například buňky ovaríí čínského křečka (CHO) (Barsoum, J., 1995, Methods v Mol. Biol. 48, kapitola 18, 225-237) a myší buňky NS-O (Rossman, C. et al., 1996, Protein Expression and Pur., 7, 335-342), a buňky ledvin opice COS7 (Ettinger, R. et. al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:23, 13102-13107). Další eukaryotické expresní systémy, které by mohly být použitelné, jsou kvasinky *Pichia pastoris* (Eldin, P.E. et al., 1997, I. Immun. Methods, 201, 67-75) a *Saccharomyces cerevisiae* (Horwitz, A.H., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8678-8682).

Kvantifikace stupně exprese proteinu IFN-beta-1a-Fc ve tkáňových supernatantech z transfekovaných buněk EBNA 293 byla prováděna pomocí testu ELISA s použitím IgG frakce králičích polyklonálních protilátek anti-IFN-beta-1a purifikované metodou proteinu A (antigen byl purifikovaný IFN-beta-1a, Biogen, Inc.) pro navázání na 96-jamkové

destičky. Protilátka detekuje standardy IFN-beta-1a a tkáňové supernatanty v rozmezí koncentrace interferonu mezi 10 ng/ml a 0,3 ng/ml. Pro detekci navázaných interferonů byly použity biotinylovaný králičí polyklonální anti-IFN-beta-1a (stejné protilátky jako uvedeny výše) a křenová peroxidáza konjugovaná se streptavidinem. Pro potvrzení hodnot získaných z testu ELISA byla prováděna analýza westernovým přenosem, kdy redukované tkáňové supernatanty a standardy IFN-beta-1 byly separovány na 5-20% Tris-glycinových gelech (Novex, San Diego, CA), přeneseny na membrány PVDF (Amersham Life Science, Inc., Cleveland, OH) a detekovány odlišným králičím polyklonálním sérem (pěstovaným proti IFN-beta-1a), a pak následovaly oslí proti-králičí IgG protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)

#### Příklad 4

##### Antivirová aktivita fúzního proteinu IFN-beta-1a/myší IgG2a

Buňky lidského plicního karcinomu (A549) byly předem ošetřovány 24 hodin s IFN-beta-1a nebo IFN-beta-myší IgG2a (61, 41, 27, 18, 12, 8,2, 5,5, 3,7, 2,5, 1,6 pg/ml) před stimulací virem encefalomyokarditidy virus (EMCV). Po dvoudenní inkubaci s virem byly živé buňky barveny roztokem XTT:PMS (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid, vnitřní sůl: fenazinmethosulfát, v koncentraci 333 g/ml a 2ng/ml, v daném pořadí, v pufrovaném solném roztoku) a detekovány spektroskopii v 450nM. Test byl prováděn ve trojím opakování pro každou koncentraci IFN.

Na obrázku 8 jsou ukázány standardní odchylky jako svislé úsečky. Bylo zjištěno, že 50% cytopatický účinek pro IFN-beta-1a byl přibližně 0,4 pM. Pro IFN-beta-myší IgG2a byl 50% cytopatický účinek 0,15 pM.

#### Příklad 5

Konstrukce a produkce fúzního proteinu "lidský interferon beta-1a/lidský IgG1 Fc"

A. Konstrukce fúzního proteinu lidský interferon beta-1a/lidský IgG1 Fc

PCR technologie byla použita pro vytvoření expresního plazmidu kódujícího DNA sekvenci lidského IFN beta fúzovanou s částí Fc (kloubová doména, domény CH2 a CH3) molekuly těžkého řetězce lidského IgG1.

##### EBNA konstrukt:

Plazmidový vektor pCH269 je derivát pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), ze kterého byl odstraněn gen EBNA-1. Plazmid byl použit pro konstrukci expresního vektoru použitelného pro přechodnou expresi proteinu v buňkách EBNA 293 z lidských ledvin (Invitrogen, Carlsbad, CA, Shen, E.S., et. al., 1995, Gene, 156, 235-239).

Expresní kazeta fúzního proteinu byla sestavena ze tří fragmentů DNA: fragment NotI/SalI kódující signální sekvenci VCAM-1 v rámci a fúzovanou se sekvencí kódující lidský IFN beta, fragment SalI/NotI kódující kloubovou doménu, domény CH2 a CH3 lidského IgG1 a fragment NotI EBNA expresního vektoru pCH269.

Dva nezávislé fragmenty NotI/SalI kódující zralou signální sekvenci VCAM-1 v rámci a fúzovanou ke genu lidského IFN beta byly vytvořeny technologií PCR. PCR templát byl plazmid pCMG258 (viz příklad 2 výše), který kóduje zralou signální sekvenci VCAM-1 v rámci a fúzovanou ke genu lidského IFN beta, který sám je také v rámci a fúzovaný k enterokinázové spojovací sekvenci. Byly použity dvě sady primerů pro PCR. Jedna sada primerů:

5'-AGCTTGCTAGCGGCCGCGCCTCACTGGCTTCA-3' (sekvence id. č. 37) a 5'- ATACCGCGTCGACGTTCGGAGGTAACATGTAAGTCTG-3' (sekvence id. č. 38) vnesla změnu aminokyselin od G do C v pozici 162. Tento fragment byl nazván lidský IFN beta-C 162. Druhá sada primerů:

5'-AGCTTGCTAGCGGCCGCGCCTCACTGGCTTCA-3' (sekvence id. č. 39) a 5'-TACACGTCGACGCTGCCACCACCGCCGTTCGGAGGTAACATGTAAGTCTG-3 (sekvence id. č. 40) také zavedla substituci aminokyselin G162 až C162 a změnila enterokinázovou spojovací sekvenci (DDDDK) na GGGGS spojovací sekvenci v rámci a fúzovanou k lidskému genu IFN beta. Tento fragment byl nazván lidský IFN beta-C162/G4S. Obě sady primerů obsahovaly 5' NotI místo pro umožnění ligace do pCH269, a 3' SalI štěpné místo pro umožnění ligace s fragmentem SalI/ NotI lidského IgG1.

Lidský fragment IgG1, který kóduje kloubovou doménu a domény CH2 a CH3 lidského IgG1, byl připraven pomocí štěpení restrikčními enzymy (SalI/ NotI) plazmidu pEAG409, derivátu plazmidu SABI44 (popsaného v patentu Spojených Států č. 5 547 853). Fragment byl vyříznut a purifikován přes gel. EBNA expresní vektorový plazmid pCH269 byl štěpen NotI a purifikován přes gel.

Dva fúzní konstrukty lidského IFN beta-lidského IgG1 Fc byly vytvořeny dvěma trojcestnými ligacemi. Jeden konstrukt, nazvaný ZL6206, obsahoval spojovací sekvenci G4S, druhý

konstrukt, nazvaný ZL5107, je přímá fúze. Kompletní sekvence DNA a proteinu otevřeného čtecího rámce přímé fúze (viz obrázek 10) jsou uvedeny v sekvenci id. č. 41 a v sekvenci id. č. 42, podle pořadí. Kompletní sekvence DNA a proteinu otevřeného čtecího rámce fúze spojovací sekvence (viz obrázek 11) jsou uvedeny v sekvenci id. č. 43 a v sekvenci id. č. 44, podle pořadí.

#### CHO konstrukt:

Byl vytvořen konstrukt v buňkách CHO s trvalou expresí fúze "lidský IFN beta-lidiský IgG1 Fc", který obsahoval lidiský IFN beta přímo spojený s lidským IgG1 Fc. Fragment lidiský IFN beta-lidiský IgG1 Fc byl vystřížen z plazmidu ZL5107 s NotI a purifikován přes gel, byl ligován do místa NotI v pEAG347 (expresní vektor obsahující tandem časného promotoru SV40 a hlavního pozdního adenovirového promotoru [pocházejícího z plazmidu pAD2beta], jedinečné klonovací místo NotI následované signály pro pozdní ukončení transkripce SV40 a polyA [pocházející z plazmidu pCMVbeta]. pEAG347 obsahuje plazmidovou kostru pocházející z pUC 19 a dhfr pro MTX selekci a amplifikaci v transfekovaných buňkách CHO).

#### B. produkce fúzního proteinu lidiský interferon-beta-1a/lidiský IgG1 Fc

Přechodná transfekce fúzních konstruktů lidiského IFN beta do buněk EBNA293:

Rekombinantní expresní vektory IFN-beta/lidiský IgG1 Fc popsané výše byly přechodně transfekovány do buněk EBNA 293 z lidských ledvin pro dosažení exprese fúzního proteinu IFN-beta-1a podle vynálezu. Tyto rekombinantní expresní plazmidy byly transfekovány podle lipofektaminového protokolu

(katalog. č.18324-020, Life Technologies) do buněk z lidských ledvin EBNA 293 podle protokolu popsaného v příkladu 3 výše.

Stabilní transfekce dhfr- CHO buněk fúzním konstruktem "lidský IFN-beta-1a/lidský IgG1 Fc" (bez spojovací sekvence):

Expresní vektor dhfr obsahující rekombinantní IFN-beta/lidský IgG1 Fc (bez spojovací sekvence) popsaný výše byl trvale transfekován do buněk, aby bylo dosaženo exprese fúzního proteinu IFN-beta-1a podle vynálezu. Tento rekombinantní expresní plazmid byl transfekován elektroporací a selekce pozitivních klonů byla prováděna podle následujícího protokolu:

Plazmidová DNA (20 g) štěpena s BglII byla precipitována, resuspendována v 800 µl pufru HEPES a přidána k  $10 \times 10^7$  buněk/ml CHO. Po elektroporaci byly buňky pěstovány 2 dny v kompletním médiu DMEM. Pak byly buňky rozděleny na 20 až 40 10cm misek s kompletním DMEM/dialyzovaným 10% FBS a pěstovány 5 dnů před přenesením buněk na selekční média se stoupající koncentrací (50-200 ng/ml) MTX v DMEM po dobu dvou týdnů. Na konci dvou týdnů byly selektovány jednotlivé kolonie buněk a namnoženy. Supernatanty pocházející z 22 klonů CHO byly testovány v antivirových testech.

#### Aktivita:

Antivirová aktivita fúzních proteinů byla zjištována v testech CPE, jak popsáno v příkladu 4. Na základě specifické aktivity 60 MU/mg standardu interferonu-beta-1a použitého v tomto testu, byla aktivita přechodně (EBNA) exprimovaného fúzního proteinu lidský interferon-beta-1a/lidský IgG1 Fc se spojovací sekvencí 900 U/ml a aktivita bez spojovací sekvence byla 440 U/ml. Aktivita fúzního

proteinu exprimovaného v buňkách CHO lidský interferon-beta-1a/lidský IgG1 Fc byla 50 U/ml.

#### Příklad 6

Měření antivirové aktivity interferonu-beta-1a v plazmě myší ošetřených interferonem-beta-1a a fúzním proteinem interferon-beta-1a/myší IgG2a

Myším (C57/B16) byla podána do žíly v ocasu i.v. injekce 50 000 jednotek interferonu-beta-1a (volného) nebo 5 000 jednotek fúzního proteinu interferon-beta-1a-myší IgG2a. Jako kontrola byl podáván stejný objem fosfátového pufru.

Krev byla odebírána retroorbitálními krevními odběry v různém časových bodech (okamžitě, 0,25, 1, 4, 24 a 48 hodin) po injekci interferonu beta. V každém časovém bodě byly alespoň tři myši. Plná krev byla odebírána do zkumavek obsahujících antikoagulans, buňky byly odstraněny a zbylá plazma zmražena až do doby testování. Vzorky plazmy byly naředěny 1:10 médiem bez séra a ponechaly se protéci přes 0,2 m filtr ve stříkačce.

Naředěné vzorky pak byly titrovány do určených jamek na 96-jamkové destičce pro tkáňové kultury obsahující buňky A549. Na každé destičce byla testována ředění standardů interferonu-beta-1a (10, 6,7, 4,4, 2,9, 1,3, 0,9 a 0,6 U/ml AVONEX) a čtyři vzorky plazmy. Buňky byly předem ošetřeny se vzorky po 24 hodin před stimulací virem EMC. Po dvoudenní inkubaci s virem byly životaschopné buňky barveny roztokem MTT (5 mg/ml ve fosfátovém pufru) po dobu 1 hodiny, promyty fosfátovým pu frem a solubilizovány s 1,2N HCl v isopropanolu. Jamky pak byly odečítány ve 450 nm. Pro každou destičku byly

vytvořeny standardní křivky a použity pro určení množství aktivity interferonu-beta-1a v každém testovaném vzorku. Aktivita ve vzorcích od různých myší byla vynesena do grafu proti časovým bodům na obrázku 9.

Pomalejší ztráta fúze interferonu-beta-1a z krevního oběhu jako funkce času ukazuje, že biologický poločas vzorku fúzního proteinu je mnohem delší než poločas nemodifikovaného kontrolního interferonu-beta-1a. Druhé velmi významné zjištění z této studie bylo to, že velmi málo fúzního proteinu bylo ztraceno v průběhu distribuční fáze, jak prokázáno podobnými vysokými hladinami aktivity v 15 a 60 minutách. Data ukazují, že na rozdíl od kontrol interferonu-beta-1a, je distribuce fúzního proteinu interferonu-beta-1a převážně omezena na cévní zásobení.

#### Příklad 7

Srovnávací farmakokinetické a farmakodynamické studie na primátech

Komparativní studie byly prováděny s fúzí interferonu-beta-1a a nativním interferonem-beta-1a (jako neformulovaný volný meziprodukt AVONEX® interferonu-beta-1a ve 100mM fosfátu sodném, 200mM NaCl, pH 7,2) pro zjištění jejich relativní stability a aktivity na primátech. V těchto studiích byla srovnávána farmakokinetika a farmakodynamika fúze interferonu-beta-1a u primátů s nativním interferonem-beta-1a a racionální závěry mohou být rozšířeny na člověka.

## Zvířata a metody

### Návrh studie

Toto byla studie s paralelními skupinami a opakovánými dávkami pro vyhodnocení komparativní farmakokinetiky a farmakodynamiky fúzního proteinu interferonu-beta-1a a nefúzovaného interferonu-beta-1a.

Pro tuto studii byly použiti zdraví primáti (výhodně makak "rhesus", *Macaca mullata*). Před podáváním dávek byly u všech zvířat vyšetřeny příznaky nemocí veterinářem při dvou příležitostech během 14 dnů před prvním podáním testované sloučeniny, jedno vyšetření muselo být v průběhu 24 hodin před prvním podáním testované sloučeniny. Pouze zdravá zvířata dostala testovanou sloučeninu. Vyhodnocení zahrnovalo obecné fyzikální vyšetření a krevní odběry před podáním dávky pro vyšetření základních klinických patologických ukazatelů a výchozí hladiny protilátek proti interferonu-beta-1a. Všechna zvířata byla zvážena a během 24 hodin před podáním testované sloučeniny byla zaznamenávána tělesná teplota.

Bylo zaregistrováno dvanáct zvířat a rozděleno do skupin po třech, které dostávaly 1 MU/kg interferonu-beta-1a buď jako fúzovaný nebo nefúzovaný, ale jinak identický interferon-beta-1a. Podávání bylo prováděno buď subkutánně (SC) nebo intravenózně (IV). Šest samců dostalo testovanou sloučeninu IV způsobem (3/ošetření) a dalších 6 samců dostalo testovanou sloučeninu SC způsobem (3/ošetření). Všechna zvířata musela být nedotčena ošetřením interferonem-beta, čili tzv. naivní. Každému zvířeti byly podávány dávky ve dvou dobách, dávky byly odděleny čtyřmi týdny. Objem dávky byl 1,0 ml/kg.

Pro farmakokinetické testování byla odebírána krev v 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72

a 96 hodin po každé injekci. V 0, 24, 48, 72, 96, 168, 336, 504 hodin po podávání studovaného léčiva byly také odebírány vzorky krve pro měření markeru biologické reakce indukované interferonem, sérového neopterinu.

Hodnocení během období studie zahrnují klinická vyšetřování známek toxicity prováděná 30 minut a 1 hodinu po podání dávky. Byla prováděna denní pozorování přes klec a byl zaznamenáván celkový vzhled, příznaky toxicity, neklid a změny chování. Během 21 dnů po podání dávky byla zaznamenávána tělesná hmotnost a tělesná teplota.

#### Testovací metody

Hladiny interferonu-beta v séru byly kvantifikovány s použitím testu na hodnocení cytopatického účinku (CPE). Test CPE měřil stupeň antivirové aktivity zprostředkované interferonem. Stupeň antivirové aktivity ve vzorku odráží počet molekul aktivního interferonu obsažených ve vzorku v okamžiku, kdy je odebírána krev. Tento přístup byl standardní metodou pro stanovení farmakokinetiky interferonu-beta. Test CPE použitý v předkládané studii detekuje schopnost interferonu-beta chránit buňky lidského plicního karcinomu (A549, č. CCL-185, ATCC, Rockville, MD) před cytotoxicitou způsobenou virem encefalomyokarditidy (EMC). Buňky byly předem inkubovány 15 až 20 hodin se vzorky séra, aby se umožnila indukce a syntéza proteinů, které lze indukovat interferonem, a které pak zvyšují antivirovou reakci. Potom byl přidán virus EMC a inkubován dalších 30 hodin před tím, než se vyhodnotila cytotoxicita s použitím barvení krystalovou violetí. Na každé testované destičce byl současně se vzorky testován vnitřní standard interferonu-beta, jakož i vnitřní standard interferonu-beta-Ig. Tento standard byl kalibrován proti referenčnímu standardu

přirozeného interferonu lidských fibroblastů (WHO Second International Standard for Interferon, Human Fibroblast, Gb-23-902-53). Každá testovaná destička také zahrnovala jamky s kontrolou buněčného růstu, které neobsahovaly ani interferon-beta jakéhokoliv druhu, ani EMC, a jamky s virovou kontrolou, které obsahovaly buňky a EMC, ale neobsahovaly interferon-beta. Pro zjištování účinku, byly-li jaký, vzorků na buněčný růst byly také připraveny kontrolní destičky obsahující standardy a vzorky. Tyto destičky byly obarveny bez přidání viru.

Vzorky a standardy byly testovány v duplikátech na každé ze dvou opakujících se testovacích destiček, poskytující čtyři údaje o vzorku. Byl uváděn geometrický průměr hodnot koncentrace ze čtyřech opakování. Limit detekce v tomto testu je 10 jednotek (U)/ml.

Sérové koncentrace neopterinu byly určovány na oddělení klinické farmakologie s použitím komerčně dostupných testů.

#### Farmakokinetické a statistické metody

Software RstripTM (MicroMath, Inc., Salt Lake City, UT) byl použit pro prokládání (fitování) dat pomocí farmakokinetických modelů. Geometrické průměry hodnot koncentrace byly vyneseny do grafu proti času pro každou skupinu. Protože výsledky testu jsou vyjádřeny jako ředění, jsou geometrické průměry považovány za vhodnější, než aritmetické průměry. Hladiny sérového interferonu byly srovnány podle výchozích hodnot a nedekovatelné koncentrace v séru byly stanoveny na 5 U/ml, což představovalo jednu polovinu spodního limitu detekce.

Pro data z IV infúzí byl fitován IV infúzní model se dvěma kompartmenty pro detekovatelné koncentrace v séru pro

každý subjekt a SC data byla fitována podle injekčního modelu se dvěma kompartmenty.

Byly vypočítány následující farmakokinetické parametry:

i) pozorovaná vrcholová koncentrace,  $C_{max}$  (U/ml)  
ii) oblast pod křivkou od 0 do 48 hodin, AUC se vypočetla pomocí lichoběžníkového pravidla,  
iii) poločas eliminace,

a, z dat získaných při IV infúzi (když byl použit IV způsob podávání):

iv) poločas distribuce (hodiny, h),  
v) clearance (ml/h),  
vi) zjevný distribuční objem, Vd (l).

Pro výpočet poločasu eliminace po SC a IM injekci byl použit software WinNonlin (verze 1.0, Scientific Consulting Inc., Apex, NC).

Pro neopterin jsou uvedeny hodnoty aritmetického průměru v každé skupině. Byla vypočtena  $E_{max}$ , maximální hodnota změny proti základní hodnotě.  $C_{max}$ , AUC a  $E_{max}$  byla pak analyzovány jednosměrnou analýzou rozptylu pro srovnání skupin lišících se dávkami. Hodnoty  $C_{max}$  a AUC byly logaritmicky transformovány před analýzou, jsou uváděny geometrické průměry.

#### Příklad 8

Antiangiogenní účinky fúze interferonu-beta-1a: Hodnocení schopnosti fúze interferonu-beta-1a inhibovat proliferaci endotelových buněk *in vitro*

Buňky z lidského cévního endotelu (Cell Systems, katalog. č. 2V0-P75) a buňky endotelu kožních kapilár (Cell

Systems, katalog. č. 2M1-C25) byly udržovány v kultuře s médiem ze soupravy CS-C Medium Kit (Cell Systems, katalog. č. 4Z0-500). Čtyřiadvacet hodin před pokusem byly buňky ošetřeny trypsinem, resuspendovány v testovacím médiu, 90% M199 a 10% fetální hovězí sérum (FBS), a upraveny na požadovanou hustotu. Pak byly buňky vysety na 24 nebo 96jamkové destičky potažené želatinou, s hustotou 12500 buněk/jamka nebo 2000 buněk/jamka.

Po inkubaci přes noc bylo testovací médium nahrazeno čerstvým médiem obsahujícím 20 ng/ml lidského rekombinantního bazického fibroblastového růstového faktoru bFGF (Becton Dickinson, katalog. č. 400600) a různé koncentrace fúzovaných nebo nefúzovaných proteinů interferonu-beta-1a nebo pozitivní kontroly (jako pozitivní kontrola lze užít endostatin nebo protilátku k bFGF). Celkový objem byl nastaven na 0,5 ml ve 24jamkové destičce nebo 0,2 ml v 96jamkové destičce.

Po dvaasedmdesáti hodinách byly buňky ošetřeny trypsinem pro počítání na Coulteru, zamraženy pro odečítání fluorescence CyQuant nebo značeny [<sup>3</sup>H] thymidinem.

Tento *in vitro* test sloužil k hodnocení molekul lidského interferonu-beta podle vynálezu z hlediska účinků na proliferaci endotelových buněk, která může být indikátorem antiangiogenních účinků *in vivo*. Viz např. O'Reilly, M.S., T. Boehm., Y. Shing, N. Fukal, G. Vasios, W. Lane, E. Flynn, J. Birkhead, B. Olsen, J. Folkman, 1997, Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth, *Cell*, 88, 277-285.

## Příklad 9

In vivo model pro testování antiangiogenního a antineovaskularizačního účinku fúze interferonu-beta-1a/Ig

Pro testování antiangiogenních a antineovaskularizačních účinků molekul podle vynálezu byla vyvinuta celá řada modelů. Některé z těchto modelů byly popsány v patentech USA 5 733 876 (31. března 1998, "Method of inhibiting angiogenesis") a 5 135 919 (4. srpen 1992, "Method and pharmaceutical composition for the inhibition of angogenesis"). K dalším testům patří např. test s chorioalantoidní membránou bez skořápky (CAM) podle S. Taylor a J. Folkman, Nature, 297, 307, 1982 a R. Crum, S. Szabo a J. Folkman, Science, 230, 1375, 1985, model angiogeneze se vzdušným dorzálním vakem u myší podle J. Folkman, et al., J. Exp. Med., 133, 275, 1971, a test s mikrokapsou rohovky podle Gimbrone, M.A.Jr. et al., Natl. Cancer Inst., 52, 413, 1974, kde je vaskularizace rohovky indukována u dospělých samců laboratorních potkanů kmene Sprague-Dawley (Charles River, Japonsko) implantací 500 ng basického FGF (hovězí, R and D systems, Inc.) impregnovaného v EVA (kopolymer ethylen-vinylacetátu) peletech do každé rohovky.

K dalším metodám testování fúzí interferonu-beta/Ig na antiangiogenní účinky na zvířecím modelu patří (i když výčet tím není omezen) screeningové testy nových potenciálních protirakovinných léčiv, jak byly popsány v původní publikaci Cancer Chemotherapy Reports, Part 3, Vol. 3, No. 2, září 1972 a v suplementu In Vivo Cancer Models, 1976-1982, NIH Publ. No. 84-2635, únor 1984. Vzhledem k mezidruhové bariéře pro interferony typu I, pro hodnocení antiangiogenní aktivity fúzí interferonu-beta na modelech hlodavců, byly připraveny

17.07.01

80

přípravky fúzí interferonu-beta/Ig hlodavců. Screeningové metody jsou ukázány na příkladu protokolu pro testování antiangiogenního účinku fúzí myšího interferonu-beta/Ig na subkutánně implantovaný Lewisův plicní karcinom.

#### Původ nádorové linie

Vznikla spontánně v r. 1951 jako karcinom plic u myši C57BL/6.

#### Souhrn testovacích procedur

Fragment nádoru byl implantován do subkutánně do axilární oblasti myší B6D2F1. Testované činidlo (např. fúzní protein podle vynálezu) byl podáván v různých dávkách subkutánně (SC) nebo intraperitoneálně (IP) po několik dní po implantaci nádoru. Měřeným parametrem pak byl medián času přežití. Výsledky jsou uvedeny jako procenta času přežití kontroly.

#### Zvířata

Propagace nádoru: myši C57BL/6

Testovací zvířata: myši B6D2F1

Hmotnost: myši by měly mít hmotnost s rozpětím 3 g s minimální hmotností u samců 18 g a samic 17 g

Pohlaví: zvířata jednoho pohlaví jsou užita pro test i kontrolu v jednom pokusu

Zdroj: jeden zdroj, pokud je to možné, pro všechna zvířata v jednom pokusu

#### Rozsah experimentu

10 zvířat v jedné testovací skupině

Přenos nádoru

Propagace nádoru:

Fragment: připravit 2 až 4 mm fragment nádoru SC dárcovského nádoru

Doba: 13. až 15. den

Místo: fragment implantován SC do axilární oblasti vpichem v ingvinální oblasti

Testování:

Fragment: příprava fragmentu o velikosti 2-4 mm ze s.c. dárcovského tumoru.

Doba: 13. až 15. den

Místo: implantace fragmentu s.c. do axilární oblasti vpichem v ingvinální oblasti.

Testovací schéma:

Den 0: implantace tumoru. Založení bakteriálních kultur. Testování pozitivní kontrolní sloučeniny v každém experimentu s lichým číslem. Příprava materiálů. Denní záznam úmrtí.

Den 1: kontrola kultur. Odstranění kontaminovaného experimentu. Randomizace zvířat. Ošetřování dle instrukcí (v den 1 a následující dny).

Den 2: Opětná kontrola kultur. Odstranění kontaminovaného experimentu.

Den 5: Hodnocení dne 2 a den počátečního testu vyhodnocení toxicity přípravku.

Den 14: Kontrolní den časného úmrtí.

Den 48: Kontrolní den.

Den 60: Konec a vyhodnocení experimentu. Vyšetření tumoru plic pouhým okem.

**Kontrola kvality:**

Stanovení pozitivní kontrolní sloučeniny (NSC 26271 (Cytoxan v dávce 100 mg/kg/injekce)) v každém experimentu s lichým číslem, jehož režim byl v den 1 pouze intraperitoneální. Spodní limit testu/kontroly pro pozitivní kontrolu je 140%. Přijatelný medián přežití u neošetřené kontroly byl 19 až 35,6 dnů.

**Vyhodnocení:**

Měřený parametr je medián přežití. Výpočet průměrné tělesné hmotnosti zvířat v den 1 a v den 5, výpočet poměru test/kontrola pro všechny testované skupiny. Jsou vypočítány průměrné tělesné hmotnosti zvířat ve dny odečítání a v den konečného vyhodnocení. Poměr test/kontrola je vypočítán pro všechny testované skupiny s  $> 65\%$  přeživších v den 5. Poměr test/kontrola  $< 86\%$  indikuje toxicitu. Pro hodnocení toxicity může být také použit nepřiměřená změna tělesné hmotnosti (test minus kontrola).

**Měřítka aktivity:**

Výchozí poměr test/kontrola větší nebo rovný 140% je považován za nezbytný pro průkaz mírné aktivity. Reprodukovatelná hodnota poměru test/kontrola větší nebo rovná 150% je považována za významnou aktivitu.

17.07.01

SEZNAM SEKVENCÍ

<140> PCT/US99/24200

<141> 1999-10-15

<150> 60/120,237

<151> 1999-02-16

<150> 60/104,491

<151> 1998-10-16

<160> 44

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1197

<212> DNA

<213> Myš

<400> 1

atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaaggcagca attttcagtg tcagaagctc 60  
ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatac tgccctcaagg acaggatgaa ctttgacatc 120  
cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgcccgcatt gaccatctat 180  
gagatgctcc agaacatctt tgctatttc agacaagatt catctagcac tggctggaat 240  
gagactattg ttgagaacct cctggctaat gtctatcatc agataaaacca tctgaagaca 300  
gtcctggaaag aaaaactgga gaaagaagat ttcaccaggg gaaaactcat gagcagtctg 360  
cacctgaaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaagga gtacagtcac 420  
tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact tttacttcat taacagactt 480  
acaggttacc tccgaaacga cgatgatgac aaggtcgaca aaactcacac atgcccaccg 540  
tgcccagcac ctgaactctt ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 600  
gacaccctca tgatctcccg gacccttgag gtcacatgctg tgggtgtgga cgtgagccac 660  
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtagtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 720  
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 780  
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgc aaggctccaa caaagccctc 840  
ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaaggcc agccccgaga accacaggtg 900  
tacaccctgc cccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 960  
gtcaaaggct tctatcccg cgacatcgcc gtggagtgaa agagcaatgg gcagccggag 1020  
acaaactaca agaccacgcc tccctgtttg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1080  
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtatg 1140  
catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagacccctt ccctgtctcc cgggaaa 1197

17.07.01

84

<210> 2  
<211> 399  
<212> PRT  
<213> myš

<400> 2

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 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 Asp Asp Asp Lys Val Asp Lys Thr His  
165 170 175

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
180 185 190

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
195 200 205

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
210 215 220

17.07.01

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 225 230 235 240

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 245 250 255

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 260 265 270

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 275 280 285

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 290 295 300

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 305 310 315 320

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 325 330 335

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 340 345 350

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 355 360 365

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 370 375 380

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 385 390 395

<210> 3  
<211> 549  
<212> DNA  
<213> myś

<400> 3  
tccgggggcc atcatcatca tcatcatagc tccggagacg atgatgacaa gatgagctac 60  
aacttgcttg gattcctaca aagaagcgc aattttcagt gtcagaagct cctgtggcaa 120  
ttgaatggga ggcttgaata ctgcctcaag gacaggatga actttgacat ccctgaggag 180  
attaagcagc tgtagcagtt ccagaaggag gacgcccgc tggatctt tgatgtctc 240  
cagaacatct ttgttatattt cagacaagat tcatctagca ctggctggaa tgagactatt 300  
gttgagaacc tcctggctaa tgtctatcat cagataaacc atctgaagac agtcctggaa 360  
aaaaactgg agaaagaaga tttcaccagg ggaaaactca tgacgtct gcacctgaaa 420  
agatattatg ggaggattct gcattacatc aaggccaagg agtacagtca ctgtgcctgg 480

17.07.01

accatagtca gagtgaaat cctaaggAAC tttacttca ttaacagact tacaggTTAC 540  
ctccgAAAC 549

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 183

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; myS

&lt;400&gt; 4

Ser	Gly	Gly	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Asp	Asp
1									10					15	

Lys	Met	Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Phe
					20				25				30		

Gln	Cys	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys
					35			40				45			

Leu	Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Leu
					50			55			60				

Gln	Gln	Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu
					65		70			75			80		

Gln	Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp
					85				90				95		

Asn	Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile
					100			105				110			

Asn	His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Asp	Phe
					115			120			125				

Thr	Arg	Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gly
					130			135			140				

Arg	Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ser	His	Cys	Ala	Trp
					145			150			155			160	

Thr	Ile	Val	Arg	Val	Glu	Ile	Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asn	Arg
					165				170			175			

Leu	Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Asn
				180		

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 60

12.07.01

87

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gatctagcaa tgctgcgtgt gctccctcc tggctgcctt gaatgggagg cttgaataact 60

<210> 6

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tattatggga ggattctgca ttacctgaag gccaggagt actcacactg t 51

<210> 7

<211> 76

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

aattgaatgg gagggctgca gcttcgcgtc cagacaggat gaacttgac atccctgagg 60  
agattaagca gctgca 76

<210> 8

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Ala Thr Thr Gly Ala Ala Thr Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr  
1 5 10 15

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

Gly Ala Cys Ala Gly Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Thr Thr Gly  
35 40 45

Ala Cys Ala

50

<210> 9

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

17-07-01

88

ttctccggag acgatgatga caagatgagc tacaacttgc ttggattcct acaaagaagc 60  
  
<210> 10  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 10  
cgtcagagct gaaatcctag caaactttgc attcattgca agacttacag 50  
  
<210> 11  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 11  
ggtgtctca catgagctac aacttgottg gattcctaca aagaagc 47  
  
<210> 12  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 12  
gccctcgagt cgacccttgtc atcatcgctcg tttcggaggt aacctgtaag 50  
  
<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 13  
caagcttgct agcggccgcg g 21  
  
<210> 14  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 14  
ggtgtctca catggcttga gaagctgc 28  
  
<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 15

17.07.01

89

aggtsmarct gcagsagtcw

20

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

ctgagctcat ttacccggag tccgggagaa gctctt

36

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

agcttgctag cggccgcggc ctcactggct tca

33

<210> 18

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

atacgcgtcg acgtttcgga ggtaacatgt aagtctg

37

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

agcttgctag cggccgcggc ctcactggct tca

33

<210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

tacacgtcga cgctgccacc accgcccgttt cggaggtaac atgtaagtct g

51

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

17.07.01

90

gcccgtcgag ttatcagttt cgaggtaac ctgtaagtc	39
<210> 22	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 22	
ggaatgc <del>ttc</del> aattgttgct gcactc <del>ctg</del> a gcaatgtcta tcatcagata aaccatctga 60	
agacagt <del>tct</del> ag	72
<210> 23	
<211> 72	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 23	
ggaatgagac cattgttgag aac <del>c</del> c <del>t</del> c <del>t</del> gg ctaatgtcgc tcatcagata gcacatctgg 60	
ctgcagttct ag	72
<210> 24	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 24	
ctagctgcaa aactggctgc agctgatttc accagggaa aact	44
<210> 25	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 25	
ctagaagaaa aactggagaa agaagcagct accgctggaa aagcaatgag cgcgctgcac 60	
ctgaaaaga	69
<210> 26	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 26	
tattatggga ggattctgca ttacctgaag gcc <del>a</del> aggagt actcacactg t	51
<210> 27	
<211> 76	
<212> DNA	

17-07-01

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 27

catgagcagt ctgcacctga aaagatatta tggggcaatt gctgcataacc tggcagccaa 60  
ggagtactca cactgt 76

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 28

catgagcagt ctgcacctga aaagatatta tggaggatt ctgcattacc tgaaggccgc 60  
tgcataactca cactgtgcct ggacgat 87

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 29

catgagcagt ctgcacctga aaagatatta tggaggatt ctgcattacc tgaaggcaaa 60  
ggagtacgct gcatgtgcct ggacgat 87

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 30

cgtcagagct gaaatcctag caaactttgc attcattgca agacttacag 50

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 31

ggtgtctca catgagctac aacttgcttg gattcctaca aagaagc 47

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 32

gccctcgagt cgaccttgc atcatcgat tttcgaggt aacctgtaag 50

17-07-01

92

<210> 33  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 33  
caagcttgct agcgccgcg g 21

<210> 34  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 34  
ggtgtctca catggcttga gaagctgc 28

<210> 35  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> murine

<400> 35  
aggtsmarct gcagsagtcw 20

<210> 36  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> murine

<400> 36  
ctgagctcat ttacccggag tccgggagaa gcttt 36

<210> 37  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 37  
agcttgctag cggccgcggc ctcactggct tca 33

<210> 38  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 38  
atacgcgtcg acgtttcgga ggtaacatgt aagtctg 37

17-07-01

93

<210> 39  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 39  
agcttgctag cggccgcggc ctcactggct tca 33

<210> 40  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 40  
tacacgtcga cgctgccacc accgcccgttt cggaggtaac atgtaagtct g 51

<210> 41  
<211> 1257  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 41  
atgcctggga agatggtcgt gatcctggaa gcctcaaata tactttggat aatgtttgca 60  
gttctcaag ccatgagcta caacttgctt ggattcctac aaagaagcag caattttcag 120  
tgtcagaagc tcctgtggca attgaatggg aggcttgaat actgcctcaa ggacaggatg 180  
aactttgaca tccctgagga gattaagcag ctgcagcagt tccagaagga ggacggcga 240  
ttgaccatct atgagatgct ccagaacatc tttgctattt tcagacaaga ttcatctagc 300  
actggctgga atgagactat tggtgagaac ctccctggcta atgtctatca tcagataaac 360  
catctgaaga cagtcctgga agaaaaactg gagaagaag atttcaccag gggaaaactc 420  
atgagcagtc tgcacctgaa aagatattat gggaggattc tgcattacct gaaggccaag 480  
gagtagtc actgtgcctg gaccatagtc agagtggaaa tcctaaggaa cttttacttc 540  
attaacagac ttacatgtta cctccgaaac gtcgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 600  
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac 660  
accctcatga tctccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa 720  
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagtgc gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 780  
aagccgcggg aggagcagta caacagcagc taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 840  
caccaggact ggctgaatgg caaggaggatc aagtgcagg tctccaaacaa agccctccca 900  
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 960  
accctgcccc catccggaa tgagctgacc aagaaccagg tcagcgtcct ctgcctggc 1020  
aaaggcttct atccccagcga catgcgtg gagtgggaga gcaatggca gccggagaac 1080  
aactacaaga ccacgcctcc cgtgttggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1140  
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggAACGTCT tctcatgctc cgtgatgcat 1200  
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccgg gaaatga 1257

<210> 42  
<211> 418  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

17-07-01

94

&lt;400&gt; 42

Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp  
1 5 10 15

Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe  
20 25 30

Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu  
35 40 45

Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile  
50 55 60

Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala  
65 70 75 80

Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln  
85 90 95

Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu  
100 105 110

Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu  
115 120 125

Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu  
130 135 140

His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys  
145 150 155 160

Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg  
165 170 175

Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Val Asp  
180 185 190

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
195 200 205

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
210 215 220

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
225 230 235 240

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

17-07-01

95

245

250

255

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
260 265 270

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
275 280 285

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
290 295 300

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
305 310 315 320

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
325 330 335

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
340 345 350

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
355 360 365

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
370 375 380

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
385 390 395 400

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
405 410 415

Gly Lys

<210> 43

<211> 1272

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

atgcctggga agatggcgt gatccttggaa gcctcaaata tactttggat aatgtttgc 60  
gcttctcaag ccatgagcta caacttgctt ggattcctac aaagaagcag caattttcag 120  
tgtcagaagc tcctgtggca attgaatggg aggcttgaat actgcctcaa ggacaggatg 180  
aactttgaca tccctgagga gattaagcag ctgcagcagt tccagaagga ggacgcccga 240  
ttgaccatct atgagatgct ccagaacatc tttgcttattt tcagacaaga ttcatctagc 300  
actggctgga atgagactat tgttgagaac ctccctggcta atgtcttatca tcagataaac 360

17-07-01

96

catctgaaga cagtcctgga agaaaaactg gagaaagaag atttcaccag gggaaaactc 420  
 atgagcagtc tgcacctgaa aagatattat gggaggattc tgcattaccc gaaggccaag 480  
 gagtacagtc actgtgcctg gaccatagtc agagtggaaa tcctaaggaa ctttacttc 540  
 attaacagac ttacatgtta cctccgaaac ggcgggtgtg gcagcgtcga caaaactcac 600  
 acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 660  
 caaaaaccca aggacacccct catgatctcc cggaacccctg aggtcacatg cgtgggtgtg 720  
 gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 780  
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgggtcagc 840  
 gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 900  
 aacaaagccc tcccgcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 960  
 gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cggtgatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1020  
 ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1080  
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctccctgtt tggactccga cggctccttc 1140  
 ttccctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1200  
 tgctccgtga tgcataggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1260  
 cccggaaat ga 1272

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 423

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 44

Met	Pro	Gly	Lys	Met	Val	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Trp
1				5					10					15	

Ile	Met	Phe	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Met	Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe
								20					30		

Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Phe	Gln	Cys	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu
								35					45		

Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile
								50					60		

Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Gln	Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala
								65					75		80

Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln	Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln
								85					90		95

Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn	Glu	Thr	Ile	Val	Glu	Asn	Leu	Leu
								100					105		110

Ala	Asn	Val	Tyr	His	Gln	Ile	Asn	His	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Glu
								115					120		125

Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Asp	Phe	Thr	Arg	Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Ser	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

17-07-01

97

130

135

140

His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys  
 145                    150                    155                    160

Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg  
 165                    170                    175

Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Gly Gly  
 180                    185                    190

Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 195                    200                    205

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 210                    215                    220

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 225                    230                    235                    240

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 245                    250                    255

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 260                    265                    270

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 275                    280                    285

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 290                    295                    300

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 305                    310                    315                    320

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
 325                    330                    335

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 340                    345                    350

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 355                    360                    365

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 370                    375                    380

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

17-07-01

98

385

390

395

400

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
405 410 415

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
420

17.07.01

PV 2001-1330

99

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Izolovaný polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci X-Y-Z, kde X je polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci, nebo její část, obsahující aminokyselinovou sekvenci glykosylovaného interferonu-beta, Y je volitelná spojovací část, a Z je polypeptid obsahující alespoň část polypeptidu jiného než je glykosylovaný interferon-beta.
2. Izolovaný polypeptid podle nároku 1, kde X je interferon-beta-1a.
3. Izolovaný polypeptid podle nároku 1, kde X je mutanta mající alespoň jednu z následujících vlastností:  
(a) mutanta má vyšší antivirovou aktivitu než interferon-beta-1a divokého typu, když je antivirová aktivita měřena pomocí virem indukované lýzy buněk, (b) mutanta má, při srovnání s interferonem-beta-1a divokého typu, antivirovou aktivitu vyšší než antiproliferační aktivitu, (c) mutanta váže interferonový receptor, ale při srovnání s interferonem-beta-1a divokého typu má sníženou antivirovou aktivitu a sníženou antiproliferační aktivitu vzhledem k vazebné aktivitě pro receptor.
4. Izolovaný polypeptid podle nároku 2, kde interferon-beta-1a je derivatizovaný.
5. Izolovaný polypeptid podle nároku 4, kde derivát je polyalkylglykolový polymer.

6. Izolovaný polypeptid podle nároku 1, kde Z je alespoň část konstantního úseku imunoglobulinu.
7. Izolovaný polypeptid podle nároku 6, kde alespoň část konstantního úseku imunoglobulinu pochází z imunoglobulinu patřícího do třídy vybrané z tříd IgM, IgG, IgD, IgA a IgE.
8. Izolovaný polypeptid podle nároku 7, kde třída je IgG.
9. Izolovaný polypeptid podle nároku 6, kde alespoň část konstantního úseku obsahuje alespoň kloubovou oblast, doménu CH2 a doménu CH3.
10. Fúzní protein mající amino-koncový úsek sestávající z aminokyselinové sekvence glykosylovaného interferonu-beta nebo jeho části a mající karboxy-koncový úsek sestávající z alespoň části proteinu jiného než je glykosylovaný interferon-beta.
11. Izolovaný protein podle nároku 10, kde interferon-beta je interferon-beta-1a.
12. Izolovaný protein podle nároku 10, kde interferon-beta je mutanta mající alespoň jednu z následujících vlastností:  
(a) mutanta má vyšší antivirovou aktivitu než interferon-beta-1a divokého typu, když je antivirová aktivita měřena pomocí virem indukované lýzy buněk, (b) mutanta má, při srovnání s interferonem-beta-1a divokého typu, antivirovou aktivitu vyšší než antiproliferační aktivitu, (c) mutanta váže interferonový receptor, ale při srovnání s

interferonem-beta-1a divokého typu má sníženou antivirovou aktivitu a sníženou antiproliferační aktivitu vzhledem k vazebné aktivitě pro receptor.

13. Izolovaný protein podle nároku 11, kde interferon-beta-1a je derivatizovaný.

14. Izolovaný protein podle nároku 13, kde derivát je polyalkylglykolový polymer.

15. Izolovaný protein podle nároku 10, kde alespoň část proteinu jiného než interferon-beta je alespoň část konstantního úseku imunoglobulinu.

16. Izolovaný protein podle nároku 15, kde alespoň část konstantního úseku imunoglobulinu pochází z imunoglobulinu patřícího do třídy vybrané z tříd IgM, IgG, IgD, IgA a IgE.

17. Izolovaný protein podle nároku 16, kde třída je IgG.

18. Izolovaný protein podle nároku 15, kde alespoň část konstantního úseku obsahuje alespoň kloubovou oblast, doménu CH2 a doménu CH3.

19. Izolovaná sekvence DNA, která kóduje protein podle nároku 1 a 10.

20. Rekombinantní DNA, která obsahuje sekvenci podle nároku 19 a expresní kontrolní sekvenci, přičemž expresní kontrolní sekvence je operativně spojena se sekvencí DNA.

21. Hostitelská buňka transformovaná sekvencí rekombinantní DNA podle nároku 20.

22. Způsob přípravy rekombinantního polypeptidu vyznačující se tím, že obsahuje kroky, kdy se: (a) poskytne populace hostitelských buněk podle nároku 21, (b) kultivuje populace buněk v podmínkách, ve kterých je polypeptid kódovaný rekombinantní DNA exprimován, a (c) izoluje exprimovaný polypeptid.

23. Fúzní protein interferonu-beta, který obsahuje glykosylovaný interferon-beta a další polypeptid, se kterým není v přírodě spojen, a sice v podstatě čisté formě.

24. Fúzní protein podle nároku 23, kde interferon-beta je lidský interferon-beta-1a.

25. Fúzní protein podle nároku 24, kde fúze má antivirovou aktivitu vybranou ze skupiny obsahující: (a) vyšší antivirovou aktivitu než interferon-beta-1a divokého typu, když je antivirová aktivita měřena pomocí virem indukované lýzy buněk, (b) antivirovou aktivitu vyšší než antiproliferační aktivitu, při srovnání s interferonem-beta-1a divokého typu, (c) aktivitu zahrnující vazebnou aktivitu pro interferonový receptor, ale při srovnání s interferonem-beta-1a divokého typu sníženou antivirovou aktivitu a sníženou antiproliferační aktivitu vzhledem k vazebné aktivitě pro receptor.

26. Farmaceutický přípravek vyznačující se tím, že obsahuje terapeuticky účinné množství fúzního proteinu interferonu-beta podle kteréhokoli z nároků 1, 10 a 23.

27. Způsob inhibice angiogeneze u pacienta, vyznačující se tím, že se pacientovi podává účinné množství přípravku podle nároku 26.

28. Izolovaný polypeptid podle nároku 3, kde mutanta je derivatizovaná.

29. Izolovaný polypeptid podle nároku 28, kde derivátem je polyalkylglykolový polymer.

30. Izolovaný protein podle nároku 12, kde mutanta je derivatizovaná.

31. Izolovaný protein podle nároku 30, kde derivátem je polyalkylglykolový polymer.

17.07.01

PV 2001-1370

1/17

1 TCCGGGGGCC ATCATCATCA TCATCATAGC TCCGGAGACG ATGATGACAA GATGAGCTAC  
1↓Ser Gly Gly H i s H i s H i s H i s H i s Ser Ser Gly Asp A s p Asp Asp Ly s Met Ser Tyr  
61 AACTTGCTTG GATT CCTACA AAGAAGCAGC AATTTTCA GT CAGAAGCT CCTGTGGCAA  
21↓Asn Leu Leu G l y Phe Leu Gl n Arg Ser Ser Asn Phe Gl n C ys Gl n Lys Le u Leu Trp Gl n  
121 TTGAATGGGA GGCTTGAATA CTGCCTCAAG GACAGGATGA ACTTTGACAT CCCTGAGGAG  
41↓Leu Asn Gly A rg Leu Gl u Ty r Cys Leu Lys Asp Ar g Met A sn Phe Asp II e Pro Gl u Gl u  
181 ATTAAGCAGC TG CAGCAGTT CCAGAAGGAG GACGCCGCAT TG ACCATCTA TGAGATGCTC  
61↓Ile Lys Gl n L eu Gl n Gl n Ph e Gl n Lys Gl u Asp Al a Al a L eu Thr Ile Ty r Gl u Met Leu  
241 CAGAACATCT TTGCTATTT CAGACAAGAT TCATCTAGCA CTGGCTGGAA TGAGACTATT  
81↓Gl n Asn Ile P he Al a Ile Ph e Arg Gl n Asp Ser Ser Ser T hr Gl y Trp As n Gl u Thr Ile  
301 GTTGAGAACCC TCCTGGCTAA TGTCTATCAT CAGATAAACCC ATCTGAAGAC AGTCCTGGAA  
101↓Val Gl u Asn L eu Leu Al a As n Val Ty r His Gl n Ile Asn H i s Leu Lys Th r Val Leu Gl u  
361 GAAAAACTGG AGAAAGAAGA TTT CACCAGG GGAAA ACTCA TGAGCAGTCT GCACCTGAAA  
121↓Gl u Lys Leu G lu Lys Gl u As p Phe Th r Arg Gl y Lys Leu M et Ser Ser Le u His Leu Lys  
421 AGATATTATG GGAGGATTCT GCATTACCTG AAGGCCAAGG AGTACAGTCA CTGTGCCTGG  
141↓Arg Ty r Ty r G l y Arg Ile Le u His Ty r Leu Lys Al a Lys G lu Ty r Ser Hi s Cys Al a Trp  
481 ACCATAGTCA GAGTGGAAAT CCTAAGGAAC TTTTACTTCA TTAACAGACT TACAGGTTAC  
161↓Thr Ile Val A rg Val Gl u Ile Leu Arg Asn Phe Ty r Phe I le Asn Arg Le u Thr Gl y Ty r  
541 CTCCGAAAC  
181↓Leu Arg Asn

Obr. 1

17.07.01

PV 2007-1330

2A-1
2A-2

2/17

Obr. 2A

Obr. 2A-1

1 ATGAGCTACA ACTTGCTTGG ATT CCTACAA AGAACAGCA ATTT CAGTG TCAGAACCTC  
1 Met Ser Tyr A sn Leu Leu Gl y Phe Leu Gl n Arg Ser Ser A sn Phe Gl n Cy s Gl n Lys Leu  
61 CTGTGGCAAT TGAATGGGAG GCTTGAATAAC TGCCCTCAAGG ACAGGATGAA CTTTGACATC  
21 Leu Trp Gl n L eu Asn Gl y Ar g Leu Gl u Tyr Cys Leu Lys A sp Arg Met As n Phe Asp Ile  
121 CCTGAGGAGA TTAAGCAGCT GCAGCAGTTC CAGAAGGAGG ACGCCGCATT GACCATCTAT  
41 Pro Gl u Gl u I le Lys Gl n Le u Gl n Gl n Phe Gl n Lys Gl u A sp Al a Al a Le u Thr I le Tyr  
181 GAGATGCTCC AGAACATCTT TGCTATTTTC AGACAAGATT CATCTAGCAC TGGCTGGAAT  
61 Gl u Met Leu Gl n Asn I le Ph e Al a I le Phe Arg Gl n Asp S er Ser Ser Th r Gl y Trp Asn  
241 GAGACTATTG TTGAGAACCT CCTGGCTAAT GTCTATCATC AGATAAACCA TCTGAAGACA  
81 Gl u Thr I le V al Gl u Asn Le u Leu Al a Asn Val Tyr His Gl n I le Asn Hi s Leu Lys Thr  
301 GTCCCTGGAAG AAAACTGGA GAAAGAAGAT TTCACCAGGG GAAAACTCAT GAGCAGTCTG  
101 Val Leu Gl u G lu Lys Leu Gl u Lys Gl u Asp Phe Thr Arg Gl y Lys Leu Me t Ser Ser Leu  
361 CACCTGAAAA GATATTATGG GAGGATTCTG CATTACCTGA AGGCCAAGGA GTACAGTCAC  
121 His Leu Lys A rg Tyr Tyr Gl y Arg I le Leu His Tyr Leu L ys Al a Lys Gl u Tyr Ser His  
421 TGTGCCTGGA CCATAGTCAG AGTGGAAATC CTAAGGAAC TTTACTTCAT TAACAGACTT  
141 Cys Al a Trp T hr I le Val Ar g Val Gl u I le Leu Arg Asn P he Tyr Phe I l e Asn Arg Leu  
481 ACAGGTTACC TCCGAAACGA CGATGATGAC AAGGTCGACA AAAC T CACAC ATGCCACCG  
161 Thr Gl y Tyr L eu Arg Asn As p Asp Asp Asp Lys Val Asp L ys Thr His Th r Cys Pro Pro  
541 TGCCCAGCAC CTGAACCTCCT GGGGGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAAG

17.07.01

PV 2007-1330

## Obr. 2A-2

3/17

181 ▶ Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Glu Gly Pro Ser Val Phe Leu Pro Phe Pro Pro oLys Pro Lys

601 GAC ACC CTCA TGAT CTCCCG GAC CCCTGAG GTC ACAT GCG TGG TGGT GGA CGT GAG CCAC

201 ▶ Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

661 GAAG ACC CTG AGGT CAAG TT CAA CTGGT AC GTGG AC GGCG TG GAG GTG CA TA ATGCCA AG

221 ▶ Glu Asp Pro Glu Val Lys Ph e Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

## Obr. 2B

721 ACA AA AGCCGC GGG AGG GAGCA GTACA ACAGC ACGT ACC GTG TGG TCA GCGT CCTCAC CGTC

1 ▶ Thr Lys Pro Alan Glu Glu Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

781 CTGC ACC CAGG ACTGG CTG AA TGG CAAGG AG TACA AGTG CA AGGT CTCAA CAA AGCC CT

21 ▶ Leu His Glu Alan Sp Trp Leu Asp Glu Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asp Lys Ala Leu

841 CCAG CCCC CA TCG AGAAA AC CAT CTCAA A GCC AA AGGG C AGCCCC GAGA ACCAC AGGT G

41 ▶ Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Glu Val

901 TAC ACC CTGC CCC ATCC CG GGAT GAG CTG ACCA AGA ACC AGGT CAG CCT GAC CTG CCT G

61 ▶ Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

961 GTCAA AGG CT TCT ATCC AG CGAC ATCG CC GTGG AGT GGG AGAG CAAT GG GCAG CCG GAG

81 ▶ Val Lys Gly Pro Tyr Pro Ser Arg Asp Ile Ala Val Glu Trp Gln Ser Asn Glu Gly Gln Pro Glu

1021 AAC AACT ACA AG ACC AC GGC TCC CGT GTT G GACT CC GAC G GCT CCT TCT T CCT CTAC AGC

101 ▶ Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gln Ser Phe Ph e Leu Tyr Ser

1081 AAG CTC ACC G TGG ACA AGAG CAG GTGG CAG CAG GGG AAC G TCT TCT CAT G CTCC GTG ATG

121 ▶ Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Glu Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

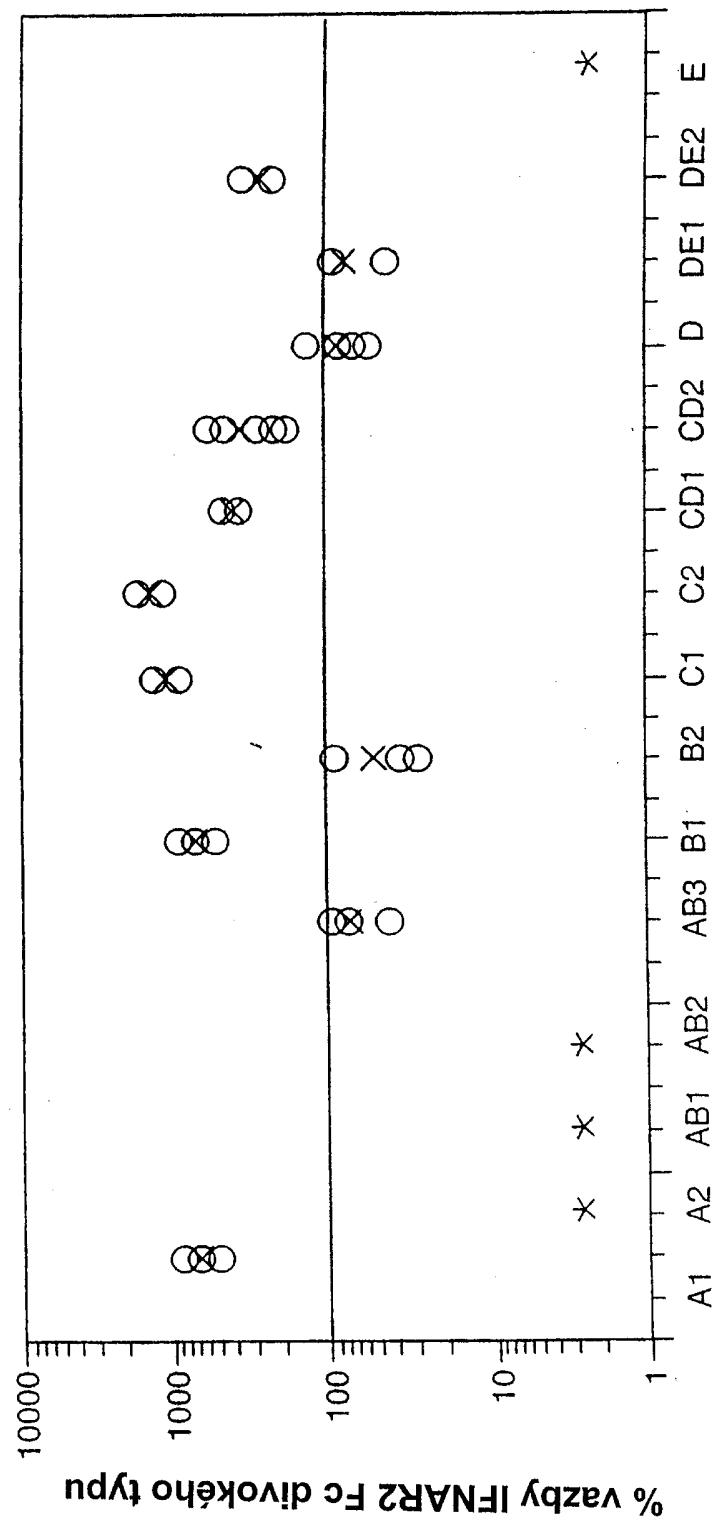
1141 CAT GAG GCT C TGC ACA ACCA CTAC AC GCG AG AAG AGC CTCT CCT GTCT CC CGGG AAA

141 ▶ His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Pro Glu Lys

17.07.01

PV 2007-1330

4/17

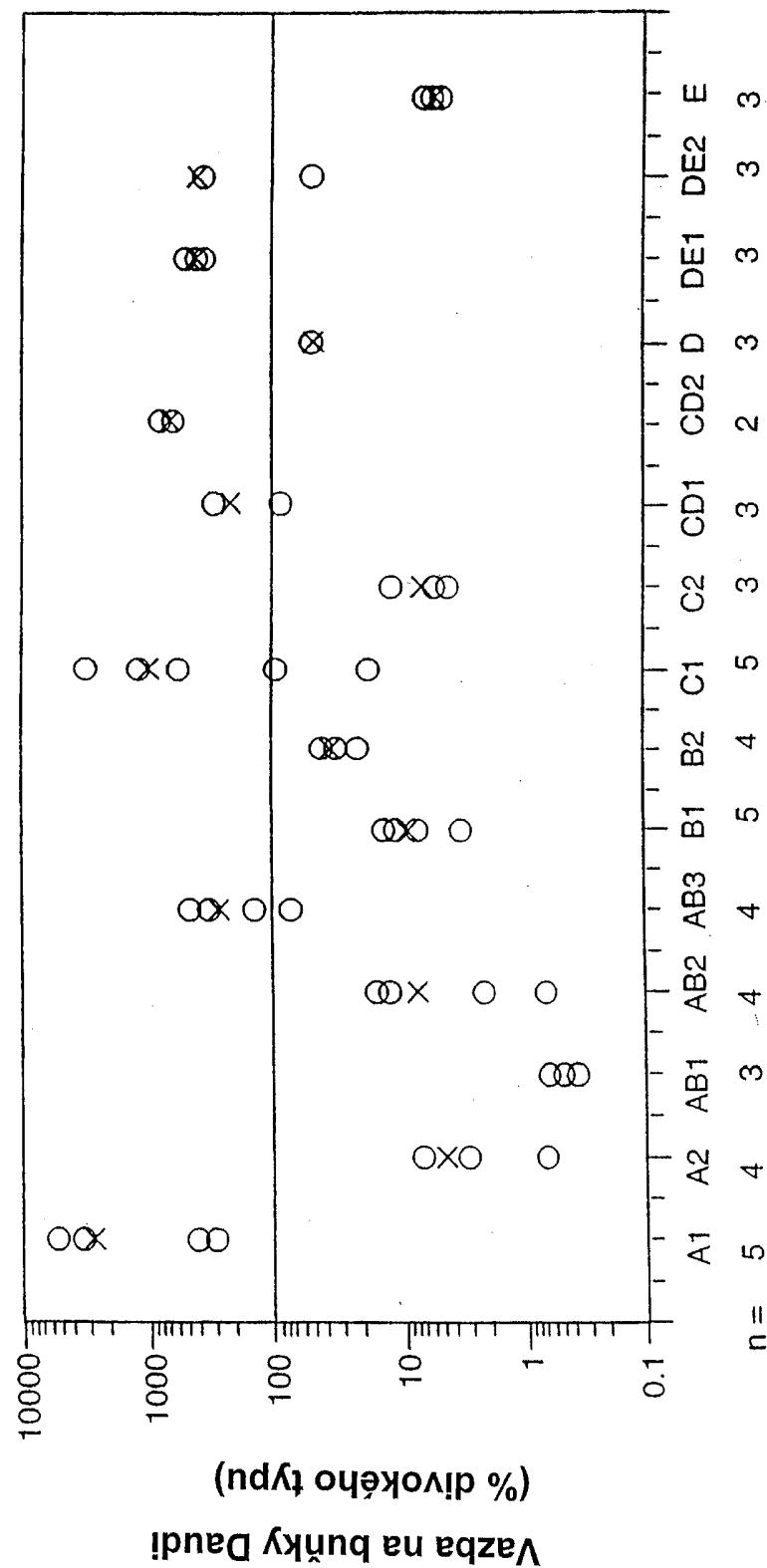


Obr. 3

17.07.01

PV 2007-1330

5/17

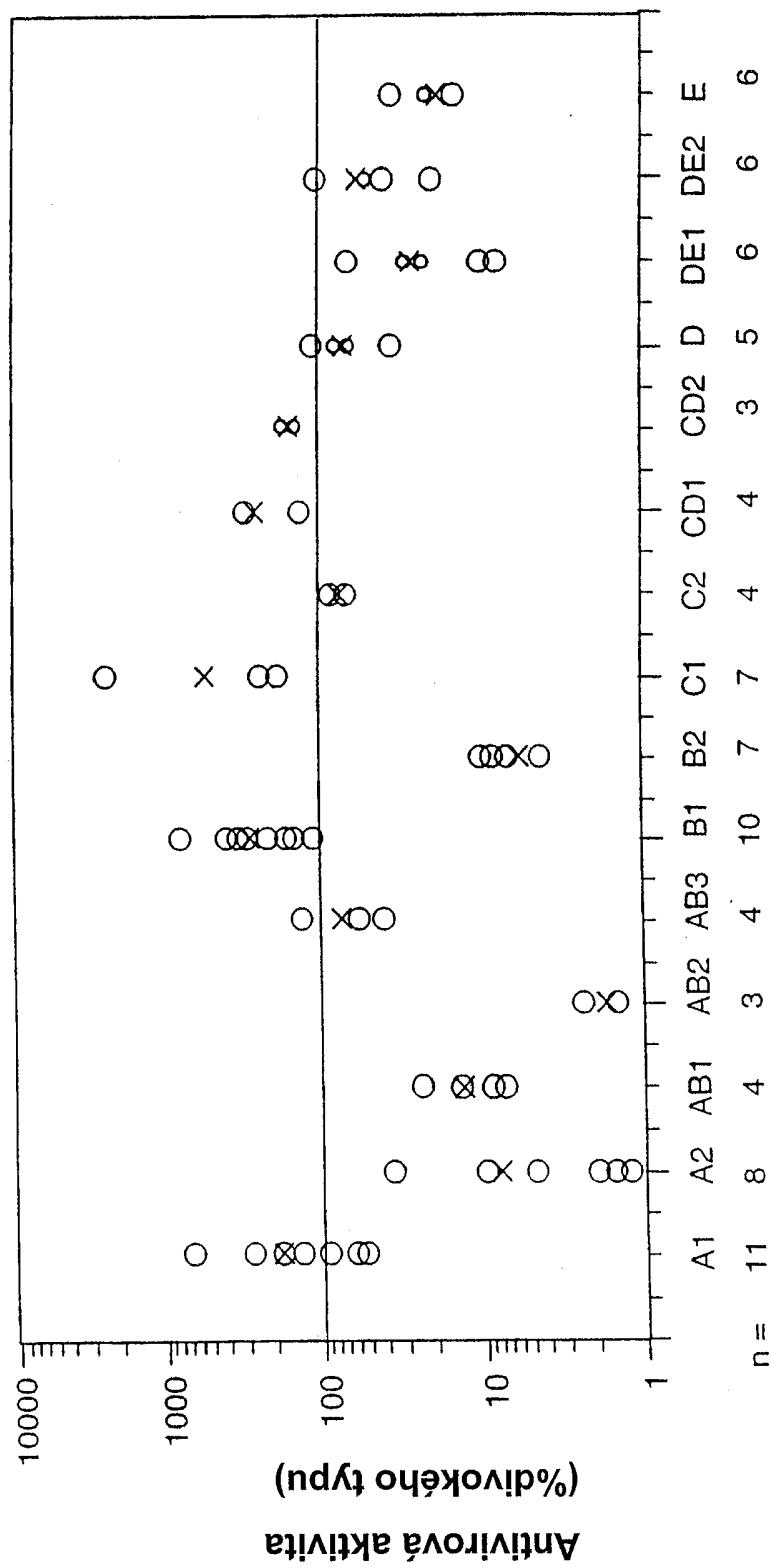


Obr. 4

17.07.01

PV 2007-1330

6/17

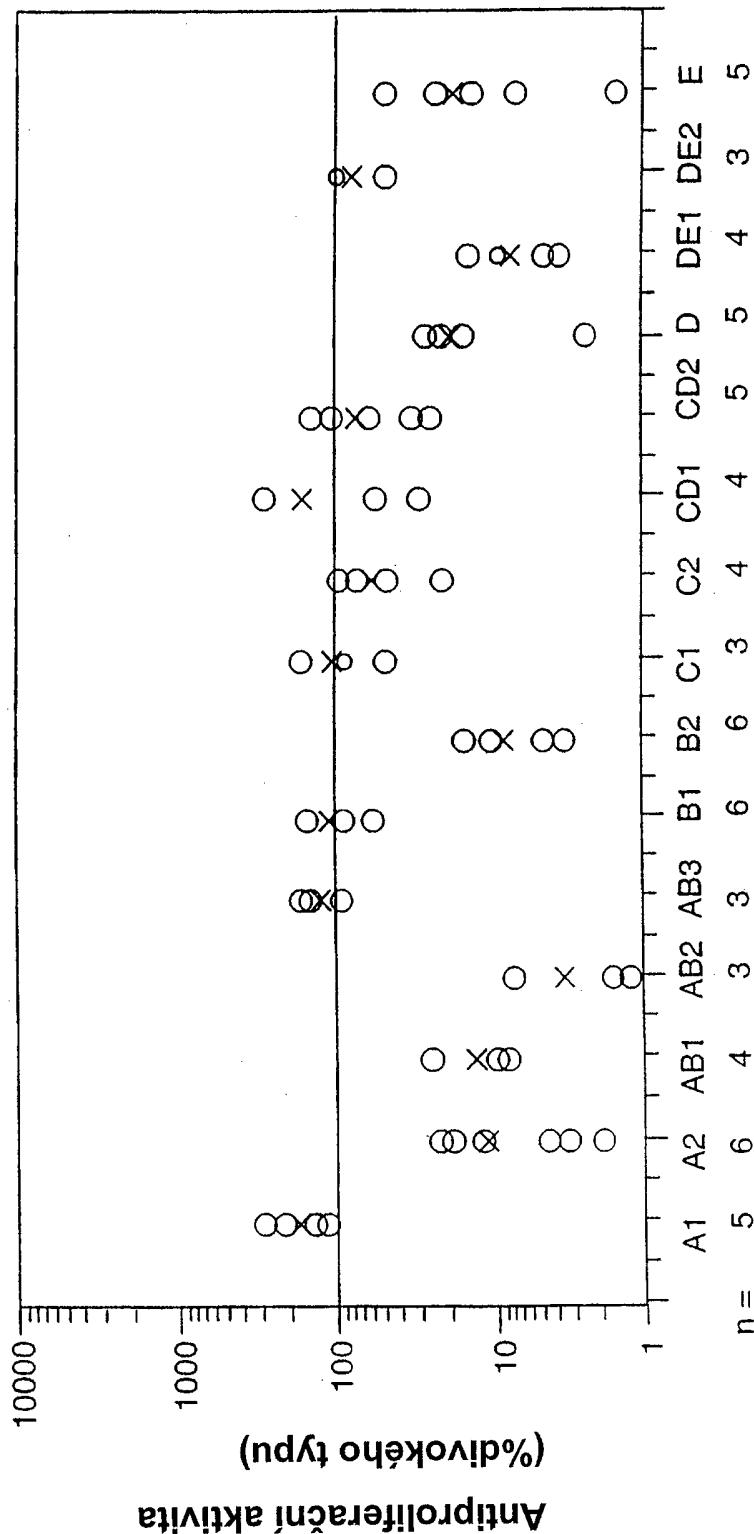


Obr. 5

17-07-01

PV 2001-1330

7/17

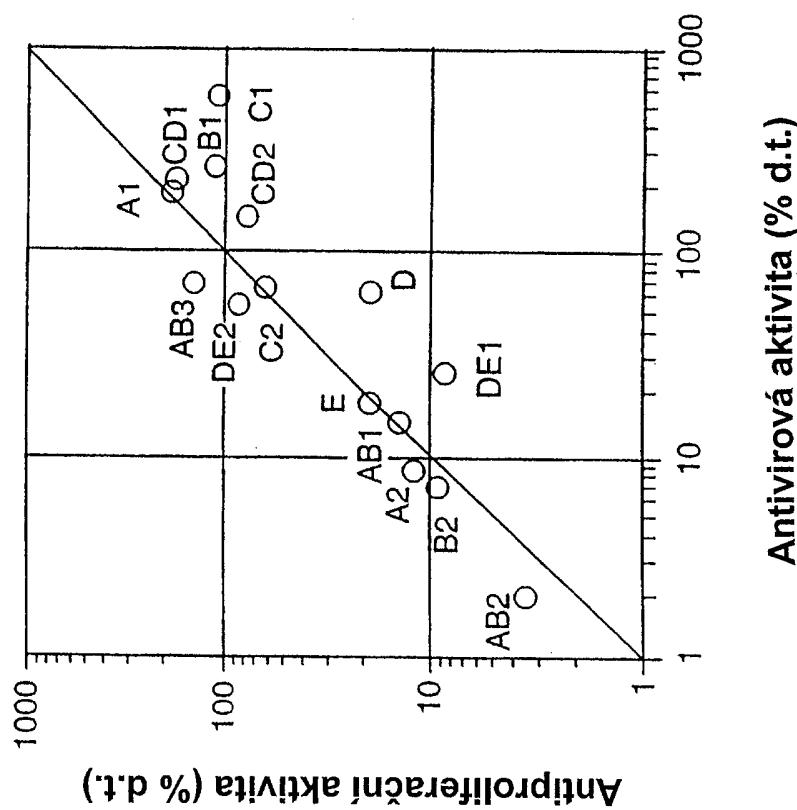


Obr. 6

17.07.01

PV 2001-1320

8/17



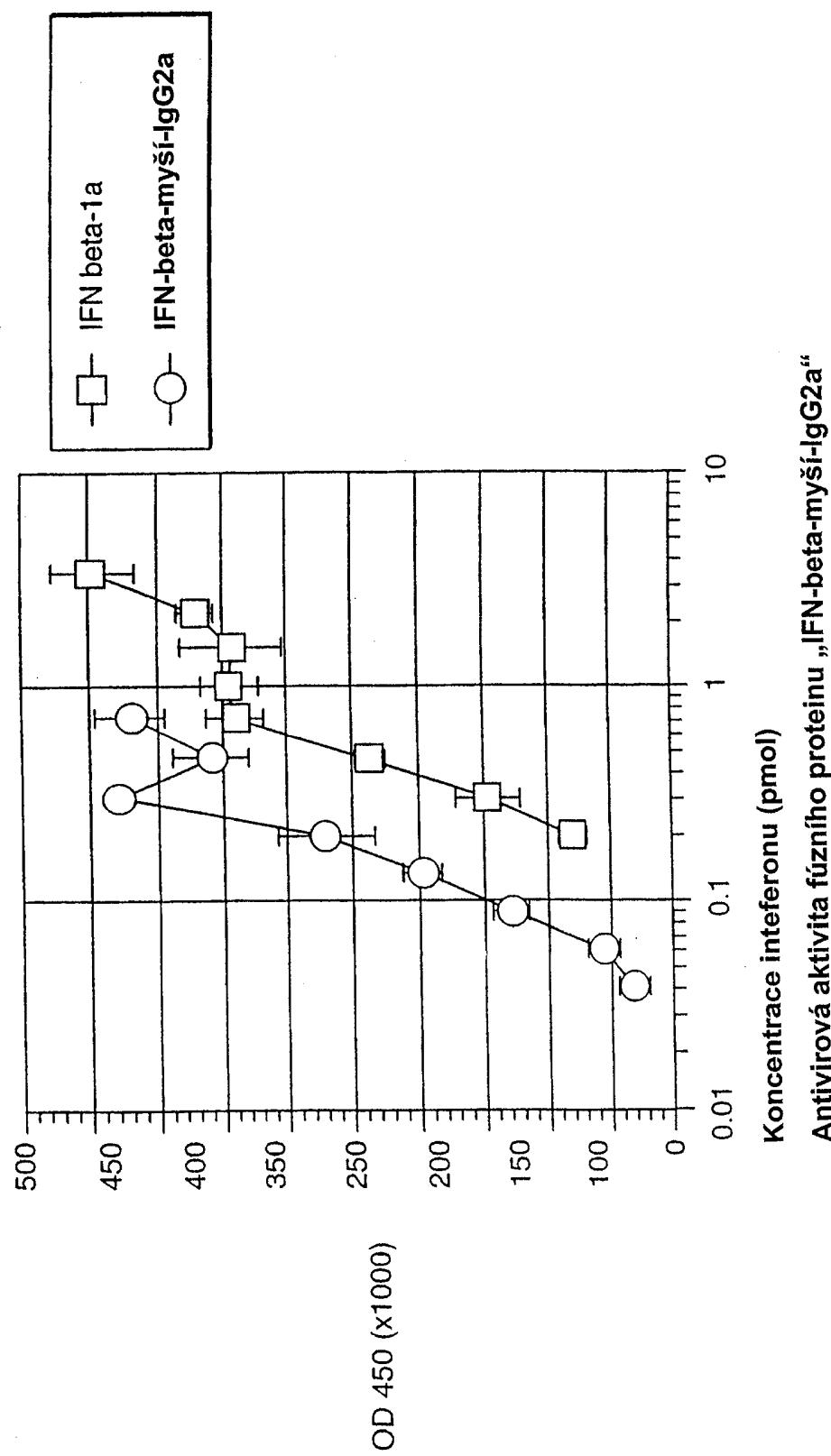
Obr. 7

17.07.01

PV 2001-1330

9/17

Obr. 8

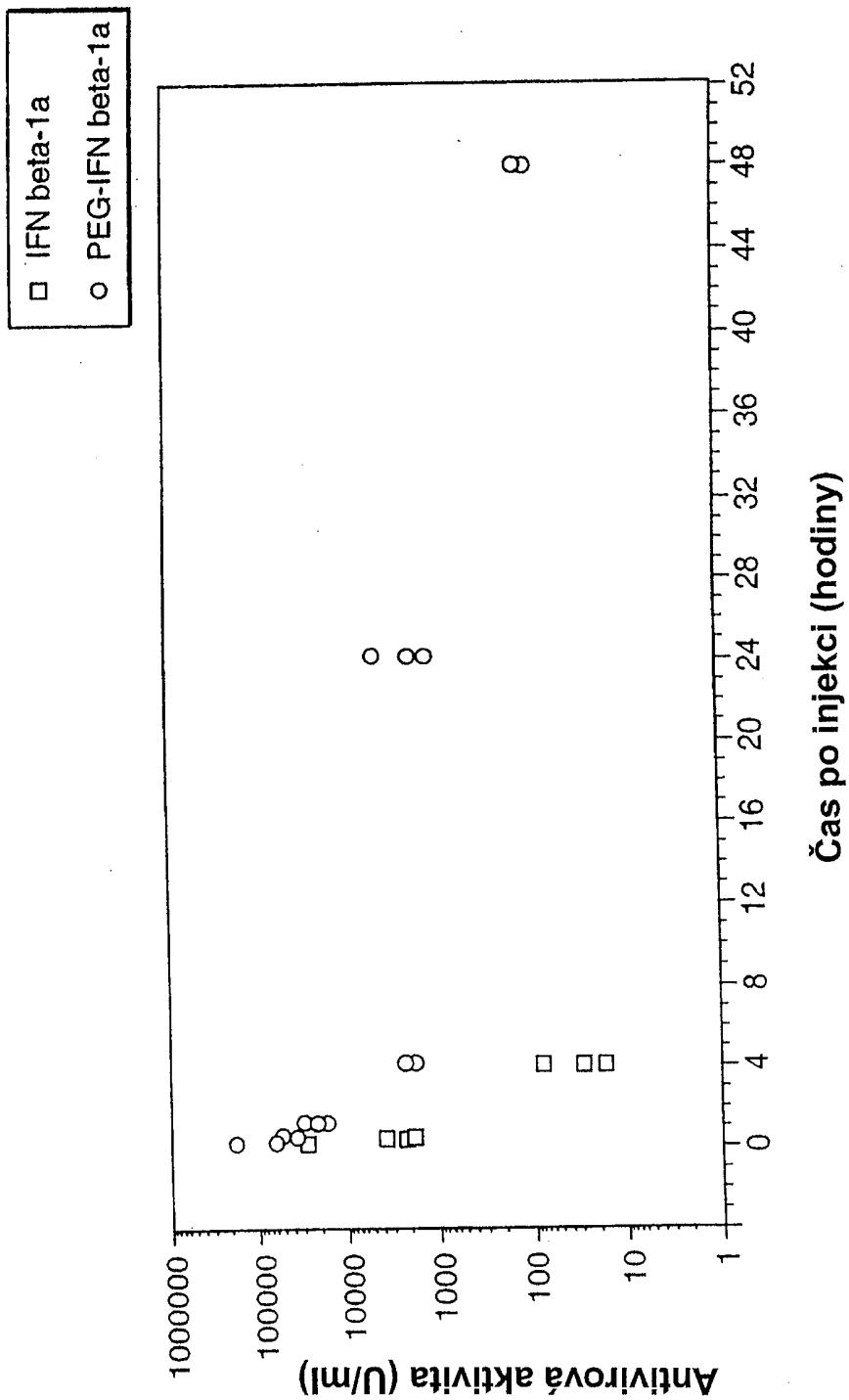


17.07.01

PV 2001-1330

10/17

Obr. 9



17.07.01

PV 2001-1330

11/17

Obr. 10

Otevřený čtecí rámcem konstruktu přímé fúze IFN-beta G162C-Ig

1	ATGCCTGGAAAGATGGTCGTGATCCCTGGAGC CCTCAAATACTTGGATAATTGTTTGCA	60
M P G K M V V I L G A S N I L W I M F A		10B
A S Q A M S Y N L L G F L Q R S S N F Q		10C
C Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R M		
121	TGTCAGAAGCTCCTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCCTCAAGGACAGGATG	180
N F D I P E E I K Q L Q F Q K E D A A		
181	AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAAGCAGGCTGCAGCGCAGTTCCAGAAGGGACGCCGCA	240
L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S		
241	TTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTCAGACAAGATTCATCTAGC	300
T G W N E T I V E N L A N V Y H Q I N		
301	ACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTATTGTCATCATCAGATAAAC	360
H L K T V L E E K L E K E D F T R G K L		
361	CATCTGAAGACAGTCCTGGAAAGAAAACCTGGAGAAAGATTCACCCAGGGAAAAACTC	420
M S S L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K		
421	ATGAGGCAGTCTGCACCTGAAAGATATTATGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAG	480

Obr. 10A

17.07.01

PV 2001-1330

12/17

481 GAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGACTGGAATCCTAAGGAACTTTACTTC 540  
E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F  
541 ATTAACAGACTTACATGTTACCTCCGAAACGTCGACACAAACTCACACATGCCAACCGTGC 600  
I N R L T C Y L R N V D K T H T C P P C  
601 CCAGCACCTGAAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCCCCAAACCCAAGGAC 660  
P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D  
661 ACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCCGTGGTGGACGTTGAGCCACGAA 720  
T L M I S R T P E V T C V V D V S H E  
721 GACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGGTACGGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA 780  
D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T  
781 AACCCGGGGAGGAGTACAACAGCACGGTACCGTGTGGTCAGCGGTCTCACCGTCTCTG 840  
K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L  
841 CACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA 900  
H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P  
901 GCCCCCATTGGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTAC 960  
A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V V Y

Obr. 10B

17.07.01

PV 2007-1330

13/17

961 ACCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCGGTCAAGCTGACTGCCCTGGTC 1020  
T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V  
  
1021 AAAGGCTTCTATCCCAGCCGACATGCCGTGGAGTAGAGCAATGGCAGCCGGAAAC 1080  
K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N  
  
1081 AACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTACAGCAAG 1140  
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K  
  
1141 CTCACCGTGGACAAGAGCCAGGTGGCAGGAGGGAACCGTCTCATGCTCCGTGATGCAT 1200  
L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H  
  
1201 GAGGCTCTGCACAACTACACCGAGAGAGAGAGAGAAATGA 1257  
E A L H N H Y T Q K S L S P G K \*

Obr. 10C

17.07.01

PV 2001-1330

11A
11B
11C

14/17

Obr. 11

Otevřený čtecí rámcec konstruktu fúze IFN-beta G162C-Ig s linkerem G4S

1 ATGCCTGGAAAGATGGTCCGATCCTTGAGGCCAAATACTTGGATAATGTTTGCA 60  
M P G K M V V I L G A S N I L W I M F A  
  
61 GCTTCTCAAGCCATGAGCTACAACTTGGATTCCTACAAAGAACGCAATTTCAG 120  
A S Q A M S Y N L L G F L Q R S S N F Q  
  
121 TGTCAAGGCTCCCTGGCAATTGGAATGGGAGGGCTTGAATACTGCCTCAAGGGATG 180  
C Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R M  
  
181 AACTTTGACATCCCTGAGGAGATAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGACGGCGCA 240  
N F D I P E E I K Q L Q F Q K E D A A  
  
241 TTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTGCTATTTCAGACAAGATTCATCTAGC 300  
L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S  
  
301 ACTGGCTGGAATGAGACTATTGAGACCTCCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAAC 360  
T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I N  
  
361 CATCTGAAGACAGTCCTGGAAGAAAATGGAGAAAGAGATTCCACGGGGAAACTC 420  
H L K T V L E E K L E D F T R G K L

Obr. 11A

17.07.01

PV 2007-1330

15/17

421 ATGAGCAGTCTGCACCTGAAAGATATTGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAG 480  
M S S L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K

481 GAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATACTCAGACTGGAAATCCTAAGGAACCTTTACTTC 540  
E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F

541 ATTACAGACTTACATGTTACCTCCGAAACGGCGGTGGTGGCAGCGTCAACTAAACTCAC 600  
I N R L T C Y L R N G G G S V D K T H

601 ACATGCCAACCGTAGCACCTGAACTCCTGGGGACCGTCAAGTCTTCTCTCCCC 660  
T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P

661 CCAAACCCAACGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG 720  
P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V

721 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCACACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG 780  
D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V

781 CATAATGCCAACGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGGTACCGTGGTCAGC 840  
H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S

841 GTCTCACCGTCCCTGCACCGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCC 900  
V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S

901 AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA 960  
N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R

Obr. 11B

17.07.01

PV 2001-1330

16/17

961 GAACCAACGGTGTACACCCCTGCCCATCCCCGATGAGCTGACCAAGAACCGGTCAGC 1020  
E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S

1021 CTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCCTCTATCCCAGCGACATGCCGTTGGAGTGGAGAGCAAT 1080  
L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N

1081 GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAACCCACGCCTCCCGTTGGACTCCGACGGCTCCRTC 1140  
G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F

1141 TTCTCTACAGCAAGGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACCGTCTCTCA 1200  
F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S

1201 TGCTCCGTGATGAGGCTCTGCACAAACCACTACACCCAGAAGAGGCTCTCCCTGTCT 1260  
C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S

1261 CCCGGAAATGA 1272  
P G K \*

Obr. 11C

17.07.01

PV 2001-1330

17/17

Obr. 12

