



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 31 507 T2 2007.01.11

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 121 382 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 31 507.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/24200

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 956 574.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/023472

(86) PCT-Anmeldetag: 15.10.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 27.04.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 08.08.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 24.05.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 11.01.2007

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C07K 14/565 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

104491 P 16.10.1998 US

120237 P 16.02.1999 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Biogen Idec MA Inc., Cambridge, Mass., US

(72) Erfinder:

WHITTY, Adrian, Hopkinton, MA 01748, US;  
RUNKEL, Laura, Cambridge, MA 02139, US;  
BRICKELMAIER, Margot, Boxford, MA 01921, US;  
HOCHMAN, Paula, Newton, MA 02459, US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: INTERFERON-BETA FUSIONSPROTEINE UND DEREN VERWENDUNGEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die Verwendung von Polypeptiden und Proteinen für die systemische Behandlung von bestimmten Krankheiten wird jetzt in der medizinischen Praxis völlig akzeptiert. Die Rolle, die diese Substanzen in der Therapie spielen, ist so wichtig, dass viele Forschungsaktivitäten in Richtung der Synthese von großen Mengen durch rekombinante DNA-Technologie gelenkt werden. Viele dieser Polypeptide sind endogene Moleküle, die sehr wirksam und spezifisch im Hervorrufen ihrer biologischen Aktivitäten sind.

**[0002]** Ein Hauptfaktor, der die Nützlichkeit dieser proteinösen Substanzen für ihre beabsichtigte Anwendung limitiert, ist dass sie vom Körper innerhalb einer kurzen Zeit eliminiert werden, wenn sie parenteral gegeben werden. Dies kann als ein Ergebnis des Metabolismus durch Proteasen oder durch Beseitigung unter Verwendung von normalen Signalwegen für die Protein-Eliminierung wie durch Filtration in den Nieren erfolgen. Die Probleme, die mit diesen Wegen der Verabreichung von Proteinen assoziiert sind, sind in der pharmazeutischen Industrie wohlbekannt, und verschiedene Strategien zu ihrer Lösung sind in Versuchen angewendet worden.

**[0003]** Eine Peptidfamilie, auf die das Augenmerk klinischer Arbeit und Bemühungen, ihre Verabreichung und biologische Assimilation zu verbessern gerichtet war, sind die Interferone. Interferone sind in einer Vielzahl von klinischen Krankheitsstadien getestet worden. Die am besten etablierte Verwendung von menschlichem Interferon-beta, einem Mitglied jener Familie, ist die Behandlung von multipler Sklerose. Zwei Formen von rekombinantem Interferon-beta sind vor kurzem in Europa und den Vereinigten Staaten für die Behandlung dieser Krankheit lizenziert worden. Eine Form ist Interferon-beta-1a (verkauft unter dem Warenzeichen AVONEX®, mfg. Biogen, Inc., Cambridge, MA) und hierin nachstehend mit „Interferon-beta-1a“ oder „IFN-beta-1a“ oder „IFN-β-1a“ oder „Interferon-β-1a“ austauschbar verwendet. Die andere Form ist Interferon-beta-1b (verkauft unter der Handelsmarke BETASERON®, Berlex, Richmond, CA), hierin nachstehend „Interferon-beta-1b“. Interferon-beta-1a wird in Säugerzellen unter Verwendung der natürlichen menschlichen Gensequenz produziert und ist glycosyliert, wohingegen Interferon-beta-1b in *E. coli*-Bakterien unter Verwendung einer modifizierten menschlichen Gensequenz produziert wird, die eine gentechnisch eingebrachte Cystein-zu-Serin-Substitution an der Aminosäureposition 17 enthält und nicht glycosyliert ist.

**[0004]** Vor kurzem haben einige von uns die relativen *in vitro*-Wirksamkeiten von Interferon-beta-1a und Interferon-beta-1b in funktionellen Tests direkt verglichen und gezeigt, dass die spezifische Aktivität von Interferon-beta-1a ungefähr 10-mal größer ist als die spezifische Aktivität von Interferon-beta-1b (Runkel et al., 1998, Pharm. Res. 15: 641-649). Von Untersuchungen, die gestaltet wurden, um die strukturelle Basis für jene Aktivitäts-Unterschiede zu identifizieren, identifizierten wir die Glycosylierung als die einzige der bekannten strukturellen Unterschiede zwischen den Produkten, die die spezifische Aktivität beeinflusste. Die Wirkung des Kohlenhydrats war großteils durch seine stabilisierende Rolle auf die Struktur manifestiert. Die stabilisierende Wirkung des Kohlenhydrats wurde in Hitzedenaturierungs-Experimenten und SEC-Analyse offensichtlich. Das Fehlen einer Glycosylierung war auch mit einem Anstieg der Aggregation und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Hitzedenaturierung korreliert. Enzymatisches Entfernen des Kohlenhydrats von Interferon-beta-1a mit PNGase F verursachte eine erhebliche Ausfällung des deglycosylierten Produkts.

**[0005]** Diese Studien weisen darauf hin, dass sie trotz der Konservierung in der Sequenz zwischen Interferon-beta-1a und Interferon-beta-1 b verschiedene biochemische Einheiten sind und daher vieles, das über Interferon-beta-1b bekannt ist, nicht auf Interferon-beta-1a angewendet werden kann und umgekehrt.

**[0006]** WO 97/24137 beschreibt ein Hybrid mit Interferon- $\alpha$  und einem Immunglobulin-Fc, verknüpft durch ein nicht-immunogenes Peptid. WO 83/02461 beschreibt Hybrid-Interferone. Santillan et al; 1992, Mol. Cell. Biochem. 110, 181-191 beschreibt ein Hybridprotein, das aus menschlichem IFN-beta besteht, fusioniert an PDGF. EP-A 2 0 225 579 beschreibt Verbindungen, die zwei kovalent verbundene Polypeptid-Zell-Modulatoren, einschließlich IFN-alpha oder -beta umfassen.

**ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG**

**[0007]** Wir haben die Vorteile von glycosyliertem Interferon-beta im Vergleich zu nicht-glycosylierten Formen ausgewertet. Insbesondere haben wir eine Interferon-beta-1a-Zusammensetzung mit erhöhter Aktivität im Vergleich zu Interferon-beta-1b entwickelt, die auch die günstigen Eigenschaften von Fusionsproteinen im Allgemeinen ohne effektiven Verlust der Aktivität im Vergleich zu Interferon-beta-1b-Formen, die keine Fusionspro-

teine sind, aufweist. Daher können, wenn Modifikationen auf eine solche Weise gemacht werden, dass die Produkte (Interferon-beta-1a-Fusionsproteine) alle oder die meisten ihrer biologischen Aktivitäten beibehalten, die folgenden Eigenschaften resultieren: veränderte Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, die zu erhöhter Halbwertszeit und Veränderungen in der Gewebe-Verteilung (z.B. der Fähigkeit, für längere Zeiträume in den Gefäßen zu bleiben) führen. Eine solche Formulierung ist ein wesentlicher Fortschritt auf den pharmazeutischen und medizinischen Fachgebieten und würde einen signifikanten Beitrag zum Management von verschiedenen Krankheiten leisten, in denen Interferon eine gewisse Nützlichkeit hat, wie multiple Sklerose, Fibrose und andere entzündliche oder Autoimmunkrankheiten, Karzinome, Hepatitis und andere virale Krankheiten und Krankheiten, die durch Neovaskularisierung charakterisiert sind. Insbesondere ermöglicht die Fähigkeit des Interferon-beta-1a, für längere Zeiträume in den Gefäßen zu verbleiben, die Verwendung zur Inhibierung der Angiogenese und möglicherweise die Blut-Hirn-Schranke zu kreuzen.

**[0008]** Insbesondere betrifft die Erfindung ein Polypeptid, das die Aminosäuresequenz X-Y-Z aufweist, worin X ein Polypeptid ist, das die Aminosäuresequenz aufweist, die aus den Aminosäuresequenzen einer Interferon-beta-Mutante besteht, die aus der Gruppe ausgewählt wurde, die aus IFN- $\beta$ -Mutanten besteht, die in Tabelle 1 als A1, B1, C1, CD1 und CD2 dargelegten Aminosäuresequenz aufweisen, Y ist ein optionaler Linker und Einheit; und Z ist ein Polypeptid, das mindestens einen Teil eines anderen Polypeptids als Interferon-beta umfasst, in dem der Teil ein Teil einer konstanten Region eines Immunglobulins ist und von einem Immunglobulin der Klasse, die von IgM, IgG, IgD, IgA und IgE ausgewählt wurde, stammen kann. Wenn die Klasse IgG ist, dann wird es von einem von IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 ausgewählt. Die konstante Region von menschlichem IgM und IgE enthält 4 konstante Regionen (CH1, (Gelenk), CH2, CH3 und CH4), wohingegen die konstante Region von menschlichem IgG, IgA und IgD 3 konstante Regionen (CH1, (Gelenk), CH2) und CH3) enthält. In den am meisten bevorzugten Fusionsproteinen der Erfindung enthält die konstante Region zumindest die Gelenks-, CH2- und CH3-Domänen.

**[0009]** Die optionale Einheit V und die erforderliche Einheit Z können entweder an den N- oder den C-Terminus von Interferon-beta (X) gebunden sein. Vorzugsweise ist X das menschliche Interferon-beta-1a. Die Erfindung beschreibt auch, dass die Einheit Z zu mindestens ein Teil eines Polypeptids ist, das Immunglobulin-ähnliche Domänen enthält. Beispiele von solchen anderen Polypeptiden schließen CD1, CD2, CD4 und Mitglieder der Klasse I- und Klasse II-Haupthistokompatibilitäts-Antigene ein.

**[0010]** Eine andere Ausführungsform der Erfindung ist ein Fusionsprotein, das eine Amino-terminale Region aufweist, die aus der Aminosäuresequenz einer Interferon-beta-Mutante besteht, die aus der Gruppe ausgewählt wurde, die aus IFN- $\beta$ -Mutanten besteht, die die in Tabelle 1 als A1, B1, C1, CD1 und CD2 dargelegte Aminosäuresequenz aufweisen und eine Carboxy-terminale Region aufweisen, die mindestens einen Teil eines anderen Proteins als Interferon-beta umfasst, wobei der Teil zu mindestens ein Teil einer konstanten Region eines Immunglobulins ist, das von einem Immunglobulin der Klasse stammt, die von IgM, IgG, IgD, IgA und IgE ausgewählt wurde. In den am meisten bevorzugten Fusionsproteinen enthält die konstante Region mindestens die Gelenks-, CH2- und CH3-Domänen.

**[0011]** Wie oben beschrieben, betrifft die vorliegende Erfindung ein Fusionsprotein, dessen Interferon-beta-Einheit (z.B. X in der Formel oben) mutiert worden ist, um Muteine mit selektiv verstärkter antiviraler und/oder antiproliferativer Aktivität oder anderen vorteilhaften Eigenschaften im Vergleich zu nicht-mutierten Formen von Interferon-beta-1a bereitzustellen.

**[0012]** Noch eine andere Ausführungsform der Erfindung ist eine DNA, die die Fusionsproteine codiert, die oben beschrieben sind. Die Erfindung betrifft auch eine rekombinante DNA, die eine DNA umfasst, die die oben beschriebenen Fusionsproteine und eine Expressions-Kontrollsequenz codiert, worin die Expressions-Kontrollsequenz funktionell mit der DNA verknüpft ist. Der Rahmen der Erfindung schließt auch Wirtszellen ein, die mit den rekombinanten DNA-Sequenzen der Erfindung transformiert sind.

**[0013]** Die Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Polypeptids der Erfindung, umfassend: Bereitstellen einer Population von Wirtszellen gemäß der Erfindung; Anzüchten der Population von Zellen unter Bedingungen, durch die das Polypeptid, das durch die rekombinante DNA codiert wird, exprimiert wird; und Isolieren des exprimierten Polypeptids.

**[0014]** Noch ein anderer Aspekt der Erfindung ist ein Arzneimittel, das eine therapeutisch wirksame Menge eines Fusionsproteins, wie hierin beschreiben, umfasst.

**[0015]** Noch ein anderer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung der hierin beschriebenen Fusionsproteine

für die Herstellung eines Medikaments für die Inhibierung von Angiogenese und Neovaskularisierung.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

**[0016]** [Fig. 1](#). cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz einer Histidin-markierten Interferon-beta-Fusion (auch „his-IFN-beta“ oder „His<sub>6</sub>-markiert“ genannt). Die vollständigen DNA- und Proteininsequenzen des his-IFN-beta-1 sind gezeigt. Die gespaltene VCAM-1-Signalsequenz hinterlässt 3 Amino-terminale Reste (SerGlyGly) stromaufwärts der Histidin-Markierung (His<sub>6</sub>, Positionen 4-9). Die Enterokinassen-Linkersequenz (AspAspAspAspLys) ist durch einen Spacer (Positionen 10-12, SerSerGly) von der Histidin-Markierung getrennt. Die natürliche IFN-beta-1a-Proteininsequenz umspannt die Positionen (Met18-Asn183).

**[0017]** [Fig. 2](#). cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz für eine Interferon-beta-1a/Fc-Fusion. Die vollständigen DNA- und Proteininsequenzen des menschlichen IFN-beta-1a/Maus-Fc sind gezeigt. Die menschlichen IFN-beta-1a-Proteininsequenzen umspannen die Aminosäure-Reste 1-166 (DNA-Sequenzen 1-498). Die Enterokinase-Linkersequenz umspannt die Aminosäurereste 167-171 (DNA-Sequenzen 499-513). Die Proteininsequenz der murinen schweren IgG2a-Kette umspannt die Reste 172-399 (DNA-Sequenzen 514-437).

**[0018]** [Fig. 3](#). Bindung von Alanin-substituierten Interferon-beta-Mutanten an ein dimeres Fusionsprotein, das die extrazelluläre Domäne der Typ I-Interferon-Rezeptorkette, IFNAR2/Fc, umfasst. Die Bindungsaffinitäten der Alanin-substituierten IFN-Mutanten (A1-E) für die IFNAR2-Rezeptorkette wurden bestimmt, wie im Beispiel 1 beschrieben (Unterabschnitt D). Das Histogramm zeigt ihre Bindungsaffinitäten in diesem Test im Vergleich zum Wildtyp-his-IFN-beta (% W.t.). Die % W.t.-Werte wurden als die (Affinität von Wildtyp-his-IFN-beta)/(Affinität des mutanten IFN-beta) × 100 berechnet. Die % W.t. (x) für mehrere Tests (n = 3) und die durchschnittlichen % W.t. (x) für die experimentelle Reihe sind gezeigt. Die Mutanten A2, AB1, AB2 und E haben in Konzentrationen, die 500-fach höher waren als das W.t.-his-IFN-beta EC 50 (\*), IFNAR2/Fc nicht gebunden.

**[0019]** [Fig. 4](#). Bindung von Alanin-substituierten Interferon-beta-Mutanten an die Typ I-Interferon-Zelloberflächen-Rezeptorkomplexe ("IFNAR1/2-Komplex"), die auf Daudi-Burkitt-Lymphomzellen exprimiert werden. Die Rezeptor-Bindungseigenschaften der Alanin-substituierten Mutanten (A1-E) wurden unter Verwendung eines FACS-basierenden Zelloberflächen-Rezeptorbindungstests bestimmt, wie im Beispiel 1 beschrieben (Unterabschnitt D). Das Histogramm zeigt ihre Rezeptor-Bindungsaffinitäten in diesem Test im Vergleich zum Wildtyp-his-IFN-beta (% W.t.). Die % W.t. für jede Mutante wurden als (Affinität des W.t.-his-IFN-beta)/(Affinität des mutanten IFN-beta) × 100 berechnet. Die % W.t.-Werte (o) von mehreren Tests unter dem Histogramm und ein Durchschnitt der % W.t.-Werte für die experimentelle Reihe (x) sind gezeigt.

**[0020]** [Fig. 5](#). Antivirale Aktivitäten von Alanin-substituierten Interferon-beta-Mutanten.

**[0021]** Die antiviralen Aktivitäten der Alanin-substituierten Mutanten (A1-E) wurden auf menschlichen A549-Zellen bestimmt, die mit EMC-Virus herausgefordert wurden, wie im Beispiel 1 (Unterabschnitt E) beschrieben. Das Histogramm zeigt ihre Aktivitäten in diesem Test im Vergleich zum Wildtyp-his-IFN-beta (% W.t.). Die % W.t. wurden als der Kehrwert der Konzentration von mutantem IFN-beta (50% cpe)/Konzentration von W.t.-his-IFN-beta (50% cpe) × 100 berechnet. Die % W.t. (o) für mehrere Tests und der Durchschnitt der experimentellen Datenreihe (x) sind gezeigt.

**[0022]** [Fig. 6](#). Antiproliferative Aktivitäten von Alanin-substituierten Interferon-beta-Mutanten. Die antiproliferative Aktivität der Alanin-Substitutions-Mutanten (A1 -E) wurde auf Daudi-Burkitt-Lymphomzellen bestimmt, wie im Beispiel 1 (Unterabschnitt E) beschrieben. Das Histogramm zeigt ihre Aktivitäten in diesem Test im Vergleich zum Wildtyp-his-IFN-beta (% W.t.). Die % W.t. wurde als die (W.t.-his-IFN-beta-Konzentration (50% Wachstumsinhibition)/mutantes IFN-beta-Konzentration (50% Wachstumsinhibition)) × 100 berechnet. Die % W.t. (o) für mehrere Tests und der Durchschnitt der experimentellen Datenreihe (x) sind gezeigt.

**[0023]** [Fig. 7](#). Relative antivirale und antiproliferative Aktivitäten von Alanin-substituierten Interferon-beta-Mutanten. Die relativen Aktivitäten der Alanin-Substitutions-Mutanten (A1-E) in den antiviralen (x-Achse) und den Antiproliferations (y-Achse)-Tests wurden verglichen. Die durchschnittlichen Prozent Wildtyp-his-IFN-beta (% W.t.(x)), dargestellt in den [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#), wurden für diesen Vergleich verwendet. Jene Mutanten mit einem koordinierten Verlust/Zuwachs der Aktivität würden auf die oder sehr nahe der vertikale(n) Linie fallen. Jene Mutanten, die eine disproportionierten Verlust/Zuwachs in antiviralen oder Antiproliferations-Aktivitäten haben, würden signifikant entfernt der diagonalen Linie fallen (DE1, D, C1). Die Signifikanz wurde durch Inbetrachtziehen der Standardabweichungen, die inhärent in den durchschnittlichen % W.t.-Werten verwendet wurden, bestimmt.

[0024] [Fig. 8](#). Antivirale Aktivität der Interferon-beta-1a/Ig-Fusion.

[0025] Die Aktivität von Interferon-beta-1a (verwendet als AVONEX®) oder der Interferon-beta-1a/murines Ig2a-Fusion in den Konzentrationen, die auf der X-Achse angezeigt werden, wurde in den antiviralen Tests unter Verwendung von menschlichen Lungenkarzinom (A549)-Zellen, die mit EMC-Virus herausgefordert wurden, bewertet. Nach einer zweitägigen Inkubation mit dem Virus wurden die lebensfähigen Zellen mit MTT gefärbt, die Platten wurden bei 450 nm abgelesen, und das Absorptionsvermögen, das die Lebensfähigkeit der Zellen reflektiert, ist auf der Y-Achse gezeigt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken gezeigt. Die Konzentration von Interferon-beta-1a (verwendet als AVONEX®-Massen-Zwischenprodukt), die (50% maximale OD450) und daher 50% virale Tötung (die „50% cytopathische Wirkung“) bot, war etwa 0,4 pM und die 50% cytopathische Wirkung für die Interferon-beta-1a-Fusion war etwa 0,15 pM.

[0026] [Fig. 9](#). Messungen der antiviralen Aktivität von Interferon-beta im Plasma von Mäusen, die mit Interferon-beta-1a/Fc-Fusion oder Interferon-beta-1a behandelt wurden.

[0027] Die Mäuse werden iv mit entweder 50 000 Einheiten Interferon-beta-1a (verwendet als AVONEX® Massen-Zwischenprodukt) oder 50 000 Einheiten Interferon-beta-1a/Fc-Fusion injiziert. Blut von diesen Mäusen wird durch retro-orbitale Blutentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Interferon-Injektion, wie auf der X-Achse angezeigt, erhalten. Es werden mindestens 3 Mäuse zu jedem Zeitpunkt Blut entnommen, und Plasma wird hergestellt und eingefroren, bis zum Zeitpunkt, an dem die Interferon-beta-Aktivität in antiviralen Tests unter Verwendung von menschlichen Lungenkarzinom (A549)-Zellen, die mit dem Encephalomyocarditis-Virus herausgefordert wurden, bewertet wird. Lebensfähige Zellen wurden mit einer Lösung von MTT gefärbt, die Platten wurden bei 450 nm abgelesen, um die Absorptionsfähigkeit zu bestimmen, die die Lebensfähigkeit der Zellen und die Interferon-beta-Aktivität reflektiert. Standardkurven wurden für jede Platte unter Verwendung von Interferon-beta-1a als AVONEX® hergestellt und verwendet, um die Menge an Interferon-beta-Aktivität in jeder Probe zu bestimmen. Die Daten von den individuellen Tieren sind gezeigt.

[0028] [Fig. 10](#). Vollständige DNA- und Proteinsequenzen der offenen Leserahmen einer direkten Fusion von menschlichem IFN-beta und menschlichem IgG1Fc (ZL5107).

[0029] [Fig. 11](#). Vollständige DNA- und Proteinsequenzen des offenen Leserahmens eines Fusionsproteins, das aus menschlichem IFN-beta/G4S-Linker/menschlichem IgG1 FC (ZL6206) besteht.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0030] Die folgenden Begriffe werden hierin verwendet:

##### 1. Definitionen

[0031] Interferon- Ein „Interferon“ (auch als „IFN“ bezeichnet) ist ein kleines, Spezies-spezifisches, einzelketiges Polypeptid, das durch Säugerzellen als Antwort auf das Aussetzen einer Vielzahl von Auslösern wie Viren, Polypeptiden, Mitogenen und dergleichen produziert wird. Das am meisten bevorzugte Interferon, das in der Erfindung verwendet wird, ist ein glycosyliertes, menschliches Interferon-beta, das am Rest 80 (Asn 80) glycosyliert ist und das vorzugsweise durch rekombinante DNA-Techniken abgeleitet wird. Dieses bevorzugte, glycosyierte Interferon-beta wird „Interferon-beta-1a“ (oder „IFN-beta-1a“ oder IFN-β-1a“ oder „Interferon beta 1a“ oder „Interferon-beta-1a“ oder Interferon-β-1a“, alle austauschbar verwendet) genannt. Der Begriff „Interferon-beta-1a“ soll auch alle mutanten Formen (d.h. Beispiel 1) umspannen, vorausgesetzt, dass die Mutanten auch am Asn 80-Rest glycosyliert sind.

[0032] Rekombinante DNA-Verfahren für das Produzieren von Proteinen, einschließlich Interferonen, sind bekannt. Siehe zum Beispiel U.S.-Patente 4,399,216, 5,149,636, 5,179,017 (Axel et al) und 4,470,461 (Kaufman).

[0033] Bevorzugte Interferon-beta-1a-Polynucleotide, die in den vorliegenden Verfahren der Erfindung verwendet werden können, stammen von den Wildtyp-Interferon-beta-Gensequenzen von verschiedenen Vertebraten, vorzugsweise Säugern, und werden unter Verwendung von Verfahren erhalten, die Fachleuten wohlbekannt sind, wie den Verfahren, beschrieben in den folgenden U.S.-Patenten: U.S.-Patent 5,641,656 (ausgestellt am 24. Juni, 1997: DNA encoding avian type I interferon proprotein and mature avian type I interferon), U.S.-Patent 5,605,688 (25. Feb., 1997 – recombinant dog and horse type I Interferons); U.S.-Patent 5,231,176 (27. Jul., 1993, DNA molecules encoding a human leukocyte interferon); U.S.-Patent 5,071,751 (10. Dez.,

1991, DNA sequence coding for sub-sequences of human lymphoblastoid Interferons LyIFN- alpha -2 and LyIFN- alpha -3); U.S.-Patent 4,970,161 (13. Nov., 1990, DNA sequence coding for human interferon-gamma); U.S.-Patent 4,738,931 (19. Apr., 1988, DNA containing a human interferon beta gene); U.S.-Patent 4,695,543 (22. Sep., 1987, human alpha-interferon Gx-1 gene und U.S.-Patent 4,46,748 (26. Jun., 1984, DNA encoding sub-sequences of different, naturally, occurring leukocyte Interferons).

**[0034]** Mutanten von Interferon-beta-1a können gemäß dieser Erfindung verwendet werden. Mutationen werden unter Verwendung von konventionellen Verfahren der direkten Mutagenese, die Fachleuten bekannt sind, entwickelt. Darüber hinaus liefert die Erfindung funktionell äquivalente Interferon-beta-1a-Polynucleotide, die funktionell äquivalente Interferon-beta-1a-Polypeptide codieren.

**[0035]** Ein erstes Polynucleotid, das Interferon-beta-1a codiert, ist „funktionell äquivalent“ im Vergleich zu einem zweiten Polynucleotid, das Interferon-beta-1a codiert, wenn es zu mindestens einer der folgenden Bedingungen erfüllt:

- (a): das „funktionelle Äquivalent“ ist ein erstes Polynucleotid, das an das zweite Polynucleotid unter Standard-Hybridisierungsbedingungen hybridisiert und/oder zu der ersten Polynucleotidsequenz degeneriert ist. Am bevorzugtesten codiert es ein mutantes Interferon, das die [therapeutische] Aktivität eines Interferon-beta-1a aufweist;
- (b) das „funktionelle Äquivalent“ ist ein erstes Polynucleotid, das bei Expression eine Aminosäuresequenz codiert, die durch das zweite Polynucleotid codiert wird.

**[0036]** Zusammengefasst schließt der Begriff „Interferon“ die oben aufgelisteten Mittel so wie deren funktionelle Äquivalente ein, ist aber nicht darauf limitiert. Wie hierin verwendet, bezeichnet der Begriff „funktionelles Äquivalent“ daher ein Interferon-beta-1a-Protein oder ein Polynucleotid, das das Interferon-beta-1a-Protein, das dieselbe oder eine verbesserte günstige Wirkung auf den Säuger-Empfänger hat wie das Interferon, von dem es als ein funktionelles Äquivalent angesehen wird, codiert. Wie von einem Fachmann anerkannt wird, kann ein funktionell äquivalentes Protein durch rekombinante Techniken, z.B. durch Exprimieren einer „funktionell äquivalenten DNA“ produziert werden. Dementsprechend behandelt die vorliegende Erfindung Interferon-beta-1a-Proteine, die codiert werden durch natürlich vorkommende DNAs so wie durch nicht-natürlich vorkommende DNAs, die dasselbe Protein codieren wie es durch die natürlich vorkommende DNA codiert wird. Aufgrund der Degeneriertheit der Nucleotid-codierenden Sequenzen können andere Polynucleotide verwendet werden, um Interferon-beta-1a zu codieren. Diese schließen die gesamten oder Teile der obigen Sequenzen ein, die durch die Substitution von verschiedenen Codons, die denselben Aminosäurerest innerhalb der Sequenz codieren, verändert sind, was so einen stillen Austausch produziert. Solche veränderten Sequenzen werden als Äquivalente dieser Sequenzen angesehen. Zum Beispiel wird Phe (F) durch zwei Codons, TTC oder TTT codiert, Tyr (Y) wird durch TAC oder TAT codiert und His (H) wird durch CAC oder CAT codiert. Auf der anderen Seite wird Trp (W) durch ein einziges Codon, TGG, codiert. Dementsprechend wird anerkannt werden, dass es für eine gegebene DNA-Sequenz, die ein bestimmtes Interferon codiert, viele degenerierte DNA-Sequenzen geben wird, die sie codieren werden. Diese degenerierten DNA-Sequenzen werden als im Rahmen dieser Erfindung angesehen.

**[0037]** „Fusion“- bezeichnet eine co-lineare, kovalente Bindung von zwei oder mehreren Proteinen oder Fragmenten davon durch ihre individuellen Peptidgerüste, am bevorzugtesten durch genetische Expression eines Polynucleotidmoleküls, das jene Proteine codiert. Es wird bevorzugt, dass die Proteine oder Fragmente davon von verschiedenen Quellen stammen. So schließen bevorzugte Fusionsproteine ein Interferon-beta-1a-Protein oder ein Fragment ein, das kovalent an eine zweite Einheit gebunden ist, die kein Interferon ist. Insbesondere ist eine „Interferon-beta/Ig-Fusion“ ein Protein, das ein Interferon-beta-Molekül der Erfindung (d.h. Interferon-beta-1a) oder ein Fragment davon umfasst, dessen N-Terminus oder C-Terminus an einen N-Terminus einer Immunglobulin-Kette gebunden ist, worin ein Teil des N-Terminus des Immunglobulins durch das Interferon-beta ersetzt ist. Eine Art von Interferon-beta/Ig-Fusion ist eine „Interferon-beta/Fc-Fusion“, die ein Protein ist, das ein Interferon-beta-Molekül der Erfindung (d.h. Interferon-beta-1a) umfasst, das zumindest an einen Teil der konstanten Domäne eines Immunglobulins gebunden ist. Eine bevorzugte Fc-Fusion umfasst ein Interferon-beta-Molekül der Erfindung, das an ein Fragment eines Antikörpers gebunden ist, der die C-terminale Domäne der schweren Immunglobulin-Ketten enthält.

**[0038]** Der Begriff „Fusionsprotein“ bedeutet auch ein Interferon-beta-Protein, das durch ein mono- oder heterofunktionelles Molekül chemisch an eine zweite Einheit gebunden ist, die kein Interferon-beta-Protein ist und das de novo von einem aufgereinigten Protein hergestellt wird, wie unten beschrieben.

**[0039]** „Rekombinant“, wie hierin verwendet, bedeutet, dass ein Protein von rekombinanten Säuger-Expres-

sionssystemen stammt. Protein, das in den meisten bakteriellen Kulturen, z.B. E. coli, exprimiert wird, wird frei von Glykan sein, daher werden diese Expressionssysteme nicht bevorzugt. Protein, das in Hefe exprimiert wird, kann Oligosaccharid-Strukturen aufweisen, die verschieden von jener sind, die in Säugerzellen exprimiert wird.

**[0040]** „Biologisch aktiv“, wie es im Verlauf der Beschreibung als ein Charakteristikum von Interferon-beta-1a verwendet wird, bedeutet, dass ein bestimmtes Molekül eine ausreichende Aminosäuresequenz-Homologie mit den hierin offenbarten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung teilt, um zu antiviraler Aktivität in der Lage zu sein, wie in einem in vitro-antiviralen Test des Typs, wie in dem nachstehenden Beispiel 1 beschrieben, gezeigt wurde.

**[0041]** Eine „therapeutische Zusammensetzung“, wie hierin verwendet, wird definiert, als die Proteine der Erfindung und andere physiologisch kompatible Bestandteile umfassend. Die therapeutische Zusammensetzung kann Arzneistoffträger wie Wasser, Mineralien und Träger wie Protein enthalten.

**[0042]** „Aminosäure“- eine monomere Einheit eines Peptids, Polypeptids oder eines Proteins. Es gibt zwanzig Aminosäuren, die in natürlich vorkommenden Peptiden, Polypeptiden und Proteinen gefunden werden, alle von ihnen sind L-Isomere. Der Begriff schließt auch Analoge der Aminosäuren und D-Isomere der Protein-Aminosäuren und ihrer Analoge ein.

**[0043]** Eine „derivatisierte“ Aminosäure ist eine natürliche oder nicht-natürliche Aminosäure, in der die normalerweise vorkommende Seitenkette oder Endgruppe (oder eine Zuckereinheit im Fall von Interferon-beta-1a) durch eine chemische Reaktion modifiziert ist. Solche Modifikationen schließen zum Beispiel gamma-Carboxylierung, beta-Carboxylierung, Pegylierung, Sulfatierung, Sulfonierung, Phosphorylierung, Amidierung, Veresterung, N-Acetylierung, Carbobenzylierung, Tosylierung und andere Modifizierungen ein, die auf dem Fachgebiet bekannt sind. Ein „derivatisiertes Polypeptid“ ist ein Polypeptid, das eine oder mehrere derivatisierte Aminosäure(n) und/oder einen oder mehrere derivatisierte Zucker, wenn das Polypeptid glycosyliert ist, enthält.

**[0044]** „Protein“- jedes Polymer, das im Wesentlichen aus irgendwelchen der 20 Aminosäuren besteht. Obwohl „Polypeptid“ oft im Bezug auf relativ große Polypeptide verwendet wird und „Peptid“ oft im Bezug auf kleine Polypeptide verwendet wird, überlappt und variiert die Verwendung dieser Begriffe auf dem Fachgebiet. Der Begriff „Protein“, wie hierin verwendet, betrifft Peptide, Proteine und Polypeptide, außer wenn es anderweitig angemerkt ist.

**[0045]** Ein „funktionelle Äquivalent“ eines Aminosäure-Rests ist eine Aminosäure, die ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie der Aminosäure-Rest aufweist, der durch das funktionelle Äquivalent ersetzt wurde.

**[0046]** „Mutant“- jede Änderung im genetischen Material eines Organismus, besonders jede Änderung (d.h. Deletion, Substitution, Addition oder Veränderung) in einer Wildtyp-Polynucleotidsequenz oder jede Änderung in einem Wildtyp-Protein. Der Begriff „Mutein“ wird austauschbar mit „Mutant“ verwendet.

**[0047]** „Wildtyp“- die natürlich vorkommende Polynucleotidsequenz eines Exons eines Proteins oder eines Teils davon beziehungsweise einer Proteinsequenz oder eines Teils davon, wie sie normalerweise in vivo kommt.

**[0048]** „Standard-Hybridisierungsbedingungen“- Salz- und Temperaturbedingungen, die im Wesentlichen äquivalent sind zu  $0,5 \times SSC$  bis etwa  $5 \times SSC$  und  $65^\circ C$  sowohl für die Hybridisierung als auch das Waschen. Der Begriff „Standard-Hybridisierungsbedingungen“, wie hierin verwendet, ist daher eine operative Definition und umspannt einen Bereich von Hybridisierungsbedingungen. Höhere Stringenzbedingungen können zum Beispiel Hybridisieren mit Plaquescreen-Puffer ( $0,2\%$  Polyvinylpyrrolidon,  $0,2\%$  Ficoll 400;  $0,2\%$  Rinderserumalbumin,  $50\text{ mM}$  Tris-HCl (pH 7,5);  $1\text{ M}$  NaCl;  $0,1\%$  Natriumpyrophosphat;  $1\%$  SDS);  $10\%$  DextranSulfat und  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  denaturierte, bestrahlte Lachssperma-DNA bei  $65^\circ C$  für 12-20 Stunden und Waschen mit  $75\text{ mM}$  NaCl/ $7,5\text{ mM}$  Natriumcitrat ( $0,5 \times SSC$ )/ $1\%$  SDS bei  $65^\circ C$  einschließen. Niedrigere Stringenzbedingungen können zum Beispiel Hybridisieren mit Plaquescreen-Puffer,  $10\%$  DextranSulfat und  $110\text{ }\mu\text{g/ml}$  denaturierte, bestrahlte Lachssperma-DNA bei  $55^\circ C$  für 12-20 Stunden und Waschen mit  $300\text{ mM}$  NaCl/ $30\text{ mM}$  Natriumcitrat ( $2,0 \times SSC$ )/ $1\%$  SDS bei  $55^\circ C$  einschließen. Siehe auch Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. New York, Abschnitte 6.3.1-6.3.6, (1989).

[0049] "Expressions-Kontrollsequenz"- eine Sequenz von Polynucleotiden, die die Expression von Genen kontrolliert und reguliert, wenn sie funktionell mit jenen Genen verknüpft ist.

[0050] „Funktionell verknüpft"- eine Polynucleotidsequenz (DNA, RNA) ist funktionell mit einer Expressions-Kontrollsequenz verknüpft, wenn die Expressions-Kontrollsequenz die Transkription und Translation jener Polynucleotidsequenz kontrolliert und reguliert. Der Begriff „funktionell verknüpft" schließt das Aufweisen eines geeigneten Startsignals (z.B. ATG) vor der Polynucleotidsequenz, die exprimiert werden soll, und Beibehalten des korrekten Leserahmens, um die Expression der Polynucleotidsequenz unter der Kontrolle der Expressions-Kontrollsequenz zu ermöglichen, und die Produktion des erwünschten Polypeptid, das durch die Polynucleotidsequenz codiert wird, ein.

[0051] „Expressionsvektor"- ein Polynucleotid wie ein DNA-Plasmid oder ein Phage (unter anderen üblichen Beispielen), das/der die Expression von mindestens einem Gen erlaubt, wenn der Expressionsvektor in eine Wirtszelle eingebracht wird. Der Vektor kann in der Lage sein, sich in einer Zelle zu replizieren, oder nicht.

[0052] „Isoliert" (austauschbar mit „im Wesentlichen rein" verwendet)- wenn auf eine Nucleinsäure, d.h. Polynucleotidsequenzen, die Polypeptide codieren, angewendet, bedeutet eine RNA oder ein DNA-Polynucleotid, einen Teil eines genomischen Polynucleotids, eine cDNA oder ein synthetisches Polynucleotid, die/der/das aufgrund ihres/seines Ursprungs oder durch Manipulation: (i) nicht mit dem gesamten Polynucleotid assoziiert ist, mit dem es in der Natur assoziiert ist (z.B. in einer Wirtszelle als ein Expressionsvektor oder ein Teil davon vorhanden ist); oder (ii) mit einer Nucleinsäure oder einer anderen chemischen Einheit als jener, mit der sie/er/es in der Natur verknüpft ist, verknüpft ist; oder (iii) nicht in der Natur vorkommt. Mit „isoliert" wird darüber hinaus eine Polynucleotidsequenz gemeint, die: (i) in vitro durch zum Beispiel eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert wird; (ii) chemisch synthetisiert wird; (iii) rekombinant durch Clonierung produziert wird; oder (iv) durch Spaltung und Gel-Auftrennung aufgereinigt wird.

[0053] Daher ist eine „im Wesentlichen reine Nucleinsäure" eine Nucleinsäure, die nicht unmittelbar benachbart zu einer oder beiden der codierenden Sequenzen) ist, zu der/denen sie normalerweise im natürlich vorkommenden Genom des Organismus, von dem die Nucleinsäure stammt, benachbart ist. Eine im Wesentlichen reine DNA schließt eine rekombinante DNA ein, die ein Teil eines Hybridgens ist, das zusätzliche Sequenzen codiert.

[0054] „Isoliert" (austauschbar mit „im Wesentlichen rein" verwendet)- wenn auf Polypeptide angewendet, bedeutet ein Polypeptid oder ein Teil davon, das/der aufgrund seines Ursprungs oder durch Manipulation: (i) in einer Wirtszelle als das Expressionsprodukt eines Teils eines Expressionsvektors vorhanden ist; oder (ii) mit einem Protein oder einer anderen chemischen Einheit verknüpft ist als jener, mit der es in der Natur verknüpft ist; oder (iii) nicht in der Natur vorkommt. Mit „isoliert" wird darüber hinaus ein Protein gemeint, das: (i) chemisch synthetisiert wird; oder (ii) in einer Wirtszelle exprimiert und von assoziierten Proteinen befreit aufgereinigt wird. Der Begriff bedeutet im Allgemeinen ein Polypeptid, das von anderen Proteinen und Nucleinsäuren, mit denen es natürlicherweise vorkommt, getrennt worden ist. Vorzugsweise wird das Polypeptid auch von Substanzen wie Antikörpern oder Gel-Matrizes (Polyacrylamid), die verwendet werden um es aufzureinigen, getrennt.

[0055] „Heterologer Promotor"- wie hierin verwendet, ist ein Promotor, der natürlicherweise nicht mit einem Gen oder einer aufgereinigten Nucleinsäure assoziiert ist.

[0056] „Homolog"- wie hierin verwendet, ist synonym mit dem Begriff „Identität" und bezeichnet die Sequenzähnlichkeit zwischen zwei Polypeptiden, Molekülen oder zwischen zwei Nucleinsäuren. Wenn eine Position in beiden der zwei verglichenen Sequenzen von derselben Basen- oder Aminosäuren-Monomer-Untereinheit besetzt ist (zum Beispiel, wenn eine Position in jedem der zwei DNA-Moleküle durch Adenin besetzt ist, oder eine Position in jedem der zwei Polypeptide mit einem Lysin besetzt ist), dann sind die entsprechenden Moleküle homolog an dieser Position. Der Prozentsatz der Homologie zwischen zwei Sequenzen ist eine Funktion der Zahl an passenden oder homologen Positionen, die von den zwei Sequenzen geteilt werden, durch die Zahl der verglichenen Positionen  $\times 100$ . Wenn zum Beispiel 6 von 10 Positionen in zwei Sequenzen passend sind oder homolog sind, dann sind die zwei Sequenzen 60% homolog. Als Beispiel teilen die DNA-Sequenzen CTGACT und CAGGTT 50% Homologie (3 der insgesamt 6 Positionen sind passend). Im Allgemeinen wird ein Vergleich angestellt, wenn zwei Sequenzen so angeordnet werden, dass sich eine maximale Homologie ergibt. Eine solche Anordnung kann zum Beispiel unter Verwendung des Verfahrens von Needleman et al., J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970), praktischerweise durch Computerprogramme wie das Align program (DNASTar, Inc.) ausgeführt, bereitgestellt werden. Homologe Sequenzen teilen identische oder ähnliche Aminosäurereste, wobei

ähnliche Reste konservative Substitutionen für oder „erlaubte Punktmutationen“ von entsprechende(n) Aminosäurereste(n) in einer ausgerichteten Bezugssequenz sind. In dieser Hinsicht sind eine „konservative Substitution“ eines Rests in einer Bezugssequenz jene Substitutionen, die physikalisch oder funktionell ähnlich zu den entsprechenden Bezugsresten sind, z.B. die eine ähnliche Größe, Form, elektrische Ladung, chemische Eigenschaften, einschließlich der Fähigkeit, kovalente oder Wasserstoffbrücken-Bindungen zu bilden, oder dergleichen aufweisen. Besonders bevorzugte konservative Substitutionen sind jene, die die Kriterien erfüllen, die für eine „akzeptierte Punktmutation“ in Dayhoff et al., 5: Atlas of Protein Sequence and Structure, 5: Ergänz. 3, Kapitel 22: 354-352, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, D.C. (1978) definiert sind.

**[0057]** Die Begriffe „Polynucleotidsequenz“ und „Nucleotidsequenz“ werden hierin auch austauschbar verwendet.

**[0058]** Die Begriffe „Neovaskularisierung“ und „Angiogenese“ bedeuten in ihrem weitesten Sinn die Rekrutierung von neuen Blutgefäßen. Insbesondere bezeichnet „Angiogenese“ auch die Rekrutierung von neuen Blutgefäßen an einer Tumorstelle.

**[0059]** „IFNAR2“, „IFNAR1“, „IFNAR1/2“ bezeichnen die Proteine, von denen bekannt ist, dass sie den Zelloberflächen-Typ 1-Interferon-Rezeptor bilden. Der extrazelluläre Teil (Ektodomäne)-Teil der IFNAR2-Kette allein kann Interferon-alpha oder -beta binden.

**[0060]** Die Ausführung der vorliegenden Erfindung wird, außer wenn es anderweitig angezeigt ist, konventionelle Techniken der Zellbiologie, Zellkultur, Molekularbiologie, Mikrobiologie, rekombinanter DNA, Protein-Chemie und Immunologie anwenden, die im Bereich des Fachwissens liegen. Solche Techniken sind in der Literatur beschrieben. Siehe zum Beispiel Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage. (Sambrook, Fritsch und Maniatis, Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; DNA Cloning, Bände I und II (D.N. Glover, Hrsg.), 1985; Oligonucleotide Synthesis, (M.J. Gait, Hrsg.), 1984; U.S.-Patent Nr. 4,683,195 (Mullis et al.); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames und S.J. Higgins, Hrsg.), 1984; Transcription and Translation (B.D. Hames und S.J. Higgins, Hrsg.), 1984; Culture of Animal Cells (R.I. Freshney, Hrsg.). Alan R. Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1986; A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal), 1984; Methods in Enzymology, Bände 154 und 155 (Wu et al., Hrsg.), Academic Press, New York; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller und M.P. Calos, Hrsg.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; Immunological Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer und Walker, Hrsg.), Academic Press, London, 1987; Handbook of Experimental Immunology, Bände I-IV (D.M. Weir und C.C. Blackwell, Hrsg.), 1986; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

## II. Herstellung und Expression von Fusionsproteinen

**[0061]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein System für die Herstellung von Interferon-beta-1a-mutanten Fusionsproteinen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung diese Proteine so wie die rekombinanter DNA-Moleküle, die zu ihrer Herstellung benutzt werden.

**[0062]** Die Herstellung der Polypeptide dieser Erfindung kann durch eine Vielzahl von Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, erreicht werden. Zum Beispiel können ein Volllängen-Interferon-beta-1a oder verkürzte Formen von Interferon-beta-1a durch bekannte, rekombinante DNA-Techniken unter Verwendung von cDNAs (siehe unten) produziert werden.

**[0063]** Ein Gen, das das erwünschte Interferon-beta-1a-Polypeptid der Erfindung codiert, kann basierend auf der Aminosäuresequenz des erwünschten Polypeptids gestaltet werden. Standardverfahren können dann angewendet werden, um das Gen zu synthetisieren. Zum Beispiel kann die Aminosäuresequenz verwendet werden, um ein rückwärts-translatiertes Gen zu konstruieren. Ein DNA-Oligomer, das eine Nucleotidsequenz enthält, die zum Codieren von Interferon-beta-1a in der Lage ist, kann in einem einzigen Schritt erzeugt werden. Alternativ können einige kleinere Oligonucleotide, die Teile der erwünschten Interferon-beta-1a-Mutante codieren, synthetisiert und dann zusammen ligiert werden. Vorzugsweise wird die DNA-Sequenz, die die Interferon-beta-1a-Einheit codiert, als einige getrennte Oligonucleotide hergestellt werden, die nachher zusammen verknüpft werden. (Siehe Beispiel 2). Die individuellen Oligonucleotide enthalten typischerweise 5'- oder 3'-Überhänge für den komplementären Aufbau.

**[0064]** Sobald sie zusammengefügt sind, werden die bevorzugten Gene durch Sequenzen, die durch Restriktionsendonukleaseen (einschließlich einzigartige Restriktionsstellen für die direkte Zusammenstellung in einen Clonierungs- oder Expressionsvektor) erkannt werden, bevorzugte Codons unter Berücksichtigung des

Wirts-Expressionssystems, das verwendet werden soll (vorzugsweise eine Säugerzelle), und eine Sequenz, die, wenn sie transkribiert wird, eine stabile, wirksam translatierte RNA produziert, charakterisiert werden. Ein angemessenes Zusammenfügen kann durch Nucleotidsequenzierung, Restriktionskartierung und Expression eines biologisch aktiven Polypeptids in einem geeigneten Wirt bestätigt werden.

**[0065]** Säuger-Interferon-beta-cDNAs können durch Verwenden einer geeigneten, menschlichen Interferon-beta-DNA-Sequenz als eine Sonde für das Screenen einer bestimmten Säuger-cDNA-Genbank durch Kreuz-Spezies-Hybridisierung isoliert werden. Säuger-Interferon-beta, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, schließt als Beispiel Primaten-, menschliches, murines, canines, felines, bovines, equines und porcines Interferon-beta ein. Säuger-Interferon-beta kann durch Kreuz-Spezies-Hybridisierung unter Verwendung einer einzelsträngigen cDNA, die von der menschlichen Interferon-beta-DNA-Sequenz stammt, als eine Hybridisierungssonde erhalten werden, um die Interferon-beta-cDNAs von den Säuger-cDNA-Genbanken zu isolieren. Unter den Verfahren, die für die Isolierung und Clonierung der Interferon-Gensequenzen verwendet werden können, sind jene Verfahren, die in den U.S.-Patenten, die oben zusammengefasst sind, gefunden werden. Von besonderer Relevanz sind jedoch die Lehren von U.S.-Patent 4,738,931 (19. Apr., 1988), die eine DNA beschreiben, die ein menschliches Interferon-beta-Gen enthält.

**[0066]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch rekombinante DNA-Moleküle, die die vorher erwähnten DNA-Sequenzen umfassen. Die rekombinanten DNA-Moleküle dieser Erfindung sind zum Lenken der Expression der Polypeptide der Erfindung in Wirten, die damit transformiert wurden, in der Lage. Eine DNA-Sequenz, die ein Fusionspolypeptid der Erfindung codiert, muss funktionell mit einer Expressions-Kontrollsequenz für eine solche Expression verknüpft sein. Um eine adäquate Transkription der rekombinanten Konstrukte der Erfindung bereit zu stellen, kann vorzugsweise eine geeignete Promotor/Enhancersequenz in den rekombinanten Vektor inkorporiert sein, vorausgesetzt, dass die Promotor/Expressions-Kontrollsequenz zum Lenken der Transkription einer Nucleotidsequenz, die ein glycosyliertes Interferon-beta codiert, in der Lage ist. Promotoren, die verwendet werden können, um die Expression des Immunglobulin-basierenden Fusionsproteins zu kontrollieren, schließen die frühe SV40-Promotorregion (Benoist und Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310), den Promotor, der in der langen 3'-terminalen Wiederholung des Rous-Sarkoma-Virus enthalten ist (Yamamoto, et al., 1980, *Cell* 22:787-797), den Herpes-Thymidinkinase-Promotor (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:144-1445), die regulatorischen Sequenzen des Metallothionein-Gens (Brinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); Pflanzen-Expressionsvektoren, die die Nopalatin-Synthetase-Promotorregion umfassen (Herrera-Estrella et al., *Nature* 303:209-213) oder den Blumenkohl-Mosaikviurs-35S-RNA-Promotor (Gardner, et al., 1981, *Nucl. Acids Res.* 9:2871) und den Promotor für das photosynthetische Enzym Ribulosebiphosphat-Carboxylase (Herrera-Estrella et al., 1984, *Nature* 310:115-120); Promotor-Elemente von Hefe oder anderen Pilzen wie den Gal4-Promotor, den ADC (Alkoholdehydrogenase)-Promotor, den PGK (Phosphoglycerokinase)-Promotor, den alkalischen Phosphatase-Promotor und die folgenden tierischen transkriptionellen Kontrollregionen, die Gewebespezifität zeigen und in transgenen Tieren verwendet worden sind, ein, sind aber nicht darauf limitiert: die Elastase I-Gen-Kontrollregion, die in pankreatischen Zellen aktiv ist (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); Insulin-Gen-Enhancer oder -Promotoren, die in pankreatischen beta-Zellen aktiv sind (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); Immunglobulinen-Enhancer oder -Promotoren, die in lymphoiden Zellen aktiv sind (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); die frühen Cytomegalievirus-Promotor- und -Enhancer-Regionen (Boshart et al., 1985, *Cell* 41:521-530); die Maus-Brustdrüsentumor-Virus-Kontrollregion, die in Hoden-, Brust-, lymphoiden und Mastzellen aktiv ist (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); die Albumin-Gen-Kontrollregion, die in der Leber aktiv ist (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); die alpha-Fetoprotein-Gen-Kontrollregion, die in der Leber aktiv ist (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 235:53-58); die alpha 1-Antitrypsin-Gen-Kontrollregion, die in der Leber aktiv ist (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); die beta-Globin-Gen-Kontrollregion, die in myeloiden Zellen aktiv ist (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94; die basische Myelinprotein-Gen-Kontrollregion, die in Oligodendrozyten-Zellen im Gehirn aktiv ist (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); die leichte Myosinkette-2-Gen-Kontrollregion, die im Skelettmuskel aktiv ist (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); und die Gonadotropin-Releasinghormon-Gen-Kontrollregion, die im Hypothalamus aktiv ist (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378). Prokaryontische Expressionssysteme wie der LAC- oder beta-Lactamase-Promotor (Villa-Kamaroff, et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731) sind derzeit insofern nicht bevorzugt, als das exprimierte Interferon-beta nicht glycosyliert werden wird. Nichtsdestotrotz sind prokaryontische Expressionssysteme, die eine Glycosylierung von Interferon-beta in sowohl prokaryontischen als auch eukaryontischen Wirten ermöglichen, auch innerhalb des Rahmens der Erfindung eingeschlossen.

**[0067]** Die Expressionsvektoren, die verwendet werden können, schließen die folgenden Vektoren oder ihre

Derivate ein, sind aber nicht darauf beschränkt: menschliche oder tierische Viren wie Vaccinia-virus-, Adenovirus- oder retroviral basierende Vektoren; Insekten-Viren wie Baculovirus; Hefevektoren; Bacteriophagen-Vektoren (z.B. Lambda) und Plasmid- und Cosmid-DNA-Vektoren, um nur ein paar zu erwähnen. Insbesondere schließen nützliche Expressionsvektoren für die bevorzugten eukaryontischen Wirtse Vektoren ein, die Expressions-Kontrollsequenzen von SV40, bovinem Papillomavirus, Cytomegalievirus umfassen. Darüber hinaus können in jedem spezifischen Expressionsvektor verschiedene Stellen für die Insertion dieser DNA-Sequenzen ausgewählt werden. Diese Stellen sind normalerweise durch die Restriktionsendonuclease, die sie schneidet, bestimmt. Sie werden von Fachleuten gut erkannt. Es wird anerkannt werden, dass ein gegebener Expressionsvektor, der in dieser Erfindung nützlich ist, keine Restriktionsendonuclease-Stelle für die Insertion des ausgewählten DNA-Fragments haben muss. Anstatt dessen kann der Vektor mit dem Fragment durch alternative Mittel verbunden werden.

**[0068]** Der Expressionsvektor und die Stelle, die für die Insertion eines selektierten DNA-Fragments ausgewählt wurde und eine Expressions-Kontrollsequenz funktionell verknüpft, wird durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt, wie: die Anzahl von Stellen, die empfänglich für ein bestimmtes Restriktionsenzym sind, die Größe des Polypeptids, wie leicht das Polypeptid proteolytisch degradiert wird und dergleichen. Die Wahl eines Vektors und einer Insertionsstelle für eine gegebene DNA wird durch ein Gleichgewicht dieser Faktoren bestimmt.

**[0069]** Die rekombinanten Konstrukte der Erfindung können in Wirtszellen eingebracht werden, die zur Expression des Fusionsproteins unter Verwendung irgendeines Verfahrens, das auf dem Fachgebiet bekannt ist, in der Lage sind, einschließlich Transformierung (zum Beispiel unter Verwendung von DEAE-Dextran- oder Calciumphosphat-Techniken), Transfektion, Mikroinjektion, Infektion, Partikelkanone und Elektroporation. Jeder Wirtszelltyp kann angewendet werden, vorausgesetzt, dass die rekombinanten Fusionsprotein-Nucleinsäuresequenzen adäquat in mRNA in jenem Zelltyp transkribiert würden und die Zelle das Protein glycosylieren kann. Zusätzlich können die rekombinanten Nucleinsäurekonstrukte der Erfindung verwendet werden, um nicht-menschliche, transgene Tiere zu bilden, die zum Produzieren des Immunglobulin-basierenden Fusionsproteins in der Lage sind. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist die Wirtszelle eine Säugerzelle wie eine COS- oder CHO-Zelle.

**[0070]** Die erfolgreiche Inkorporierung dieser Polynucleotidkonstrukte in einen gegebenen Expressionsvektor kann durch drei allgemeine Ansätze identifiziert werden: (a) DNA-DNA-Hybridisierung, (b) Anwesenheit oder Abwesenheit von „Marker“-Genfunktionen und (c) Expression von inserierten Sequenzen. Im ersten Ansatz kann die Anwesenheit des Interferon-beta-1a-Gens, das in einen Expressionsvektor inseriert ist, durch DNA-DNA-Hybridisierung unter Verwendung von Sonden nachgewiesen werden, die Sequenzen umfassen, die homolog zum inserierten Fusionsprotein-Gen sind. Im zweiten Ansatz kann der/das rekombinante Vektor/Wirtssystem basierend auf der Anwesenheit oder Abwesenheit von bestimmten „Marker“-Genfunktionen (z.B. Thymidin-Kinaseaktivität, Resistenz gegen Antibiotika wie G418, Transformierungs-Phänotyp, Einschlusskörper-Bildung in Baculovirus, usw.), die durch die Insertion von fremden Genen in den Vektor verursacht werden, identifiziert und selektiert werden. Wenn zum Beispiel das Polynucleotid inseriert wird, um eine Markergen-Sequenz des Vektors zu zerstören, können die Rekombinanten, die die Insertion enthalten, durch die Abwesenheit der Markergen-Funktion identifiziert werden. Im dritten Ansatz können rekombinante Expressionsvektoren durch Testen des fremden Genprodukts, das durch den rekombinanten Vektor exprimiert wird, identifiziert werden. Solche Tests können zum Beispiel auf den physikalischen oder funktionellen Eigenschaften des Genprodukts in biologischen Testsystemen basieren.

**[0071]** Es wird verstanden werden, dass nicht alle Wirt/Expressionsvektor-Kombinationen mit gleicher Wirksamkeit des Exprimierens von DNA-Sequenzen, die das Polypeptid dieser Erfindung codieren, funktionieren werden. Eine bestimmte Auswahl einer Wirt/Expressionsvektor-Kombination kann jedoch von Fachleuten nach Berücksichtigung der Prinzipien, die hierin dargelegt sind, getroffen werden, ohne vom Rahmen der Erfindung abzuweichen.

**[0072]** Die bevorzugte Ausführungsform der Erfindung zieht Fusionsproteine und DNA-Sequenzen, die sie codieren, in Erwägung. Diese Fusionsproteine haben eine Amino-terminale Region, die durch die Aminosäuresequenz einer Interferon-beta-1a-Mutante charakterisiert ist, die aus der Gruppe ausgewählt wurde, die aus IFN- $\beta$ -Mutanten besteht, die in Tabelle 1 als A1, B1, C1, CD1 und CD2 dargelegte Aminosäuresequenz aufweisen; und eine Carboxy-terminale Region, die eine Domäne eines anderen Proteins als Interferon-beta-1a umfasst, wie hierin oben beschrieben. Eine bevorzugte generische Formel für ein solches Protein ist ein Protein, das eine primäre Aminosäuresequenz X-Y-Z aufweist, wobei X ein Polypeptid ist, das die Aminosäuresequenz aufweist, die aus der Aminosäuresequenz einer menschlichen Interferon-beta-Mutante besteht, die

aus der Gruppe ausgewählt wurde, die aus IFN- $\beta$ -Mutanten besteht, die in Tabelle 1 als A1, B1, C1, CD1 und CD2 dargelegte Aminosäuresequenz aufweisen; Y ist eine optionale Linker-Einheit; und Z ist ein Polypeptid, das zumindest einen Teil eines Polypeptids umfasst, das Immunglobulin-ähnliche Domänen enthält. Beispiele von solchen anderen Polypeptiden schließen CD1, CD2, CD4 und Mitglieder der Klasse I- und Klasse II-Haupthistokompatibilitäts-Antigene ein. Siehe U.S. 5,565,335 (Capon et al.) für Beispiele von solchen Polypeptiden.

**[0073]** Die Einheit Z kann zum Beispiel eine Vielzahl von Histidinresten oder vorzugsweise die Fc-Region eines Immunglobulins einschließen, wobei „Fc“ hierin als ein Fragment eines Antikörpers definiert ist, das die C-terminale Domäne der schweren Immunglobulin-Ketten enthält.

**[0074]** In den am meisten bevorzugten Fusionsproteinen ist das mutante Interferon-beta-1a-Protein durch ihren C-Terminus an mindestens einen Teil der Fc-Region eines Immunglobulins fusioniert. Das Interferon-beta-1a bildet den Amino-terminalen Teil, und die Fc-Region bildet den Carboxy-terminalen Teil. In diesen Fusionsproteinen ist die Fc-Region vorzugsweise auf die konstante Domäne-Gelenksregion und die CH2- und CH3-Domänen beschränkt. Die Fc-Region in diesen Fusionen kann auch auf einen Teil der Gelenksregion, wobei der Teil zum Bilden von intermolekularen Disulfidbrücken in der Lage ist, und die CH2- und CH3-Domänen oder die funktionellen Äquivalente davon beschränkt sein. Diese konstanten Regionen können von jeder Säuger-Quelle (vorzugsweise menschlich) stammen und können von jeder geeigneten Klasse und/oder jedem Isootyp, einschließlich IgA, IgD, IgM, IgE und IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, stammen.

**[0075]** Rekombinante Nucleinsäuremoleküle, die die Ig-Fusionen codieren, können durch jedes Verfahren, das auf dem Fachgebiet bekannt ist (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), erhalten werden oder von öffentlich verfügbaren Clonen erhalten werden. Verfahren für die Herstellung von Genen, die die konstanten Regionen der schweren oder leichten Kette von Immunglobulinen codieren, werden zum Beispiel von Robinson, R. et al., PCT-Anmeldung, Veröffentlichung Nr. WO87-02671 gelehrt. Die cDNA-Sequenz, die das Interferon-Molekül oder Fragment codiert, kann direkt an die cDNA gebunden sein, die die schweren, konstanten Ig-Regionen codiert, oder kann durch eine Linkersequenz verbunden sein. In weiteren Ausführungsformen der Erfindung kann ein rekombinantes Vektorsystem gebildet werden, um Sequenzen anzugeben, die Interferon-beta im korrekten Leserahmen mit einer synthetischen Gelenksregion codieren. Zusätzlich kann es wünschenswert sein, Nucleinsäuren, die der 3'-flankierenden Region eines Immunglobulingens entsprechen, einschließlich RNA-Spaltungs/Polyadenylierungsstellen und stromabwärts-liegende Sequenzen, als einen Teil des rekombinanten Vektorsystems einzuschließen. Darüber hinaus kann es wünschenswert sein, eine Signalsequenz stromaufwärts der Immunglobulin-Fusionsprotein-codierenden Sequenzen zu konstruieren, um die Sekretion des fusionierten Moleküls von einer Zelle zu ermöglichen, die mit dem rekombinanten Vektor transformiert wurde.

**[0076]** Die vorliegende Erfindung liefert dimere Fusionsmoleküle so wie monomere oder multimedre Moleküle, die Fusionsproteine umfassen. Solche Multimere können durch Verwendung jener Fc-Regionen oder Teilen davon von Ig-Molekülen hergestellt werden, die normalerweise multivalent sind, wie IgM-Pentamere oder IgA-Dimere. Es wird verstanden, dass ein J-Ketten-Polypeptid benötigt werden kann, um IgM-Pentamere und IgA-Dimere zu bilden und zu stabilisieren. Alternativ können Multimere von Interferon-beta-1a-Fusionsproteinen unter Verwendung eines Proteins mit einer Affinität für die Fc-Region von Ig-Molekülen wie Protein A gebildet werden. Zum Beispiel kann eine Vielzahl von Interferon-beta-1a/Immunglobulin-Fusionsproteinen an Protein A-Agarosekugeln gebunden werden.

**[0077]** Diese polyvalenten Formen sind nützlich, da sie mehrere Interferon-beta-Rezeptor-Bindungsstellen besitzen. Zum Beispiel kann ein bivalentes, lösliches Interferon-beta-1a aus zwei Tandemwiederholungen der Aminosäuren 1 bis 166 der SEQ ID NO: 2 (oder jenen, die durch die mit 1 bis 498 nummerierten Nucleinsäuren der SEQ ID NO: 1 codiert werden) (Einheit X in der generischen Formel) bestehen, die durch eine Linkerregion (Einheit Y) getrennt sind, wobei die Wiederholungen an mindestens einen Teil einer konstanten Immunglobulin-Domäne (Einheit Z) gebunden sind. Alternative polyvalente Formen können auch konstruiert werden, zum Beispiel durch chemisches Koppeln unter Verwendung von konventionellen Kopplungstechniken von Interferon-beta-1a/Ig-Fusionen an jegliches klinisch verträgliches Trägermolekül, ein Polymer, das aus der Gruppe ausgewählt wurde, die aus Ficoll, Polyethylenglykol oder Dextran besteht. Alternativ kann ein Interferon-beta-1a chemisch an Biotin gekoppelt und dem Biotin-Interferon-beta-Fc-Konjugat dann erlaubt werden, an Avidin zu binden, was in tetravalenten Avidin/Biotin/Interferon-beta-Molekülen resultiert. Interferon-beta-1a/Ig-Fusionen können auch kovalent an Dinitrophenol (DNP) oder Trinitrophenol (TNP) gekoppelt und das resultierende Konjugat mit anti-DNP- oder anti-TNP-IgM präzipitiert werden, um decamere Konjugate mit einer Valenz von 10 für die Interferon-beta-Rezeptor-Bindungsstellen zu bilden.

**[0078]** Die Interferon-beta-1a-Proteine, -Fragment und -Fusionsproteine der Erfindung können gemäß konventionellen Bedingungen wie Extraktion, Präzipitation, Chromatographie, Affinitätschromatographie, Elektrophorese oder dergleichen isoliert und aufgereinigt werden. Zum Beispiel können die Interferon-Proteine und Fragmente durch Passieren einer Lösung davon durch eine Säule, die einen Interferon-Rezeptor darauf immobilisiert hat, aufgereinigt werden (siehe U.S.-Pat. Nr. 4,725,669). Das gebundene Interferon-Molekül kann dann durch Behandlung mit einem chaotropischen Salz oder durch Elution mit wässriger Essigsäure eluiert werden. Die Immunglobulin-Fusionsproteine können durch Passieren einer Lösung, die das Fusionsprotein enthält, durch eine Säule, die immobilisiertes Protein A oder Protein G enthält, das selektiv den Fc-Teil des Fusionsproteins bindet, aufgereinigt werden. Siehe zum Beispiel Reis, K. J., et al., J. Immunol. 132:3098-3102 (1984); PCT-Anmeldung, Veröffentlichung Nr. WO87/00329. Der chimere Antikörper kann dann durch Behandlung mit einem chaotropischen Salz oder durch Elution mit wässriger Essigsäure eluiert werden.

**[0079]** Alternativ können die Interferon-Proteine und Immunglobulin-Fusionsmoleküle auf anti-Interferon-Antikörper-Säulen aufgereinigt werden oder auf anti-Immunglobulin-Antikörper-Säulen, um ein im Wesentlichen reines Protein zu ergeben. Der Begriff „im Wesentlichen rein“ beabsichtigt, dass das Protein frei von den Unreinheiten ist, die natürlicherweise damit assoziiert sind. Wesentliche Reinheit kann durch eine einzelne Bande durch die Elektrophorese deutlich werden.

**[0080]** Ein Beispiel eines nützlichen Interferon-beta-1a/Ig-Fusionsproteins dieser Erfindung ist jenes von SEQ ID NO: 2, das durch eukaryontische Zellen, die das Expressionsplasmid pCMG261 enthalten (siehe Beispiel 2), in die Zellkultur sezerniert wird. Dieses Protein besteht aus dem reifen, menschlichen Interferon-beta-1a, fusioniert an einen Teil der Gelenksregion und die konstanten CH2- und CH3-Domänen von murinem Ig. Dies enthält einen ausreichenden Teil des murinen Immunglobulins, um durch das Fc-Bindungsprotein, Protein A, erkannt zu werden.

**[0081]** Andere Fusionsproteine der Erfindung, die menschliches Interferon-beta-1a inkorporieren, sind gezeigt: (a) in den SEQ ID NOS. 3 und 4 für die cDNA beziehungsweise die abgeleiteten Aminosäuresequenzen einer his-markierten Interferon-beta-1a-Fusion (auch in [Fig. 1](#) gezeigt) und; (b) in SEQ ID NO: 1 für die cDNA, die das Interferon-beta-1a/Ig-Fusionsprotein von SEQ ID NO: 2 codiert (auch in [Fig. 2](#) gezeigt).

**[0082]** Die bevorzugten Interferon-beta-1a-Proteine der Erfindung schließen die neue Verbindungs-DNA-Sequenz SEQ ID NO: 5 („Junction sequence“) und die Aminosäure SEQ ID NO: 6 ein. SEQ ID NO: 5 repräsentiert die 11 Triplet-Codons auf jeder Seite der Verbindung zwischen menschlicher Interferon-beta-DNA und der DNA, die eine menschliche konstante Immunglobulinregion codiert (siehe Beispiel 5: SEQ ID NOS: 41 und 42). Insbesondere endet in der SEQ ID NO: 5 die DNA, die das menschliche Interferon-beta-1a codiert, am Nucleotid-Triplett 568-570 (AAC), und die DNA, die eine menschliche konstante IgG1-Region codiert, beginnt am Triplett (GAC), das mit der Nucleotidnummer 574 der SEQ ID NO: 41 beginnt. Die entsprechende abgeleitete Aminosäure-Verbindungssequenz ist in SEQ ID NO: 6 repräsentiert und basiert auf SEQ ID NO: 42. Eine andere einzigartige Verbindungssequenz ist definiert, die eine Linkersequenz im endgültigen DNA-Konstrukt einschließt (siehe Beispiel 5: SEQ ID NOS: 43 und 44). Diese Verbindungs-DNA und die -Aminosäuresequenz sind in SEQ ID O: 7 beziehungsweise 8 repräsentiert, die die 11 Triplet-Colons auf jeder Seite der Kreuzung direkt zwischen dem Ende der Interferon-beta-1a-Sequenz (Nucleotidnummer 570 in der SEQ ID NO: 43) und der Linkersequenz (Nucleotide 571 bis 585 in der SEQ ID NO: 43; GGGGS in der SEQ ID NO: 8) zeigt.

**[0083]** Die DNA-Verbindungssequenzen können als DNA-Sonden verwendet werden und können die minimale DNA sein, die für eine Hybridisierung unter Standardbedingungen an irgendeine DNA-Sequenz, die irgendein Interferon-beta-1a/Ig-Fusionsprotein codiert, benötigt wird. Nichtsdestotrotz können kleinere Sequenzen existieren, vorausgesetzt, dass die gesamte Sonde an beide Seiten der Verbindung hybridisiert und beide Seiten der Interferon-Beta/konstanten Region-Verbindung an der Hybridisierung teilnehmen. Darüber hinaus werden Fachleute verstehen, dass DNA-Sequenzen, die größer als SEQ ID NO: 5 oder 7 sind, auch für eine Hybridisierung geeignet sein werden. Ein Fachmann kann durch Markieren des 5'-Endes von entweder eines einzelsträngigen sense-Oligonucleotids oder eines einzelsträngigen antisense-Oligonucleotids mit einem geeignet markierten Phosphat von ATP unter Verwendung einer Polynukleotidkinase testen, ob eine bestimmte Sonde wie SEQ ID NO: 5 oder 7 zum Hybridisieren auf beiden Seiten der Verbindung in der Lage ist. Eine Sequenz der Erfindung muss an beide Oligonukleotid-Sonden hybridisieren und daher durch sie markiert werden. Es soll weiterhin so verstanden werden, dass die Erfindung vollständig degenerierte Sequenzen, die die Verbindung SEQ ID NO: 5 oder 7 codieren, einschließt.

## III. Andere Varianten von Interferon-Fusionspolypeptiden

**[0084]** Derivate von Proteinen der Erfindung schließen auch verschiedene strukturelle Formen des primären Proteins ein, die die biologische Aktivität beibehalten. Aufgrund der Anwesenheit von ionisierbaren Amino- und Carboxygruppen kann zum Beispiel ein Interteron-beta-Fusionsprotein in der Form von sauren oder basischen Salzen vorliegen oder kann in neutraler Form vorliegen. Individuelle Aminosäurereste können auch durch Oxidation oder Reduktion modifiziert sein. Darüber hinaus kann die primäre Aminosäurestruktur (einschließlich der N- und/oder C-terminalen Enden) oder das Glykan des Interferon-beta-1a durch Bilden von kovalenten oder aggregativen Konjugaten mit anderen chemischen Einheiten wie Glycosylgruppen, Polyalkylenglycol-Polymeren wie Polyethylenglycol (PEG: siehe gleichzeitig anhängige und allgemein übertragene Anmeldung Seriennummer 60/104,491 und 60/720,237), Lipiden, Phosphaten, Acetylgruppen und dergleichen oder durch Bilden von Aminosäuresequenz-Mutanten modifiziert („derivatisiert“) werden.

**[0085]** Andere Derivate von Interferon-beta/Ig schließen kovalente oder aggregative Konjugate von Interferon-beta oder seiner Fragmente mit anderen Proteinen oder Polypeptiden wie durch Synthese in rekombinanter Kultur als zusätzliche N-Termini oder C-Termini ein. Zum Beispiel kann das konjugierte Peptid eine Signal (oder Leader)-Polypeptidsequenz an der N-terminalen Region des Proteins sein, die co-translational oder post-translational den Transfer des Proteins von seiner Stelle der Synthese zu seiner Stelle der Funktion innerhalb oder außerhalb der Zellmembran oder -wand lenkt (z.B. der Hefe-alpha-Faktor-Leader). Interferon-beta-Rezeptorproteine können Peptide umfassen, die zugefügt werden, um die Aufreinigung oder Identifizierung von Interferon-beta zu erleichtern (z.B. Histidin/Interferon-beta-1a-Fusionen). Die Aminosäuresequenz von Interferon-beta kann auch mit dem Peptid Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) verknüpft sein (Hopp et al., Bio/Technology 6: 1204, 1988). Die letztere Sequenz ist hochgradig antigenisch und liefert ein Epitop, das reversibel durch einen spezifischen, monoklonalen Antikörper gebunden ist, was einen schnellen Test und die einfache Aufreinigung eines exprimierten, rekombinanten Proteins ermöglicht. Diese Sequenz wird auch besonders durch die bovine, mukosale Enterokinase an dem Rest gespalten, der unmittelbar der Asp-Lys-Paarung folgt.

**[0086]** Andere Analoge schließen ein Interferon-beta-Fc-Fusionsprotein oder seine biologisch aktiven Fragmente ein, deren Interferon-beta-Sequenzen sich von jenen, die in SEQ ID NOS: 2, 4, 6 oder 8 gezeigt sind, durch eine oder mehrere konservative Aminosäuresubstitution(en) oder durch eine oder mehrere nicht-konservative Aminosäuresubstitution(en) oder durch Deletionen oder Insertionen, die die biologische Aktivität des isolierten Proteins nicht aufheben, unterscheiden. Konservative Substitutionen schließen typischerweise die Substitution einer Aminosäure durch eine andere mit ähnlichen Charakteristika wie Substitutionen innerhalb der folgenden Gruppen ein: Valin, Alanin und Glycerin; Leucin und Isoleucin; Asparginsäure und Glutaminsäure; Asparagin und Glutamin; Serin und Threonin; Lysin und Arginin; und Phenylalanin und Tyrosin. Die nicht-polaren, hydrophoben Aminosäuren schließen Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan und Methionin ein. Die polaren, neutralen Aminosäuren schließen Glycerin, Serin, Threonin, Cystein, Tyrosin, Asparagin und Glutamin ein. Die positiv-geladenen (basischen) Aminosäuren schließen Arginin, Lysin und Histidin ein. Die negativ-geladenen (sauren) Aminosäuren schließen Asparginsäure und Glutaminsäure ein. Andere konservative Substitutionen können Fachleuten leicht bekannt sein. Zum Beispiel kann für die Aminosäure Alanin eine konservative Substitution irgendeine von D-Alanin, Glycerin, beta-Alanin, L-Cystein und D-Cystein genommen werden. Für Lysin kann ein Ersatz jedes von D-Lysin, Arginin, D-Arginin, homo-Arginin, Methionin, D-Methionin, Ornithin oder D-Ornithin sein. Im Allgemeinen sind Substitutionen, von denen erwartet werden kann, dass sie Änderungen in den funktionellen Eigenschaften von isolierten Polypeptiden induzieren, jene, in denen: (i) ein polarer Rest, z.B. Serin oder Threonin für (oder durch) einen hydrophoben Rest, z.B. Leucin, Isoleucin, Phenylalanin oder Alanin substituiert wird; (ii) ein Cystein-Rest für (oder durch) jeden anderen Rest substituiert wird; (iii) ein Rest, der eine elektropositive Seitenkette aufweist, z.B. Lysin, Arginin oder Histidin, für (oder durch) einen Rest substituiert wird, der eine elektronegative Seitenkette aufweist, z.B. Glutaminsäure oder Asparginsäure; oder (iv) ein Rest, der eine dicke Seitenkette aufweist, z.B. Phenylalanin für (oder durch) eine, die keine solche Seitenkette aufweist, z.B. Glycerin substituiert wird. Eingeschlossen in der Erfindung sind isolierte Moleküle, die allelische Varianten, natürliche Mutanten, induzierte Mutanten, Proteine, die durch die DNA codiert werden, die unter hohen oder niedrigen Stringenzbedingungen an eine Nucleinsäure hybridisieren, die ein Polypeptid wie die SEQ ID NOS: 2, 4, 6 oder 8 codieren, sind.

**[0087]** Wir entwickelten Interferon-beta-1a-Mutanten, die weitere Varianten der Interferon-beta-1a-Einheit der Erfindung sind. Diese Interferon-beta-1a-Einheiten können insofern besonders nützlich sein, dass sie neue Eigenschaften zeigen, die nicht im Wildtyp-Interferon-beta-1a gefunden werden (siehe Beispiel 1). Kurz, wir unternahmen eine Mutationsanalyse von menschlichem Interferon-beta-1a mit dem Ziel, die Reste zu kartieren, die für die Aktivität und Rezeptorbindung erforderlich sind. Die Verfügbarkeit der 3-D-Kristallstruktur des

menschlichen Interferon-beta-1a (siehe Karpusas et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 11831-11818) erlaubt uns, Alanin (oder Serin)-Substitutionen, die Lösungsmittel-exponierten Reste, die für Interferon-beta-Rezeptor-Wechselwirkungen verfügbar sind, zu identifizieren und die Aminosäuren zu bewahren, die in intramolekulare Bindungen involviert sind. Eine Reihe von fünfzehn Alanin-Scanningmutationen wurde ausgeführt, wodurch zwischen zwei und acht Resten entlang der eindeutigen Regionen sowohl der Helices (A, B, C, D, E) als auch der Schleifen (AB1, AB2, AB3, CD1, CD2, DE1, DE2) von Interferon-beta-1a ersetzt wurden. Siehe Beispiel 1.

**[0088]** Eine Amino-terminale Histidin-Markierung („his“-Markierung) wurde für die Affinitäts-Aufreinigung der von Säugerzellen exprimierten Mutanten (SEQ ID NO: 2: **Fig. 1**) eingeschlossen. Funktionelle Konsequenzen dieser Mutationen wurden in antiviralen und antiproliferativen Tests getestet. Ein nicht-radioaktiver Bindungs-test wurde entwickelt, um diese Mutanten auf ihre Bindung an den Interferon-beta-Oberflächen-Zellrezeptor (IFNAR1/2-Zelloberflächenrezeptor) zu analysieren. Zusätzlich wurde ein ELISA-basierender Test, der ein IFNAR2-Ektodomäne/Fc-Fusionsprotein anwendet, um Interferon zu binden, verwendet, um Interaktionen von Oberflächen zwischen Interferon-beta-1a und IFNAR2 zu kartieren (siehe Beispiel 1). Diese Mutationsanalysen zeigten, dass die N- und C-Termini in einem Teil des Interferon-beta-Moleküls liegen, der für die Rezeptor-bindung oder die biologische Funktion nicht wichtig ist.

**[0089]** Wir haben drei Typen von Wirkungen identifiziert, die durch gezielte Mutagenese verursacht wurden. Diese Wirkungen können für die Interferon-Arzneistoff-Entwicklung unter bestimmten Umständen vorteilhaft sein. Die drei Typen der Wirkung sind wie folgt: (a) Mutanten mit einer höheren antiviralen Aktivität als jene von his-Wildtyp-Interferon-beta-1a (z.B. Mutante C1); (b) Mutanten, die eine Aktivität sowohl in den antiviralen als auch den Antiproliferations-Tests zeigen, aber für die die Antiproliferations-Aktivität im Bezug auf die antivirale Aktivität im Vergleich zum his-Wildtyp-Interferon-beta-1a unverhältnismäßig niedrig ist (z.B. die Mutanten C1, D und DE1); und (c) funktionelle Antagonisten (z.B. A1, B2, CD2 und DE1), die antivirale und antiproliferative Aktivitäten zeigen, die im Bezug auf die Rezeptorbindung im Vergleich zum his-Wildtyp-Interferon-beta-1a unverhältnismäßig niedrig sind.

**[0090]** Darüber hinaus kann auch die Kopplung zwischen der Interferon-beta-1a-Einheit (X) und der zweiten nicht-Interferon-beta-1a-Einheit Z (z.B. eine Fc-Region eines Immunglobulins) durch jede chemische Reaktion bewirkt werden, die die zwei Moleküle zusammen binden wird, so lange das Immunglobulin und das Interferon-beta-1a ihre entsprechenden Aktivitäten beibehalten. Diese chemische Bindung kann viele chemische Mechanismen wie kovalente Bindung, Affinitätsbindung, Einschiebung, koordinierte Bindung und Komplexbildung einschließen. Repräsentative Kopplungsmittel (d.h. der Linker „Y“ in der generischen Formel), um eine kovalente Bindung zwischen den Interferon-beta-1a- und Immunglobulin-Einheiten zu entwickeln, können organische Verbindungen wie Thioester, Carbodiimide, Succinimidester, Diisocyanate wie Tolylen-2,6-diisocyanat, Gluteraldehyde, Diazobenzene und Hexamethylendiamine wie bis-(p-Diazoniumbenzoyl)-ethylendiamin, bifunktionelle Derivate von Imidoestern wie Dimethyladipimidat und biaktive Fluorverbindungen wie 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzen einschließen. Die Auflistung soll nicht vollständig für die verschiedenen Klassen von chemischen Kopplungsmitteln, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, sein. Viele von diesen sind kommerziell erhältlich, wie N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC); 4-Succinimidoxycarbonyl-alpha-methyl-alpha-(2-pyridyldithio)-toluen (SMPT: Pierce Chem. Co., Kat. #21558G).

#### IV. NUTZEN DER ERFINDUNG

**[0091]** Die Fusionsproteine dieser Erfindung können in therapeutischen Zusammensetzungen verwendet werden, wann immer ein Bedarf für eine Interferon-beta-Therapie vorhanden ist. Diese Moleküle haben die normalen Vorteile, die mit Fusionsproteinen, insbesondere Ig-Fusionen, assoziiert sind; nämlich eine veränderte Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, die zu einer erhöhten Halbwertszeit und einer erhöhten Verweildauer im Gefäßsystem führen. Darüber hinaus sind die besonders bevorzugten glycosylierten Interferon-beta-1a-Proteine, obwohl sie in der Struktur ähnlich zu Interferon-beta-1b sind, viele Male biologisch aktiver als das nicht-glycosyierte Interferon-beta-1b. Siehe Runkel et al., 1998, Pharm. Res. 15: 641-649.

**[0092]** Von den Produkten der vorliegenden Erfindung ist gefunden worden, dass sie im Aufrechterhalten der Halbwertszeit von therapeutischem Interferon-beta-1a nützlich sind, und sie können zum Beispiel für die therapeutische Verabreichung durch Auflösen in Wasser oder einem verträglichen, flüssigen Medium hergestellt werden. Die Verabreichung erfolgt entweder auf dem parenteralen, Aerosol- oder oralen Weg. Feine kolloidale Suspensionen können für die parenterale Verabreichung hergestellt werden, um eine Depotwirkung zu produzieren, oder auf dem oralen Weg, während eine Aerosol-Formulierung von flüssiger oder Trockenpulver Form

vorliegen kann. Im trockenen, lyophilisierten Stadium oder in Lösungs-Formulierungen sollten die Interferon-beta-1a-Fusionen der vorliegenden Erfindung eine gute Lagerungsstabilität haben.

**[0093]** Die therapeutischen Proteine der vorliegenden Erfindung können für die Prophylaxe oder die Behandlung von jeglichem Zustand oder Krankheitsstatus genutzt werden, für den die Interferon-beta-1a-Komponente wirksam ist. Zusätzlich können die Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung in der Diagnose von Komponenten, Zuständen oder Krankheitsstadien in biologischen Systemen oder Proben so wie für Diagnosezwecke in nicht-physiologischen Systemen genutzt werden.

**[0094]** In einer therapeutische Verwendung zieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung eines tierischen Individuums, das einen solchen(solche) Zustand(Zustände) oder Krankheitsstatus(stadien) aufweist oder latent empfänglich dafür ist und eine solche Behandlung benötigt, umfassend Verabreichen einer wirksamen Menge eines Fusionsproteins der vorliegenden Erfindung, die therapeutisch wirksam für den Zustand oder den Krankheitsstatus ist, an ein Tier, in Betracht. Individuen, die durch die Fusionen der vorliegenden Erfindung behandelt werden sollen, schließen Säuger-Individuen und am bevorzugtesten menschliche Individuen ein. In Abhängigkeit vom spezifischen Zustand oder Krankheitsstatus, der bekämpft werden soll, können tierischen Individuen Interferon-beta-1a-Fusionsproteine der Erfindung in jeglicher geeigneten, therapeutisch wirksamen und sicheren Dosierung verabreicht werden, was leicht innerhalb des Fachkönnens und ohne unzulässiges Experimentieren bestimmt werden kann. Wegen der Spezies-Schranken von Typ 1-Interferonen kann es notwendig sein, Interferon-Fusionsproteine, wie hierin beschrieben, mit Interferonen der geeigneten Spezies herzustellen.

**[0095]** Die anti-zellproliferative Aktivität von Interferon-beta-1a ist wohlbekannt. Insbesondere sind bestimmte Interferon-beta-1a-Fusionen, die hierin beschrieben sind, nützlich für die Behandlung von Tumoren und Krebsarten wie osteogenem Sarkom, Lymphom, akuter lymphocytischer Leukämie, Brust-Karzinom, Melanom und nasopharyngealem Karzinom so wie von Autoimmun-Zuständen wie Fibrose, Lupus und multipler Sklerose. Es wird darüber hinaus erwartet, dass die antivirale Aktivität, die durch die Fusionsproteine, besonders bestimmte Interferon-beta-1a-Mutante, die hierin beschrieben sind, gezeigt wird, in der Behandlung von viralen Krankheiten wie einer ECM-Infektion, Influenza und anderen Atmungstrakt-Infektionen, Tollwut und Hepatitis verwendet werden kann. Es wird auch erwartet, dass die immunmodulatorischen Aktivitäten von Interferon-beta-1a, die von den hierin beschriebenen Proteinen gezeigt werden, in der Behandlung von Autoimmun- und Entzündungskrankheiten wie Fibrose, multipler Sklerose verwendet werden können. Die Fähigkeit von Interferonen, die Bildung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese oder Neovaskularisierung) zu inhibieren, ermöglicht die Verwendung der Proteinen der Erfindung, um angiogenetische Krankheiten wie diabetische Retinopathie, Frühgeborenenretinopathie, Makuladegeneration, Hornhaut-Transplantatabstoßung, neovaskuläres Glaukom, retrolentale Fibroplasie, Rubeosis und das Osler-Webber Syndrom zu behandeln. Darüber hinaus ist die anti-endothiale Aktivität von Interferon für einige Zeit bekannt gewesen, und ein potenzieller Mechanismus der Interferonwirkung kann sein, mit der endothelialen Zellaktivität durch Inhibieren der Produktion oder der Wirksamkeit von angiogenetischen Faktoren, die durch Tumorzellen produziert werden, zu interferieren. Manche vaskuläre Tumore wie Hämangiome sind besonders empfindlich auf die Behandlung mit Interferon. Die Behandlung mit Interferon-alpha ist die einzige dokumentierte Behandlung für diese Krankheit. Es wird erwartet, dass die Behandlung mit den Interferon-beta-1a-Fusionsproteinen der Erfindung wesentliche pharmazeutische Nutzen im Bezug auf die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik bieten wird, da erwartet wird, dass das Konjugat für einen längeren Zeitraum im Gefäßsystem verbleibt als nicht-konjugierte Interferone, was daher zu einer wirksameren und erfolgreichen Therapie für die Verwendung als ein anti-angiogenetisches Mittel führt. Siehe Beispiel 9.

**[0096]** Die Polymer-Interferon-beta-1a-Fusionen der Erfindung können per se so wie in der Form von pharmazeutisch verträglichen Estern, Salzen und anderen physiologisch funktionellen Derivaten davon verabreicht werden. In solchen pharmazeutischen und Medikamentformulierungen wird das Interferon-beta-1a vorzugsweise zusammen mit einem oder mehreren pharmazeutisch verträglichen Träger(n) und optional irgendwelchen anderen therapeutischen Bestandteilen verwendet. Der (die) Träger muss (müssen) in dem Sinn pharmazeutisch verträglich sein, dass er (sie) kompatibel mit den anderen Bestandteilen der Formulierung und nicht unzulässig schädlich für den Empfänger davon ist (sind). Das Interferon-beta-1a wird in einer Menge, die wirksam ist, um die erwünschte pharmakologische Wirkung, wie oben beschrieben, zu erzielen, und in einer Quantität, die passend ist, um die erwünschte tägliche Dosis zu erzielen, bereitgestellt.

**[0097]** Die Formulierungen schließen jene ein, die für die parenterale so wie die nicht-parenterale Verabreichung geeignet sind, und die spezifischen Verabreichungsarten schließen die orale, rektale, bukkale, topische, nasale, ophtalmische, subcutane, intramuskuläre, intravenöse, transdermale, intrathekale, intra-artikuläre, int-

ra-arterielle, sub-arachnoidale, bronchiale, lymphatische, vaginale und intrauterine Verabreichung ein. Die Formulierungen, die für die orale, nasale und parenterale Verabreichung geeignet sind, werden bevorzugt.

**[0098]** Wenn das Interferon-beta-1a in einer Formulierung verwendet wird, das eine flüssige Lösung umfasst, kann die Formulierung vorteilhafterweise oral oder parenteral verabreicht werden. Wenn das Interferon-beta-1a in einem flüssigen Suspensionsformulierung oder als Pulver in einem biologisch verträglichen Formulierung eines Trägers angewendet wird, kann die Formulierung vorteilhafterweise oral, rektal oder bronchial verabreicht werden.

**[0099]** Wenn das Interferon-beta-1a direkt in der Form eines pulvormigen Feststoffs angewendet wird, kann das Interferon-beta-1a vorteilhafterweise oral verabreicht werden. Alternativ kann es nasal oder bronchial durch Vernebelung des Pulvers in einem Trägergas verabreicht werden, um eine gasförmige Dispersion des Pulvers zu bilden, die durch den Patienten von einem Atmungskreislauf, der ein geeignetes Vernebelungsinstrument umfasst, eingeatmet werden.

**[0100]** Die Formulierungen, die die Proteine der vorliegenden Erfindung umfassen, können bequem in Einheitsdosierungsformen präsentiert werden und können durch irgendeines der Verfahren, die auf dem pharmazeutischen Fachgebiet wohlbekannt sind, hergestellt werden. Solche Verfahren schließen im Allgemeinen den Schritt des in In-Kontakt-bringen des(der) aktiven Bestandteils(Bestandteile) mit einem Träger ein, der(die) einen oder mehrere Hilfsbestandteil(e) bildet(bilden). Typischerweise werden die Formulierungen durch einheitliches und enges In-Kontakt-bringen des (der) aktiven Bestandteils (Bestandteile) mit einem flüssigen Träger, einem fein aufgetrennten festen Träger oder beiden und dann, wenn nötig, Formen des Produkts in Dosierungsformen der gewünschten Formulierung hergestellt.

**[0101]** Formulierungen der vorliegenden Erfindung, die für die orale Verabreichung geeignet sind, können als diskrete Einheiten wie Kapseln, Stärkekapseln, Tabletten oder Pastillen, wobei alle eine vorbestimmte Menge des aktiven Bestandteils als Pulver oder Granula enthalten; oder eine Suspension in einer wässrigen Flüssigkeit oder einer nicht-wässrigen Flüssigkeit wie einem Sirup, einem Elixier, einer Emulsion oder einem Auszug dargereicht werden.

**[0102]** Eine Tablette kann durch Kompression oder Abformung, optional mit einem oder mehreren Hilfsbestandteil(en) gemacht werden. Gepresste Tablette können durch Komprimieren in einer geeigneten Maschine hergestellt werden, wobei der aktive Bestandteil in einer frei fließenden Form wie einem Pulver oder Granula vorliegt, der optional mit einem Bindemittel, einem Zersetzer, einem Gleitmittel, einem inerten Verdünner, einem oberflächenaktiven Mittel oder einem entladenden Mittel gemischt wird. Abgeformte Tabletten, die ein Gemisch der pulvormigen Polymer-Konjugate mit einem geeigneten Träger umfassen, können durch Abformen in einer geeigneten Maschine gemacht werden.

**[0103]** Ein Sirup kann durch Zugabe der aktiven Verbindung zu einer konzentrierten, wässrigen Lösung eines Zuckers, zum Beispiel Saccharose, gemacht werden, zu dem auch jegliche(r) Hilfsbestandteil(e) zugegeben werden kann(können). Ein solcher (Solche) Hilfsbestandteil(e) kann (können) Geschmacksstoffe, ein geeignetes Konservierungsmittel, Mittel um die Kristallisierung des Zuckers zu verzögern, und Mittel um die Löslichkeit von irgendeinem anderen Bestandteil wie Polyhydroxyalkohol zu erhöhen, zum Beispiel Glycerin oder Sorbitol, einschließen.

**[0104]** Formulierungen, die für die parenterale Verabreichung geeignet sind, umfassen bequemerweise eine sterile, wässrige Zubereitung des aktiven Konjugats, das vorzugsweise isotonisch mit dem Blut des Empfängers ist (z.B. physiologische Kochsalzlösung). Solche Formulierungen können Suspensionsmittel und Verdickungsmittel oder andere mikropartikuläre Systeme einschließen, die gestaltet sind, um die Verbindung zu Blutbestandteilen oder einem oder mehreren Organ(en) anzuzielen. Die Formulierungen können in Form einer Einheitsdosis oder Mehrfachdosis dargereicht werden.

**[0105]** Nasenspray-Formulierungen umfassen aufgereinigte wässrige Lösungen des aktiven Konjugats mit Konservierungsmitteln und isotonischen Mitteln. Solche Formulierungen werden vorzugsweise an einen pH-Wert und einen isotonischen Zustand angepasst, der mit den Nasenschleimhaut-Membranen kompatibel ist.

**[0106]** Formulierungen für die rektale Verabreichung können als ein Suppositorium mit einem geeigneten Träger wie Kakaobutter, hydrierten Fetten oder einer hydrierten Fett-Carbonsäure vorliegen.

**[0107]** Ophtalmische Formulierungen wie Augentropfen werden durch ein ähnliches Verfahren wie das Nasenspray hergestellt, außer, dass der pH-Wert und die isotonischen Faktoren vorzugsweise angepasst werden, um zu jenen des Auges zu passen.

**[0108]** Topische Formulierungen umfassen die Konjugate der Erfindung, die in einem oder mehreren Medium (Medien) wie Mineralöl, Vaseline, Polyhydroxyalkoholen oder anderen Basen, die für topische Arzneimittel verwendet werden, gelöst oder suspensierte sind.

**[0109]** Zusätzlich zu den vorher erwähnten Bestandteilen können die Formulierungen dieser Erfindung darüber hinaus einen oder mehrere Hilfsbestandteil(e) einschließen, die von Verdünnern, Puffern, Geschmacksmiteln, Zersetzern, oberflächenaktiven Mitteln, Verdickungsmitteln, Gleitmitteln, Konservierungsmitteln (einschließlich Antioxidanzien) und dergleichen ausgewählt werden.

**[0110]** Dementsprechend zieht die vorliegende Erfindung die Bereitstellung von geeigneten Fusionsproteinen für die in vitro-Stabilisierung von Interferon-beta-1a in einer Lösung als eine bevorzugte, veranschaulichende Anwendung einer nicht-therapeutischen Anwendung in Betracht. Die Fusionsproteine können zum Beispiel angewendet werden, um die Resistenz gegen enzymatische Degradierung des Interferon-beta-1a zu erhöhen, und liefern ein Mittel zur Verbesserung des Haltbarkeitszeitraums, der Stabilität bei Zimmertemperatur und der Robustheit von Forschungsreagenzien und Kits.

**[0111]** Die folgenden Beispiele werden geliefert, um die vorliegende Erfindung zu illustrieren, und sollten nicht als limitierend ausgelegt werden. Insbesondere wird verstanden werden, dass die hierin beschriebenen in vivo-Tierversuche variieren können, so dass andere Modifikationen und Variationen der Basismethodik möglich sind. Zum Beispiel könnte ein Fachmann im Beispiel 7 andere Neopterin-Tests verwenden oder könnte die Zahl und Art des verwendeten Primaten ändern. Diese Modifikationen und Variationen der Beispiele sollen, als innerhalb des Geists und Rahmens der Erfindung betrachtet werden.

Beispiel 1: Struktur/Aktivitätstudien von menschlichem Interferon-beta-1a unter Verwendung von Alanin/Serin-Substitutionsmutationen: Analyse von Rezeptor-Bindungsstellen und funktionellen Domänen

#### A. Überblick

**[0112]** Eine umfassende Mutations-Analyse von menschlichem Interferon-beta-1a (IFN-beta-1a) wurde mit dem Ziel der Kartierung von Resten, die für die Aktivität und Rezeptorbindung benötigt werden, unternommen. Die Verfügbarkeit der 3-D-Kristallstruktur von menschlichem IFN-beta (Karpuras, M. et al. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 11813-11818) erlaubte uns, Alanin (oder Serin)-Substitutionen der Lösungsmittel-ausgesetzten Reste, die für Rezeptor-Interaktionen verfügbar sind, zu identifizieren und Aminosäuren beizubehalten, die in intramolekulare Bindungen involviert sind. Eine Reihe von 15 Alanin-Substitutionsmutationen wurde ausgeführt, die zwischen 2 und 8 Reste entlang von bestimmten Regionen von jeder der Helices (A, B, C, D, E) und Schleifen (AB, CD, DE) ersetzte. Eine Amino-terminale Markierung, die aus 6 Histidinresten besteht, so wie eine Enterokinase-Linkersequenzstelle für die Entfernung der Amino-terminalen Ausdehnung wurde für die Affinitätsaufräumung eingeschlossen. Die resultierenden Interferone werden austauschbar als „his-markiertes Interferon(IFN)-beta“ oder His<sub>6</sub>-Interferon-beta“ und dergleichen bezeichnet.

**[0113]** Verschiedene mutante his-markierte IFN-beta-Expressionsplasmide wurden unter Verwendung eines Wildtyp-IFN-beta-Genkonstrukts als eine Matrize für die Mutagenese konstruiert. Die Mutagenese-Strategie involvierte zuerst das Einbringen von einzigartigen Restriktionsenzym-Spaltungsstellen im Verlauf des his-markierten Wildtyp-IFN-beta-Gens, dann das Ersetzen von bestimmten DNA-Sequenzen zwischen den ausgewählten Restriktionsstellen mit synthetischen Oligonucleotid-Duplexen, die die Alanin (oder Serin)-Substitutionsmutationen codieren. Schließlich wurden die mutanten IFN-Gene in ein Plasmid sub-klont, das die Säugerzell-Expression in einer menschlichen 293-Nierenzelllinie lenkte.

**[0114]** Konsequenzen bezüglich der Funktion dieser Mutationen wurden in antiviralen und Antiproliferations-Tests bewertet. Ein nicht-radioaktiver IFN-Bindungstest wurde entwickelt, um diese Mutanten in ihrer Bindung an den Oberflächenrezeptor („IFNAR1/2-Komplex“) von menschlichen Daudi-Burkitt-Lymphomzellen zu analysieren. Zusätzlich wurde ein Test entwickelt, um die Interaktionsoberflächen zwischen his-IFN-beta-Mutanten und IFNAR2 zu kartieren, der ein IFNAR2/Fc-Fusionsprotein ausnutzte, das die IFN-Rezeptorprotein-IFNAR2-extrazelluläre Domäne, fusioniert an die Gelenks-, CH2- und CH3-Domänen von menschlichem IgG1, umfasst.

## 1. Bildung eines Interferon-beta-Gens als eine Matrize für die Mutagenese

**[0115]** Unsere Strategie, IFN-beta-Alanin (oder Serin)-substituierte Mutanten herzustellen, war zuerst ein modifiziertes IFN-beta-Gen zu kreieren, das das Wildtyp-Protein codierte, aber das einzigartige Restriktionsenzym-Spaltungsstellen über das Ganze Gen verstreut trug. Die einzigartigen Stellen wurden verwendet, um Wildtyp-Sequenzen mit synthetischen Oligonucleotid-Duplexen auszutauschen, die die mutierten Codons codierten. Um eine menschliche IFN-beta-1a-Expressionskassette zu erhalten, die für die Bildung von mutanten Genen geeignet ist, wurde die IFN-beta-cDNA (GenBank Zugangsnummer E00029) durch PCR amplifiziert. Eine anfängliche Clonierung des IFN-beta-Gens in das Plasmid pMJB107, einem Derivat von pACVC184, siehe Rose, et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16 (1) 355) wurde notwendig, um eine ortsgerichtete Mutagenese des Gens in einem Plasmid durchzuführen, dem die spezifischen Restriktionsstellen fehlen, die durch die Mutagenese hergestellt würden.

**[0116]** Die PCR-Primer, die zur Subclonierung der codierenden Sequenzen des menschlichen IFN-beta-Gens verwendet wurden, ermöglichten eine Enterokinase-Verknüpfsequenz stromaufwärts und im Rahmen mit dem IFN-beta-Gen (5'-PCR-Primer 5'TTCTCCGGAGACGATGATGACAAGATGAGCTACAACCT GCTTGGATTCTACAAAGAAC-3' (SEQ ID NO: 9: "BET-021" und 3'-PCR-Primer 5'-GCCGCTCGAGTTATCAGTTCGGAGGTAAACCTGTAAGTC-3' (SEQ ID NO: 10: „BET-022") und flankierende Restriktionsenzym-Stellen (BspEI und Xho I), die für die Clonierung in die Plasmid pMJB107-Stellen brauchbar sind, einzubringen. Die resultierende DNA wird als PCR-Fragment A bezeichnet.

**[0117]** Eine wirksame Signalsequenz von der menschlichen vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1)-Signalsequenz und eine sechs-Histidin-Markierung wurden in das endgültige Konstrukt von einem zweiten DNA-Fragment, das von pDSW247 (Fragment B) gebildet wurde, eingebracht. Das Plasmid pDSW247 ist ein Derivat von pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), von dem das EBNA-1-Gen deletiert worden ist und das die VCAM-1-Signalsequenz (VCAMss), stromaufwärts und im Rahmen mit einer sechs-Histidin-Markierung fusioniert, trägt. Die PCR-Primer, die verwendet wurden, um die VCAMss-1/Histidin-Markierung-Kassetteneinheit herzustellen, waren KID-369 (5'-PCR-Primer 5'-AGCTTCCGGGGGCCATCATCATCATCATAGCT-3': SEQ ID NO: 11) und KID-421 (3'-PCR-Primer 5'-CCGGAGCTATGATGATGATGATGG CCCCCCGGA-3': SEQ ID NO: 12), die die flankierenden RestriktionsenzymSpaltungsstellen (NotI und BspEI) inkorporieren, die das Ausschneiden der Fragment B-DNA ermöglichen.

**[0118]** Um einen Plasmidvektor zu bilden, der die VCAM-1-Signalsequenz, die his-Markierung und das Interferon-beta-Gen trug, führten wir eine drei-Weg-Ligierung unter Verwendung der Gel-aufgereinigten DNA-Fragmente des Plasmidvektors pMJB107 (NotI- und Xhol-gespalten), PCR-Fragment A (BspEI- und Xhol-gespalten) und Fragment B (NotI- und BspEI-gespalten) durch. Das ligierte Plasmid wurde verwendet, um entweder JA221- oder XL1-Blue-E. coli-Zellen zu transformieren, und Ampicillin-resistente Kolonien wurden gepickt und durch Restriktionskarten-Analyse auf Insertionen getestet. Maxiprep-DNA wurde hergestellt, und die Sequenz der Insertion wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Das resultierende Konstrukt wurde pCMG260 genannt.

## 2. Bildung von Alanin-Substitutionsmutanten von menschlichem Interferon-beta in pCMG260

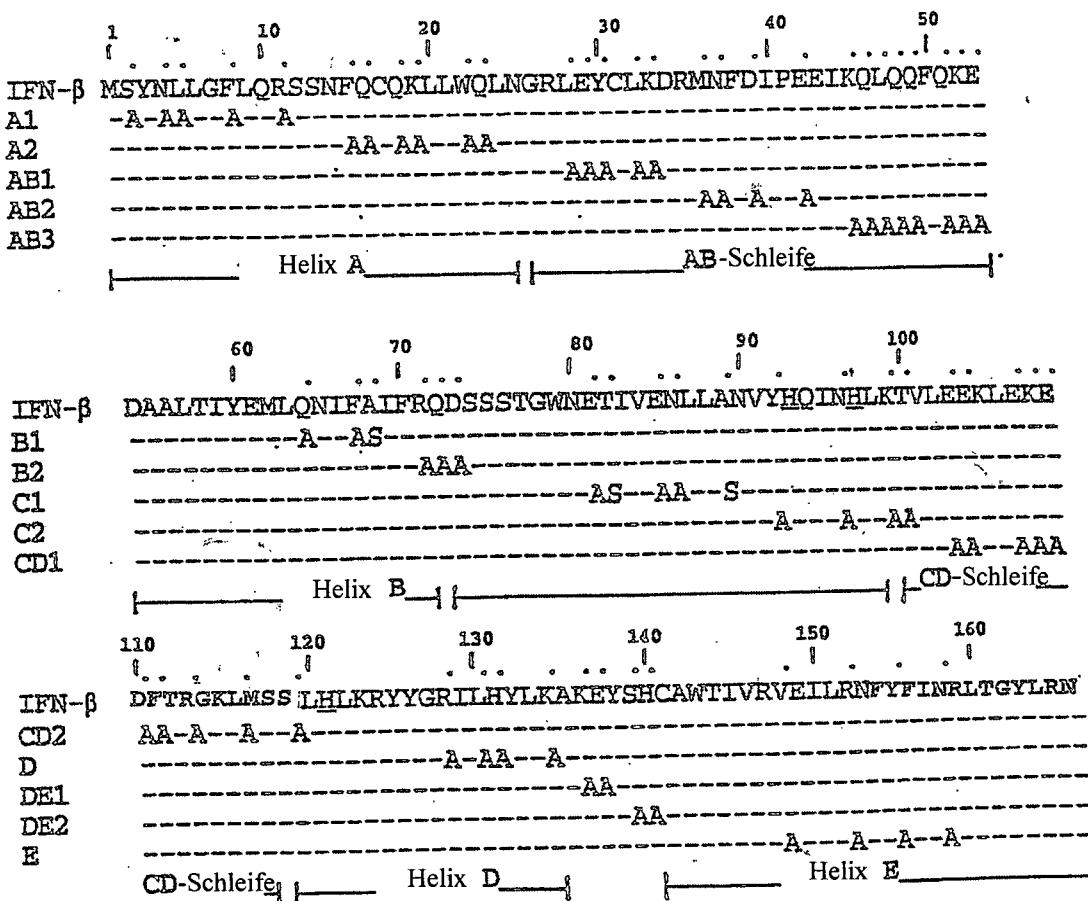
**[0119]** Das Plasmid pCMG260 wurde als eine Matrize für mehrere Runden der Mutagenese (U.S.E. Site Directed Mutagenesis Kit (Boehringer-Mannheim) verwendet, die einzigartige Restriktions-Spaltungsstellen in Positionen entlang der IFN-beta-Protein-codierenden Sequenz einbrachte, aber die resultierende Sequenz des Proteins nicht änderte. Die mutagenisierten Plasmide wurden verwendet, um entweder die JA221- oder XL1-Blue-Stämme von E. coli zu transformieren, und rekombinante Kolonien wurden auf die Chloramphenicol-Resistenz selektiert. Chloramphenicol-resistente Kolonien wurden weiter durch DNA-Restriktionskartierungs-Analyse auf die Anwesenheit der erwünschten einzigartigen Restriktionsenzym-Stelle getestet. Das resultierende IFN-beta-Plasmid pCMG275.8 enthielt den vollständigen Satz an einzigartigen Restriktionsenzym-Spaltungsstellen, und die DNA-Sequenz des Gens wurde verifiziert. Die vollständige DNA-Sequenz des modifizierten, his-markierten Interferon-beta-Gens zusammen mit der Wildtyp-Protein-codierenden Sequenz sind in [Fig. 1](#) angegeben.

**[0120]** Der vollständige Satz an Alanin-Substitutionsmutationen ist in Tabelle 1 (nächste Seite) dargestellt. Die Namen der Mutanten beschreiben die strukturellen Regionen (Helices und Schleifen), in die die Mutationen eingebracht wurden. Das gesamte Element der Alanin (Serin)-Substitutionen resultiert in einer Mutation von 65 der 165 Aminosäuren von menschlichem IFN-beta.

[0121] Die Gruppe der Mutanten wurde von pCMG275.8 durch Ersetzen der Segmente der DNA zwischen den einzigartigen Restriktionsstellen mit synthetischen Oligonucleotid-Duplexen, die die genetische, codierende Information trugen, die in Tabelle 2 (siehe unten) dargestellt ist, gebildet. Um die verschiedenen mutanten Alanin-Substitutionsplasmide zu bilden, wurden der Gel-aufgereinigte pCMG275.8-Vektor (mit dem geeigneten Restriktionsenzym gespalten, wie auf der Liste unten für jede strukturelle IFN-beta-Region angezeigt) und die Oligonucleotid-Duplexe (Sequenzen des codierenden Strangs sind in Tabelle 2 gezeigt) miteinander ligiert. Die Ligierungsgemische wurden verwendet, um den JA221-Stamm von E. coli zu transformieren, und rekombinante Kolonien auf Ampicillin-Resistenz selektiert. Ampicillin-resistente Kolonien wurden durch Screenen auf geeignete Restriktionsenzym-Stellen auf die Anwesenheit der Insertion der Mutationen getestet. Für zwei Mutanten (A2 und CD2) bedingte die Clonierungsstrategie die Verwendung von zwei Duplexen von synthetischen Oligonucleotiden (in Tabelle 2 gezeigt), die komplementäre überhängende Enden tragen, um ihnen zu erlauben, mit einander und mit dem Vektor-IFN-beta-Gerüst in einer drei-Wege-Ligierung zu ligieren. Die folgende Liste illustriert die Stellen, die verwendet wurden, um die mutierten Oligonucleotide von Tabelle 2 zu clonieren. Das Clonierungsschema (Unterabschnitt B) zeigt die Positionen dieser einzigartigen Stellen am Interferon-beta-Gen.

A-Helix	BspEI bis MunI oder BgIII bis PstI
AB-Schleife	MunI bis PstI oder MunI bis BsaHI
B-Helix	BspHI bis Bsal oder BsaHI bis Bsal
C-Helix	Bsal bis XbaI
CD-Schleife	XbaI bis BspHI oder XbaI bis DralII
D-Helix	BspHI bis DralII
DE-Schleife	BspHI bis Pvul
E-Helix	Pvul bis BstEII

Tabelle 1:

Positionen von Alanin-Substitutionsmutationen von <sup>H</sup>INF-β

[0122] Die als IFN-β bezeichnete Linie zeigt die menschliche Wildtyp-IFN-β-Sequenz. Alanin- oder Se-

rin-Substitutionen der IFN- $\beta$ -Reste sind für jede der Mutanten gezeigt, und die Striche unter relevanten Regionen zeigen Wildtyp-Sequenzen an. Die Helices und Schleifen-Strukturen sind als durchgehende Linien unter den Mutanten angezeigt. Die DE-Schleife umspannt die Lücke zwischen den D- und E-Helices. Zwei zusätzliche Alanin-Substitutionsmutanten (H93A, H97A und H121A) wurden in antiviralen Tests, um die Wirkungen der Mutation dieser Histidine zu bewerten, die Zink in der kristallinen Dimerstruktur chelatieren, hergestellt und analysiert. Beide dieser Mutanten behielten die volle Wildtyp-Aktivität in antiviralen Test bei, was nahe legt, dass eine Zink-vermittelte Dimer-Bildung für die IFN- $\beta$ -Aktivität nicht wichtig ist.

TABELLE 2:

A1	SEQ ID	CCGGAGACGATGATGACAAGATGGCTTACGCCGCTTGGAGCCCTACAAG
	NO: 13	CTTCTAGCAATTTCAGTGTCAAGAGCTCCTGTGGC
	BET-053	
A2	SEQ ID	GATCTAGCAATGCTGCCTGTGCTGCCCTCCTGGCTGCCTTGAATGGGAGGC
	NO: 14	TTGAATACT
	BET-039	
	SEQ ID	
	NO: 15	GCCTCAAGGACAGGATGAACTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCA
	BET-041	
AB1	SEQ ID	AATTGAATGGGAGGGCTGCAGCTTGCCTGCAGACAGGATGAACTTTGACAT
	NO: 16	CCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCA
	BET-080	
AB2	SEQ ID	AATTGAATGGGAGGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGGCTGCATTTGCTAT
	NO: 17	CCCTGCAGAGATTAAGCAGCTGCA
	BET-082	
AB3	SEQ ID	AATTGAATGGGAGGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATGAACTTTGACA
	NO: 18	
	BET-084	
	SEQ ID	TCCCTGAGGAGATTGCTGCAGCTGCAGCTTCGCTGCAGCTGA
	NO: 19	
	BET-086	
B1	SEQ ID	CGCCGCCTGACCATCTATGAGATGCTCGCTAACATCGCTAGCATTTCAGA
	NO: 20	CAAGATTCTAGCACTGGCTGGAA
	BET-110	
B2	SEQ ID	CGCCGCATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTGCTATTTCGCT
	NO: 21	GCAGCTTCATCTAGCACTGGCTGGAA
	BET-112	
C1	SEQ ID	GGAATGCTTCAATTGTTGCTGCACTCCTGAGCAATGTCTATCATCAGATAAA
	NO: 22	CCATCTGAAGACAGTTCTAG
	BET-114	
C2	SEQ ID	GGAATGAGACCATTTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCGCTCATCAGATAGC

NO:23 ACATCTGGCTGCAGTTCTAG  
BET-092

CD1 SEQ ID CTAGCTGAAAACTGGCTGCAGCTGATTCACCAGGGAAAAC  
NO:24  
BET-094

CD2 SEQ ID CTAGAAGAAAACTGGAGAAAGAACAGCTACCGCTGGAAAAGCAATGAGCG  
NO:25 CGCTGCACCTGAAAAGA  
BET-096

SEQ ID TATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGAGTACTCACACTGT  
NO:26  
BET-106

D1 SEQ ID CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGCAATTGCTGCATAACCT  
NO:27 GGCAGCCAAGGAGTACTCACACTGT  
BET-108

DE1 SEQ ID CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCT  
NO:28 GAAGGCCGCTGCATACTCACACTGTGCCTGGACGAT  
BET-116

DE2 SEQ ID CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTG  
NO:29 AAGGCCAAGGAGTACGCTGCATGTGCCTGGACGAT  
BET-118

E1 SEQ ID CGTCAGAGCTGAAATCCTAGCAAACTTGCATTGCAAGACTTACAG  
NO: 30  
BET-104

#### B. Konstruktion von EBNA 293-Expressionsplasmiden

**[0123]** Die Wildtyp- und mutanten IFN-beta-Gene, die an die VCAM-1-Signalsequenz, die his-Markierung und die Enterokinase-Linkersequenz fusioniert sind, wurden als 761 Basenpaar-NotI- und BamHI-Restriktionsfragmente Gel-aufgereinigt. Die aufgereinigten Gene wurden in den NotI- und BamHI-gespaltenen Plasmidvektor pDSW247, der ein Derivat von pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) ist, subcloniert. Das Plasmid pDSW247 ist ein Expressionsvektor für die transiente Expression von Protein in menschlichen EBNA 293-Nierenzellen (Invitrogen, Carlsbad, CA). Er enthält den frühen Cytomegalie-Gen-Promotor und regulatorische EBV-Elemente, die für eine Genexpression mit hohem Spiegeln in diesem System erforderlich sind, so wie selektierbare Marker für *E. coli*- (Ampicillin-Resistenz) und EBNA 293-Zellen (Hygromycin-Resistenz). Die ligierten Plasmide wurden verwendet, um entweder JA221- oder XL1-Blue-*E. coli*-Zellen zu transformieren, und Ampicillin-resistente Kolonien wurden gepickt und durch Restriktionskarten-Analyse auf Insertionen getestet. Maxiprep-DNA wurde hergestellt, und die Sequenz der Insertionen wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Positive Clones, die die erwünschten mutagenisierten Sequenzen zeigten, wurden verwendet, um menschliche EBNA 293-Nierenzellen zu transfizieren.

**[0124]** Die Gesamt-Clonierungs- und Expressionsstrategie ist in [Fig. 12](#) präsentiert.

#### C. Expression und Quantifizierung von IFN-beta-1a-Alanin-Substitutionsmutanten

**[0125]** Die menschlichen EBNA 293-Zellen (Invitrogen, Carlsbad, CA, Chittenden, T. (1989) J. Virol. 63:

3016-3025) wurden als subkonfluente Kulturen in Dulbecco-modifiziertem Eagle-Medium, angereichert mit 10% fötalem Rinderserum, 2 mM Glutamin und 250 µg/ml Geneticin (Life Technologies, Gaithersburg, MD), erhalten. Die pDSW247-Expressionsplasmide wurden unter Verwendung des Lipofectamin-Protokolls (Gibco/BRL, Life Technologies) transient in EBNA 293-Zellen transfiziert. Konditioniertes Medium wurde 3-4 Tage nach der Transfektion geerntet, Zelldebris wurden durch Zentrifugation entfernt und die his-IFN-beta-Konzentration wurde durch ELISA quantifiziert.

**[0126]** Der ELISA-Test wurde unter Verwendung von polyclonalen Kaninchen-Antikörpern (Protein A-aufge-reinigtes IgG, die Antikörper sind gegen aufgereinigtes menschliches IFN-beta-1a erzeugt worden) durchgeführt, um ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen zu beschichten, und eine biotinylierte Form desselben polyclonalen Kaninchen-Ig wurde als ein sekundäres Reagenz verwendet, um den Interferon-Nachweis unter Verwendung der Streptavidin-verknüpften Meerrettich-Peroxidase (HRP: Jackson ImmunoResearch, W. Grove, PA) zu ermöglichen. Eine Verdünnungsreihe von Interferon-beta-1a (als AVONEX®, verkauft von Biogen, Inc.) wurde verwendet, um Standard-Konzentrationskurven herzustellen. Die his-IFN-beta-enthaltenden, konditionierten Medien von den transfizierten EBNA wurden verdünnt, um Proben mit Konzentrationen im Bereich zwischen 10 ng/ml und 0,3 ng/ml im ELISA-Test zu erhalten. Um die durch ELISA bestimmten Konzentrationen des IFN-beta in den Medien zu bestätigen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Reduzierte Kulturüberstände und IFN-beta-1a-Standards wurden einer SDS-PAGE auf 10-20%-Gradientengels (Novex, San Diego, CA) unterzogen und auf PVDF-Membranen geblottet. Immunreaktive Banden wurden mit einem polyclonalen Kaninchen-anti-IFN-beta-1a-Antiserum (#447, Biogen, Inc., ein zweites Antiserum, das gegen INF-beta-1a erzeugt worden war), gefolgt von einer Behandlung mit einem HRP-verknüpften Esel-anti-Kaninchen-IgG (Jackson ImmunoResearch, W. Grove, PA), nachgewiesen.

#### D. Bewerten der Interferon-beta-Mutanten für die Rezeptorbindung

**[0127]** Die Rezeptorbindungs-Eigenschaften der Interferon-beta-Mutanten, die in C beschrieben sind, wurden unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Bindungstests bewertet. Ein Test maß die Bindung der Interferon-beta-Mutanten an ein Fusionsprotein, IFNAR2/Fc, umfassend die extrazelluläre Domäne der menschlichen IFNAR2-Rezeptorkette, die an einen Teil der konstanten Region eines menschlichen IgG fusioniert ist. IFNAR2-Fc wurde in chinesischen Hamster-Ovar (CHO)-Zellen exprimiert und durch Protein A-Sepharose-Affinitätschromatographie gemäß den Anweisungen des Herstellers (Pierce Chem. Co., Rockford, IL, Katalog #20334) aufgereinigt. Die Bindung der Interferon-beta-Mutanten an IFNAR2-Fc wurde in einem ELISA-Format-test gemessen. ELISA-Platten wurden durch Beschichten von Platten mit 96 Vertiefungen mit flachen Böden über Nacht bei 4°C mit 50 µl/Vertiefung monoklonalem Maus-anti-menschliches IgG1-Antikörper (CDG5-AA9, Biogen, Inc.) zu 10 µg/ml in Beschichtungspuffer (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 9,6) hergestellt. Die Platten wurden zweimal mit PBS, enthaltend 0,05% Tween-20, gewaschen und mit 0,5% Magermilchpulver in PBS für 1 Stunde bei Zimmertemperatur blockiert. Nach weiteren zwei Waschschritten wurden 50 µl von 1 µg/ml IFNAR2-Fc in 0,5% Milch in PBS, enthaltend 0,05% Tween-20, zu jeder Vertiefung zugefügt und für 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert, und die Platten wurden dann noch zweimal gewaschen. Die Bindung der Interferon-beta-Mutanten an IFNAR2-Fc wurde durch Zugabe von 50 µl/Vertiefung mutantem Interferon-beta in konditionierten Medien, die in Dulbecco-modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), angereichert mit 10% fötalem bovinen Serum, reihenverdünnt wurden, und Inkubieren für 2 Stunden bei 4°C gemessen. Die Verdünnungen der Interferon-beta-Mutante war typischerweise im Bereich von ungefähr 1 µM bis hinunter zu 10 pM. Nach dem Waschen wurde das Interferon-beta, das an die Platten gebunden war, durch Zugabe von 50 µl/Vertiefung eines Cocktails, der aus einer 1:1000-Verdünnung eines polyclonalen Kaninchen-anti-Interferon-Antikörpers (#447, Biogen, Inc.) plus Meerrettich-Peroxidase (HRP)-markiertes Esel-anti-Kaninchen-IgG (Jackson ImmunoResearch) und Inkubieren für 15 Minuten bei 4°C nachgewiesen. Nach zwei Waschschritten wurde das HRP-Substrat zugegeben, und die Platte wurde bei 4°C inkubiert, bevor sie auf einem ELISA-Plattenlesegerät bei einer Absorption von 450 nm abgelesen wurde. Die Daten wurden als Absorption gegen die Konzentration von mutantem Interferon-beta aufgezeichnet, und die Affinität für die Bindung des mutanten Interferon-beta an IFNAR2-Fc wurde durch Anpassen der Daten an eine einfache hyperbolische Bindungsgleichung bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in [Fig. 3](#) gezeigt, in der die Bindungsaffinität für jede Mutante, die in Experimenten in dreifacher Ausführung bestimmt wurde, als ein Prozentsatz von jenem ausgedrückt wird, der für das Hiss-Wildtyp-Interferon-beta-1a gemessen wurde.

**[0128]** Ein zweiter Rezeptorbindungstest wurde verwendet, um die Affinität zu messen, mit der die Interferon-beta-Mutanten an Daudi-Zellen banden, die beide Rezeptorketten IFNAR1 und IFNAR2 exprimieren, die zusammen den Rezeptor für Interferon-beta umfassen. Dieser FACS-basierende Test verwendete einen monoklonalen, blockierenden Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne von IFNAR1, EA12 (Biogen, Inc.), gerichtet ist, um einen unbesetzten (freien) Rezeptor von einem Rezeptor zu unterscheiden, an den Interfe-

ron-beta gebunden war. Daudi-Zellen ( $20 \mu\text{l}$  zu  $2,5 \times 10^7$  Zellen/ml) wurden in ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen mit V-Boden platziert und für 1 Stunde bei  $4^\circ\text{C}$  mit verschiedenen Konzentrationen der Interferon-beta-Mutante ( $20 \mu\text{l}$  in FACS-Puffer; 5% FBS, 0,1%  $\text{NaN}_3$  in PBS) inkubiert. Wünschenswerte Reihenverdünnungen der Interferon-beta-Mutanten waren im Bereich von  $0,5 \mu\text{M}$  bis hinunter zu  $0,5 \text{ pM}$ . Zu jeder Vertiefung wurden 100 ng des monoklonalen, biotinylierten, murinen anti-IFNAR1-Antikörpers EA12 ( $10 \mu\text{l}$ ) zugefügt und die Platten für zusätzliche 2 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert, bevor sie zweimal mit FACS-Puffer ( $4^\circ\text{C}$ ) gewaschen wurden. Die Zellen wurden dann für 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  mit  $50 \mu\text{l}$ /Vertiefung einer 1:200-Verdünnung von R-Phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) inkubiert, zweimal in FACS-Puffer gewaschen, in  $300 \mu\text{l}$  FACS-Puffer, enthaltend 0,5% Paraformaldehyd, resuspendiert und in  $12 \times 75 \text{ mm}$  Polystyren-Röhrchen (Falcon 2052) transferiert. Die Proben wurden dann durch Durchfluss-Cytometrie auf einem FACScan (Becton Dickinson) analysiert. Die Daten wurden als durchschnittliche Kanalfluoreszenz-Intensität (MFCI) gegen die Konzentration der Interferon-beta-Mutante gezeichnet; die Bindungsaffinitäten wurden als die Konzentration der Interferon-beta-Mutante definiert, die 50% Inhibierung der Antikörperfärbung ergab. Jede Mutante wurde mehrere Male getestet. [Fig. 4](#) zeigt die Rezeptorbindungs-Affinitäten für jede Interferon-beta-Mutante, die durch dieses Verfahren bestimmt wurden, ausgedrückt als der Prozentsatz der Affinität, die für das Hiss-Wildtyp-Interferon-beta-1a in jedem Experiment gemessen wurde.

#### E. Bewerten der Funktion der Interferon-beta-Mutanten

**[0129]** Die Interferon-beta-Mutanten wurden auch auf ihre funktionelle Aktivität unter Verwendung von in vitro-Tests für eine antivirale Aktivität und auf die Fähigkeit des Interferon-beta, die Zellproliferation zu inhibieren, getestet. Ein Minimum von drei antiviralen Tests, jeder mit Datenpunkten in dreifacher Ausführung, wurde für jede Mutante durchgeführt. Das His<sub>6</sub>-Wildtyp-Interferon-beta-1a wurde als eine Bezugsquelle in jedem Experiment eingeschlossen. Die antiviralen Tests wurden durch Behandeln von menschlichen A549-Lungenkarzinomzellen (ATCC CCL 185) übernacht mit zweifachen Reihenverdünnungen des mutanten Interferon-beta in Konzentrationen, die den Bereich zwischen dem vollständigen antiviralen Schutz und keinem Schutz vor viraler Zelltötung umspannten, durchgeführt. Am folgenden Tag wurden die Zellen für zwei Tage mit dem Encephalomyocarditis-Virus (ECMV) in einer Verdünnung herausgefordert, die in vollständiger Zelltötung in der Abwesenheit von Interferon resultierte. Die Platten wurden dann mit dem metabolischen Farbstoff MTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid) (M5655, Sigma, St. Louis, MO) entwickelt. Eine Bestandslösung von MTT wurde zu  $5 \text{ mg/ml}$  in PBS hergestellt und steril filtriert, und  $50 \mu\text{l}$  dieser Lösung wurde in die Zellkulturen ( $100 \mu\text{l}$  pro Vertiefung) verdünnt. Nach einer Inkubation bei Zimmertemperatur für 30-60 Minuten wurde die MTT/Medien-Lösung verworfen, die Zellen wurden mit  $100 \mu\text{l}$  PBS gewaschen, und schließlich wurde der metabolisierte Farbstoff in  $100 \mu\text{l}$  1,2N Salzsäure in 90% Isopropanol gelöst.

**[0130]** Lebensfähige Zellen (durch die Anwesenheit des Farbstoffs nachgewiesen) wurden durch die Absorption bei  $450 \text{ nm}$  quantifiziert. Die Daten wurde durch Zeichnen der Absorption gegen die Konzentration der Interferon-beta-Mutante analysiert, und die Aktivität von jeder Mutante wurde als die Konzentration definiert, bei der 50% der Zellen getötet wurden. [Fig. 5](#) zeigt die Aktivität von jeder Mutante, ausgedrückt als ein Prozentsatz der Aktivität, die für his-markiertes Wildtyp-Interferon-beta-1a in jedem Experiment gemessen wurde.

**[0131]** Die Interferon-beta-Mutanten wurde auch auf ihre Funktion in einem Antiproliferations-Test bewertet. Menschliche Daudi Burkitt-Lymphomzellen (ATCC # CCL 213) wurden zu  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in RPMI 1620, ergänzt mit 10% definiertem fötalem Kälberserum (Hyclone, Logan, Utah) und 2 mM L-Glutamin, ausgesät. Jede Vertiefung enthielt auch eine bestimmte Konzentration der Interferon-beta-Mutante in einem endgültigen Gesamtvolumen von  $100 \mu\text{l}$  Medium pro Vertiefung; die verwendeten Interferon-beta-Konzentrationen wurden gewählt, um den Bereich von der maximalen Inhibition der Daudi-Zellproliferation bis zu keiner Inhibition (d.h. vollständige Proliferation) zu umspannen. Versuchsweite in doppelter Ausführung wurden für jede Konzentration der getestete Interferon-beta-Mutante verwendet, und ein doppelter Satz an unbehandelten Zellen wurde in allen Experimenten eingeschlossen. Die Zellen wurden für zwei Tage bei  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ -Brutschränken inkubiert, danach wurde  $1 \mu\text{Ci}$  pro Vertiefung von Tritium-behandeltem Thymidin ((methyl- $^3\text{H}$ )Thymidin, Amersham TRK758) in  $50 \mu\text{l}$  Medium zu jeder Vertiefung zugefügt und für weitere 4 h inkubiert. Die Zellen wurden unter Verwendung eines LKB-Platten-Erztegeräts geerntet, und die Inkorporierung von Tritium-behandeltem Thymidin wurde unter Verwendung eines LKB-beta-Plattenlesegeräts gemessen. Doppelte Versuchswerte wurden gemittelt und die Standardabweichungen bestimmt. Die Daten wurden als Durchschnittszählungen pro Minute gegen die Konzentration der Interferon-beta-Mutante gezeichnet, und die Aktivität jeder Mutante wurde als die Konzentration definiert, die benötigt wird, um 50% der maximal beobachteten Wachstumsinhibition zu ergeben. Mehrere Tests für jede Mutante wurden durchgeführt. [Fig. 6](#) zeigt die Ergebnisse, ausgedrückt als ein Prozentsatz der Aktivität, die für das his-markierte Wildtyp-Interferon-beta-1a in jedem Experiment gefunden wurde.

## F. Eigenschaften der Interferon-beta-Mutanten

**[0132]** Von Histidin-markiertem Wildtyp-Interferon-beta-1a wurde gefunden, dass es Aktivitäten in den antiviralen und Antiproliferations-Tests aufweist, die beide etwa 3-fach niedriger waren als die entsprechenden Aktivitäten, die für unmarkiertes Wildtyp-Interferon-beta-1a gefunden wurden. Da alle der Interferon-beta-Mutanten A1-E die identische his-Markierungssequenz an ihren N-Termini enthalten, wurden die Wirkungen der Mutationen auf die Eigenschaften des Moleküls durch Vergleichen der Aktivitäten dieser Mutanten in den antiviralen, Antiproliferations- und Bindungstests mit der Aktivität, die für das his-markierte Wildtyp-Interferon-beta-1a beobachtet wurde, bestimmt. Dadurch setzen wir voraus, dass Variationen in den Aktivitäten der Mutanten A1-E im Vergleich zum his-markierten Wildtyp-Interferon-beta-1a qualitativ und quantitativ etwa dieselben sind als die Wirkungen, die die selben Mutationen in der Abwesenheit der N-terminalen his-Markierung haben würden. Die entsprechende Annahme für markierte oder Fusionskonstrukte von anderen löslichen Cytokinen gilt im Allgemeinen für Praktiker der Technik der Alanin-Scanningmutagenese, besonders wenn die funktionelle *in vitro*-Aktivität des markierten oder Fusionskonstrukts nahe zu jenem des Wildtyp-Cytokins ist, wie es hier der Fall ist. Siehe zum Beispiel Pearce K.H. Jr, et al., J. Biol. Chem. 272:20595-20602 (1997) und Jones J.T., et al., J. Biol. Chem. 273:11667-11674 (1998).

**[0133]** Die Daten, die in den [Fig. 3-Fig. 6](#) gezeigt sind, legen drei Typen von Wirkungen nahe, die durch die gezielte Mutagenese verursacht werden. Diese Wirkungen können für die Interferon-Arzneistoff-Entwicklung unter bestimmten Umständen vorteilhaft sein. Die drei Typen der Wirkung sind wie folgt: (a) Mutanten mit einer höheren antiviralen Aktivität als jene des Wildtyp-Interferon-beta-1a (z.B. Mutante C1); (b) Mutanten, die eine Aktivität sowohl in den antiviralen als auch den Antiproliferations-Tests zeigen, aber für die die Antiproliferations-Aktivität im Bezug auf die antivirale Aktivität unverhältnismäßig niedrig im Vergleich zum Wildtyp-Interferon-beta-1a ist (z.B. Mutanten C1, D und DE1); und (c) funktionelle Antagonisten (z.B. A1, B2, CD2 und DE1), die antivirale und antiproliferative Aktivitäten zeigen, die im Bezug auf die Rezeptorbindung unverhältnismäßig niedrig im Vergleich zum Wildtyp-Interferon-beta-1a sind. Es wird ersichtlich, dass einige Mutanten in mehr als eine Klasse fallen. Diese Klassen werden unten besprochen. Während wir diese Klassen von Mutanten im Bezug auf jene aufgelisteten Beispiele charakterisiert haben, sollte es anerkannt werden, dass andere Mutationen in diesen Regionen in ähnlichen oder sogar verstärkten Wirkungen auf die Aktivität resultieren können:

a) Die Mutante C1 besitzt antivirale Aktivität, die ungefähr 6-fach größer als jene des his-markierten Wildtyp-Interferon-beta-1a ist. Für diese Mutante und andere dieses Typs wird vorhergesagt, dass sie im Reduzieren der Menge von Interferon-beta, das verabreicht werden muss, um einen bestimmten Spiegel der antiviralen Wirkung zu erzielen, nützlich sind. Vom Absenken der Menge des verabreichten Proteins wird erwartet, die Immunogenität des Proteins zu erniedrigen, und es kann auch Nebenwirkungen von nicht-Mechanismus-basierenden Toxizitäten reduzieren. Von Mutationen in dieser Klasse wird vorhergesagt, dass sie in Situationen, wo der therapeutische Nutzen der Interferon-beta-Verabreichung von ihren antiviralen Wirkungen resultiert und wo die antiproliferativen Wirkungen zu einer Toxizität oder zu unerwünschten Nebenwirkungen beitragen, vorteilhaft sind.

(b) Die relativen Aktivitäten (% vom Wildtyp) der Alanin-substituierten Mutanten im antiviralen und Antiproliferations-Test werden in [Fig. 7](#) verglichen. Koordiniert veränderte Aktivitäten (d.h. antivirale und Antiproliferations-Aktivitäten, die sich um denselben Faktor von den Aktivitäten des his-markierten Wildtyp-Interferon-beta-1a unterscheiden) werden in den meisten Mutanten gesehen (jene, die auf der diagonalen Linie liegen). Einige Mutanten zeigen jedoch größere Veränderungen der Aktivität in einem Test im Verhältnis zum anderen im Vergleich zum his-markierten Wildtyp-Interferon-beta-1a, was durch Entfernung von der Diagonalen deutlich wird. Drei solche Mutanten sind in der Tabelle unten gezeigt. Die Mutante C1 zeigt eine antivirale Aktivität, die ~6-fach höher als jene des his-markierten Wildtyp-Interferon-beta-1a ist, aber ihre Aktivität im Antiproliferations-Test ist ähnlich zu jener des Wildtyps. Die Mutante C1 hat daher eine antivirale Aktivität, die um einen Faktor von 5,2 über ihrer Antiproliferations-Aktivität im Verhältnis zum his-markierten Wildtyp-Interferon-beta-1a ist. In ähnlicher Weise zeigt die Mutante D 65% der Wildtyp-Aktivität im antiviralen Test, aber nur 20% der Wildtyp-Aktivität im Antiproliferations-Test und hat daher eine antivirale Aktivität, die 3,4-fach über ihre Antiproliferations-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp verstärkt ist. Die Mutante DE1 zeigt 26% der Wildtyp-Aktivität im antiviralen Test aber nur 8,5% im Antiproliferations-Test und hat daher eine antivirale Aktivität, die 3,0-fach über ihre Antiproliferations-Aktivität im Vergleich zum his-markierten Wildtyp-Interferon-beta-1a verstärkt ist. Wenn in einer Konzentration verabreicht, die ausreichend ist, um einen erwünschten Spiegel der antiviralen Aktivität zu erreichen, werden diese mutanten Proteine wesentlich niedrigere Spiegeln an antiproliferativer Aktivität als das Wildtyp-Protein zeigen. Von Mutationen in dieser Klasse, wie jenen in der Klasse (a), wird vorausgesagt, dass sie in Situationen vorteilhaft sind, in denen der therapeutische Nutzen der Interferon-beta-Verabreichung von ihren antiviralen Wirkungen resultiert und wo die antiproliferativen Wirkungen zu einer Toxizität oder zu unerwünschten Nebenwirkungen beitragen.

Mutante	Antivirale Aktivität (AV) (%) des Wildtyps)	Antiproliferative Aktivität (AP) (%) des Wildtyps)	AV/AP
C1	571	109	5,2
D	65	19	3,4
DE1	26	8,5	3,0

(c) Mutanten mit antiviralen und antiproliferativen Aktivitäten, die im Bezug auf die Rezeptorbindung im Vergleich zum his-markierten Wildtyp-Interferon-beta-1a niedrig sind (siehe Tabelle unten). Die Mutante A1 zeigt antivirale und antiproliferative Aktivitäten, die 2,0-fach und 1,8-fach höher als jene sind, die für his-markiertes Wildtyp-Interferon-beta-1a beobachtet werden, aber bindet an den verwandten Rezeptor auf Daudi-Zellen mit einer Affinität, die 29-mal höher ist als der Wildtyp. Die Bindung dieser Mutante an den IFN-beta-Rezeptor ist daher im Vergleich zu den antiviralen und Antiproliferations-Aktivitäten des Proteins ungefähr 15-fach verstärkt. In ähnlicher Weise zeigen die Mutanten B2, CD2 und DE1 4,6-, 4,6- beziehungsweise 18-fache Verstärkungen der Bindung über die antivirale Aktivität und 3,5-, 15- und 54-fach über die Antiproliferations-Aktivität. Von diesen Proteinen wird vorhergesagt, dass sie als funktionelle Antagonisten der Aktivität von endogenem IFN-beta und möglicherweise von anderen endogenen Typ I-Interferonen nützlich sind, da sie die Fähigkeit haben, den Rezeptor zu binden und zu besetzen, und dennoch nur einen kleinen Bruchteil der funktionellen Antwort in den Zielzellen herstellen, die mit dem Wildtyp-IFN-beta gesetzen werden würde.

Mutante	Antivirale Aktivität (AV)(% Wt)	Antiproliferative Aktivität (AP) (% Wt)	Zellbindungs-Aktivität (% Wt)	Bindung/AV	Bindung/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. Mutein-Verhältnis zur dreidimensionalen Struktur von Interferon

[0134] Während die veröffentlichten Kristallstrukturen für eine nicht-glycosyierte Form von murinem Interferon-beta (T. Senda, S. Saitoh und Y. Mitsui. Refined Crystal Structure of Recombinant Murine Interferon- $\beta$  at 2.15 Å Resolution. J. Mol. Biol. 253: 187-207 (1995)) und für menschliches Interferon-alpha-2b (R. Radhakrishnan, L.J. Walter, A. Hruza, P. Reichert, P.P. Trotta, T.L. Nagabhushan und M.R. Walter. Zinc Mediated Dimer of Human Interferon- $\alpha$ 2b Revealed by X-ray Crystallography. Structure. 4: 1453-1463 (1996)) Modelle für das Polypeptid-Gerüst von menschlichem Interferon-beta bereitgestellt hatten, haben wir vor kurzem die Struktur für das Interferon-beta-1a in seinem glycosylierten Zustand gelöst (M. Karpusas, M. Nolte, C.B. Benton, W. Meier, W.N. Lipscomb, und S.E. Goelz. The Crystal Structure of Human Interferon- $\beta$  at 2.2 Å Resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11813-11818 (1997)).

[0135] Die Ergebnisse unserer Mutations-Analysen können im Bezug auf die 3D-Struktur von Interferon-beta-1a zusammengefasst werden (hier nicht präsentiert). Bestimmte Mutationsreste erzeugten eine Verringerung der Aktivität (2- bis > 5-fach reduziert). Die mutierten Regionen entsprechen den Substitutionen, die in den Tabellen 1 und 2 angegeben sind.

[0136] Mutationen, die in ihrer Wirkung auf die Funktion am signifikantesten sind, resultierten in einer dramatischen Verringerung sowohl in der Aktivität als auch der Zelloberflächenrezeptor-Bindung. Mutationen in die-

ser Region (A2-Helix, AB- & AB2-Schleife und E-Helix) entsprechen den Mutationen in der IFNAR2-Bindungsstelle, da keine dieser Mutanten in unserem Test IFNAR/Fc band.

**[0137]** Während jene Mutationen, die für die IFNAR2-Bindung wichtig waren, auch die Zellbindung beeinflussten, wurden die Zelloberflächen-Bindungseigenschaften auch durch Reste in anderen Regionen des Moleküls (B1-Helix, C2-Helix) beeinflusst. Es kann in den 3D-Modellen (nicht gezeigt), die die Wirkungen der Alanin-Substitutionsmutanten darstellen, gesehen werden, dass die N-terminalen, C-terminalen und die glycosylierten C-Helixregionen des IFN-beta-1a-Moleküls nicht innerhalb der Rezeptor-Bindungsstelle liegen. Mutationen in diesen Regionen reduzierten nicht die biologische Aktivität oder reduzierten nicht die Zelloberflächenrezeptor-Bindung.

Beispiel 2: Konstruktion von Plasmiden für die Expression eines Interferon-beta-1a-Fusions (IFN-beta/Fc)-Proteins

**[0138]** Die PCR-Technologie wurde angewendet, um ein Expressionsplasmid zu erzeugen, das die menschliche IFN-beta-DNA-Sequenz, fusioniert an den Fc-Teil des murinen IgG2a-schwere Kette-Moleküls, codiert. Der Plasmidvektor pDSW247 (siehe Beispiel 1) ist ein Derivat von pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), von dem das EBNA-1-Gen deletiert worden ist. Dieses Plasmid wurde für die Konstruktion eines Expressionsvektors verwendet, der für die transiente Proteinexpression in menschlichen EBNA 293-Nierenzellen (Invitrogen, Carlsbad, CA., Shen. E. S., et al. 1995, Gene 156, 235-239) nützlich ist. Er wurde konstruiert, um eine menschliche vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-I (VCAM-I)-Signalsequenz im Rahmen und stromaufwärts der Interferon-beta-Sequenz und eine Enterokinase-Linkersequenz an der Verbindung der Interferon-beta- und Ig-Sequenzen zu enthalten.

**[0139]** Die Fusionsprotein-Expressionskassette wurde aus mehreren DNA-Fragmenten zusammengesetzt. Um ein DNA-Fragment zu erhalten, das das menschliche IFN-beta-Gen codiert, wurde der cDNA-Subclon von menschlichem IFN-beta (GenBank Zugangsnummer E00029) als eine Matrize für die PCR unter Verwendung der Primer (5'-GGTGGTCTCACATGAGCTACAACTTGCTTGGATTCCCTACAAAGAACG (SEQ ID NO: 31 „BET-025“) und 5'-GCCCTCGAGTCGACCTTGTCACTCGCTGTTGGAGGTAACCTGTAAG (SEQ ID NO: 32: „BET-026“) verwendet, die auch eine Restriktionsenzym-Spaltungsstelle (Bsal) stromaufwärts des ersten Codons des IFN-beta inkorporierten. Der 3'-PCR-Primer (SEQ ID NO: 32: BET-026) für das IFN-beta-Gen eliminierte das IFN-beta-Stoppcodon und inkorporierte sowohl eine im Rahmen-Enterokinase-Linkersequenz (DDDDK) als auch eine terminale Restriktionsenzym-Stelle (Xhol), die für das Subclonieren in den Expressionsvektor nützlich waren. Die Bsal-Stelle, die stromaufwärts der IFN-beta-codierenden Sequenz eingebracht wurde, erlaubte uns, die VCAM-1-Signalsequenz stromaufwärts und im Rahmen mit der IFN-beta-Gen-codierenden Sequenz zu ligieren. Diese VCAM-1-Signalsequenz wurde auch durch PCR unter Verwendung der Primerpaare 5'-CAAGCTGCTAGCGGCCGG-3' (SEQ ID NO: 33: "BET-023" 5'-GGTGGTCTCACATGGCTTGAGAAGCTGC-3' (SEQ ID NO: 34: "BET-024") die eine 5'-Restriktionsenzym-Spaltungsstelle (NotI, für die Ligierung auf die pDSW247-NotI-Clonierungsstelle) und eine 3'-Restriktionsenzym-Spaltungsstelle (Bsal, für die Ligierung auf das IFN-beta-1a-5'-PCR-Fragment) enthielten, hergestellt. Die Matrize für die PCR war das menschliche vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1)-cDNA (GenBank Zugangsnummer X53051).

**[0140]** Um das IFN-beta-1a/Fc-Fusionsgen zu bilden, wurden die folgenden Vorgangsweisen durchgeführt. Das murine IgG2a-Fragment wurde von pEAG293 durch Gel-Aufreinigung eines Sall + BamHI-Verdau-DNA-Fragments entfernt. Das Plasmid pEAG293 ist ein Bluescript IISK+ (Stratagene, LaJolla CA, Kata- lognummer 212205)-Subclon der Gelenks-, CH2- und CH3-Domänen des murinen IgG2a (GenBank Zugangsnummer V00798). Die PCR-Primerpaare 5'-AGGTSMARCTGCAGSAGTCW-3' (SEQ ID NO: 35), wobei S=C oder G, M=A oder C, R=A oder G, W=A oder T ist, und 5'-CTGAGCTCATTTACCCGGAGTCCGGGAGAAG-CTCTT-3' (SEQ ID NO: 36) bildeten flankierende Sall- und NotI-Stellen an den 5'- beziehungsweise 3'-Enden der Kassette. Die murine IgG2a-Fc-Domäne-Kassette unterscheidet sich von der GenBank-Sequenz an einer einzigen Base (Codon V369), was eine stille Mutation erzeugt. So wird das Wildtyp-Fc-Protein von dieser IgG2a-Fc-Kassette exprimiert.

**[0141]** Das DNA-Fragment, das die VCAM-1-Signalsequenz, fusioniert an das hIFN-beta-Gen, mit der C-terminalen Enterokinase-Linkersequenz enthält, wurde von pCMG258 durch einen NotI- bis BamHI-Verdau ausgeschnitten und Gel-aufgereinigt. Die Sall-Stelle war auf dem ursprünglichen pDSW247-Plasmid vorhanden und ist unmittelbar stromabwärts und im Rahmen mit der IFN-beta-Gen-codierenden Sequenz lokalisiert. Der Plasmidvektor pDSW247 wurde als ein Gel-aufgeregnetes NotI + BamHI-Fragment hergestellt (siehe Beispiel 1). Eine 3-Wege-Ligierung wurde unter Verwendung der oben erwähnten Fragmente durchgeführt, um den

endgültigen Expressionsvektor, der die IFN-beta-1a/IgG2a-Fusion codiert, zusammenzustellen. Dieses Expressionsplasmid wurde pCMG261 genannt und enthält die VCAM-1-Signalsequenz in einer Fusion mit dem Gen für das reife, menschliche IFN-beta, eine Enterokinase-Linkersequenz und die murine IgG2a-Fc-Domäne. Die vollständige DNA (SEQ ID NO:1) und Proteinsequenz (SEQ ID NO: 2) des Fusionsproteins sind in **Fig. 2** gezeigt.

#### Beispiel 3: Produktion eines Interferon-beta-1a-Fusionsproteins in Säugerzellen

**[0142]** Der rekombinante IFN-beta/Fc-Expressionsvektor pCMG261 wurde transient in menschliche EBNA 293-Nierenzellen transfiziert, um die Expression eines IFN-beta-1a-Fusionsproteins der Erfindung zu erreichen. Dieses rekombinante Expressionsplasmid wird durch das Lipofectamin-Protokoll (Katalognummer 18324-020, Life Technologies) in menschliche EBNA 283-Nierenzellen gemäß dem Protokoll des Herstellers (Life Technologies, Gaithersburg, MD, Hawley-Nelson, P., Ciccarone, V., Gebeyehu, G. Jesse, J., Felgner, P. L. (1993) Focus 15.73) unter Verwendung von 1-3 Microgramm Plasmid-DNA für eine 100mm-Kulturschale von EBNA 293-Zellen transfiziert. Am Tag nach der Lipofectamin-Transfektion der Zellen wird das Medium mit Wachstumsmedium (Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium, 10% fötales Rinderserum, 4mM Glutamin, 250 Microgramm Gentecin/ml (Life Technologies, Gaithersburg, MD) ersetzt. Das konditionierte Medium wird 3-4 Tage später geerntet und die Konzentration von IFN-beta-1a-Fc wurde, wie unten beschrieben, bestimmt.

**[0143]** Die Produktion eines IFN-beta/Fc-Fusionsproteins in anderen Säugerzell- und prokaryontischen Zell-expressionssystemen könnte auch beim Transfer der Protein-codierenden Region für das Fusionsprotein in geeignete Expressionsvektoren für jene Systeme durchgeführt werden. Alternative Expressionssysteme würden Säuger-Zellexpressionssysteme wie chinesische Hamster-Ovar (CHO)-Zellen (Barsoum, J. (1995, Methods in Mol. Biol. 48, Kapitel 18, 225-237) und murine NS-0-Zellen (Rossman, C. et al. 1996, Protein Expression and Pur. 7, 335-342) und COS7-Nierenzellen der grünen Meerkatze (Ettinger, R. et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:23, 13102-13107) einschließen. Andere eukaryontische Expressionssysteme, die anwendbar sein würden, würden die Hefe *Pichia pastoris* (Eldin, P. E. et al. 1997, J. Immun. Methods, 201, 67-75) und *Saccharomyces cerevisiae* (Horwitz, A. H., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8678-86682) sein.

**[0144]** Die Quantifizierung der Expressionsspiegel des IFN-beta-1a-Fc-Proteins in den Kulturüberständen von transfizierten EBNA 293-Zellen wurde durch ELISA unter Verwendung einer Protein A-aufgereinigten IgG-Faktion von polyclonalen Kaninchen-anti-IFN-beta-1a-Antikörpern (das Antigen war aufgereinigtes IFN-beta-1a, Biogen, Inc.), zur Beschichtung von Platten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Der Antikörper weist IFN-beta-1a-Standards und Kulturüberstände in einem Interferon-Konzentrationsbereich zwischen 10ng/mL und 0,3ng/mL nach. Biotinyliertes, polyclonales Kaninchen-anti-IFN-beta-1a (dieselben Antikörper wie oben) und Streptavidin-verknüpfte Meerrettich-Peroxidase wurden verwendet, um gebundene Interferone nachzuweisen. Um die ELISA-Werte zu bestätigen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt, in der reduzierte Kulturüberstände und IFN-beta-1a-Standards auf 5-20% Tris-Glycin-Gelen (Novex, San Diego, CA) laufengelassen, auf eine PVDF-Membran (Amersham Life Science, Inc., Cleveland, OH) transferiert und mit einem anderen polyclonalen Kaninchen-Serum (gegen IFN-beta-1a errichtet), gefolgt von Meerrettich-Peroxidase-gebundenen Esel-anti-Kaninchen-IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)-Antikörpern nachgewiesen wurden.

#### Beispiel 4: Antivirale Aktivität des IFN-beta-1a/murinen IgG2a-Fusionsproteins

**[0145]** Menschliche Lungenkarzinomzellen (A549) wurden für 24 Stunden mit IFN-beta-1a oder IFN-beta-murinen IgG2a (61, 41, 27, 18, 12, 8,2, 5,5, 3,7, 2,5, 1,6 pg/mL) vor der Herausforderung mit dem Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) vorbehandelt. Nach einer zweitägigen Inkubation mit dem Virus wurden lebensfähige Zellen mit einer Lösung von XTT:PMs (2,3-bis(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-innenes Salz:Phenazinmethosulfat zu 333µg/mL beziehungsweise 2 ng/mL in phosphatgepufferter Salzlösung) gefärbt und durch Spektroskopie bei 450 nM nachgewiesen. Der Test wurde unter Verwendung von Datenwerten in dreifacher Ausführung für jede IFN-Konzentration durchgeführt.

**[0146]** In **Fig. 8** sind die Standardabweichungen als Fehlerbalken gezeigt. Die 50%-cytopathische Wirkung für IFN-beta-1a wurde bestimmt, dass sie ungefähr 0,4 pM ist. Für die 50%-cytopathische Wirkung für IFN-beta-murines IgG2a wurde gefunden, dass sie 0,15 pM ist.

Beispiel 5: Konstruktion und Produktion eines menschlichen Interferon-beta-1a/menschlichen IgG1-Fc-Fusionsproteins

#### A. Konstruktion eines menschlichen Interferon-beta-1a/menschlichen IgG1-Fc-Fusionsproteins

**[0147]** Die PCR-Technologie wurde angewendet, um ein Expressionsplasmid zu bilden, das die menschliche IFN-beta-DNA-Sequenz, fusioniert an den Fc-Teil (Gelenks-, CH2- und CH3-Domänen) des menschlichen IgG1-schwere Kette-Moleküls, codiert.

**[0148]** EBNA-Konstrukt: Der Plasmidvektor pCH269 ist ein Derivat von pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), von dem das EBNA-1-Gen deletiert worden ist. Das Plasmid wurde für die Konstruktion eines Expressionsvektors verwendet, der für die transiente Proteinexpression in menschlichen EBNA 293-Nierenzellen (Invitrogen, Carlsbad, CA; Shen E.S., et al. 1995, Gene 156, 235-239) nützlich ist.

**[0149]** Die Fusionsprotein-Expressionskassette wurde aus drei DNA-Fragmenten zusammengestellt: einem Not I/Sal I-Fragment, das die VCAM-1-Signalsequenz im Rahmen und fusioniert an die Sequenz codiert, die das menschliche IFN-beta codiert, einem Sal I/Not I-Fragment, das die Gelenks-, CH2- und CH3-Domänen von menschlichem IgG1 codiert, und einem Not I-Fragment des EBNA-Expressionsvektors pCH269.

**[0150]** Zwei eindeutige Not I/Sal I-Fragmente, die die reife VCAM-1-Signalsequenz im Rahmen und fusioniert an das menschliche IFN-beta-Gen codiert, wurden durch die PCR-Technologie erzeugt. Die PCR-Matrize war das Plasmid pCMG258 (siehe Beispiel 2 oben), das die reife VCAM-1-Signalsequenz im Rahmen und fusioniert an das menschliche IFN-beta-Gen codiert, das selbst im Rahmen und fusioniert an die Enterokinase-Linkersequenz ist. Zwei Sätze von PCR-Primern wurden verwendet. Ein Satz von Primern (5'-AGCTTGCTAG-CGGCCGCGGCCACTGGCTTCA-3' (SEQ ID NO: 37), und 5'-ATACGCGTCGACGTTCGGAGGTAA-CATGTAAGTCTG-3': (SEQ ID NO: 38)) brachte eine Aminosäure-Änderung von G zu C an Position 162 ein. Dieses Fragment wird menschliches IFN-beta-C162 genannt.

**[0151]** Der zweite Primersatz (5'-AGCTTGCTAGCGGCCGCGCCTCACTGGCTTCA-3'(SEQ ID NO: 39) und 5'-TACACGTCGACGCTGCCACCACCGCCGTTCGGAGGTAAATGTAAGTCTG-3': SEQ ID NO: 40) brachte auch die G162 zu C162-Aminosäure-Substitution ein und änderte die Enterokinase-Linkersequenz (DDDDK) zu einer GGGGS-Linkersequenz im Rahmen und 3'-fusioniert an das menschliche IFN-beta-Gen. Dieses Fragment wird menschliches IFN-beta-C162/G4S genannt. Beide Primersätze enthalten eine 5'-Not I-Stelle, um die Ligierung in pCH269 zu ermöglichen, und eine 3'-Sal I-Spaltungsstelle, um die Ligierung mit dem Sal I/Not I-Fragment des menschlichen IgG1 zu ermöglichen.

**[0152]** Das menschliche IgG1-Fragment, das die Gelenks-, CH2- und CH3-Domänen des menschlichen IgG1 codiert, wurde durch Restriktionsenzym (Sal I/Not I)-Verdau von Plasmid pEAG409, einem Derivat von Plasmid SAB144 (beschrieben im U.S.-Patent 5,547,853), hergestellt. Das Fragment wurde ausgeschnitten und Gelaufgereinigt. Das EBNA-Expressionsvektorplasmid pCH269 wurde mit Not I verdaut und Gel-aufgereinigt.

**[0153]** Zwei menschliche IFN-beta-menschliches IgG1-Fc-Fusionskonstrukte wurden durch zwei drei-Wege-Ligierungen hergestellt. Ein Konstrukt, genannt ZL6206, enthält den G4S-Linker; das andere Konstrukt, genannt ZL5107, ist eine direkte Fusion. Die vollständigen DNA- und Proteinsequenzen der offenen Leserahmen der direkten Fusion (siehe [Fig. 10](#)) sind in SEQ ID NO: 41 beziehungsweise SEQ ID NO:42 gezeigt. Die vollständigen DNA- und Proteinsequenzen der offenen Leserahmen der Linkerfusion (siehe [Fig. 11](#)) sind in SEQ ID NO: 43 beziehungsweise SEQ ID NO: 44 gezeigt.

#### CHO-Konstrukt:

**[0154]** Ein stabiles, menschliches IFN-beta-menschliches IgG1-Fc-Fusions-CHO-Expressionskonstrukt wurde hergestellt, das das menschliche IFN-beta, direkt an das menschliche IgG1-Fc gebunden, umfasste. Das menschliche IFN-beta-menschliches IgG1-Fc-Fragment wurde aus dem Plasmid ZL5107 mit NotI ausgeschnitten und Gelaufgereinigt; es wurde in die Not 1-Stelle von pEAG347 ligiert (ein Expressionsvektor, der die frühen SV40- und späten Adenovirus-Hauptpromotoren [abgeleitet vom pAD2beta-Plasmid] in Tandemformation, eine einzigartige NotI-Clonierungsstelle, gefolgt von den späten SV40-Transkriptionsterminierungs- und polyA-Signalen [abgeleitet vom pCMVbeta-Plasmid] enthält. pEAG347 enthält ein pUC19-abgeleitetes Plasmidgerüst und eine pSV2dhfr-abgeleitete dhfr für die MTX-Selektion und Amplifikation in transfizierten CHO-Zellen.).

## B. Produktion eines menschlichen Interferon-beta-1a/menschliches IgG1-Fc-Fusionsproteins in Säugerzellen

Transiente Transfektion von menschlichen IFN-beta-Fusionskonstrukten in EBNA293-Zellen:

**[0155]** Die rekombinanten IFN-beta/menschliches IgG1-Fc-Expressionsvektoren, die oben beschrieben sind, wurden transient in menschliche EBNA 293-Nierenzellen transfiziert, um die Expression eines IFN-beta-1a-Fusionsproteins der Erfindung zu erreichen. Diese rekombinanten Expressionsplasmide wurden durch das Lipofectamin-Protokoll (Katalognummer 18324-020, Life Technologies) in menschliche EBNA 293-Nierenzellen gemäß dem Protokoll, das oben im Beispiel 3 beschrieben ist, transfiziert.

Stabile Transfektion des menschlichen IFN-beta-1a/menschliches IgG1-Fc-Fusionskonstrukts (kein Linker) in dhfr- CHO-Zellen:

**[0156]** Der rekombinante IFN-beta/menschliches IgG1-Fc (ohne Linker), dhfr-enthaltende Expressionsvektor, der oben beschrieben wird, wurde stabil in dhfr-CHO-Zellen transfiziert, um die Expression eines IFN-beta-1a-Fusionsproteins der Erfindung zu erreichen. Dieses rekombinante Expressionsplasmid wurde durch Elektroporation transfiziert, und die Selektion von positiven Clonen wurde gemäß dem folgenden Protokoll erreicht:

Plasmid-DNA (20 µg), die mit Bgl II verdaut wurde, wurde präzipitiert, in 800 µl HEPES-Puffer resuspendiert und zu  $10 \times 10^7$  CHO-Zellen/ml zugefügt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in komplettem DMEM-Medium für 2 Tage kultiviert. Die Zellen wurden dann in 20-40 10 cm-Schalen mit komplettem DMEM/10% dialysiertem FBS geteilt und für 5 Tage kultiviert, bevor die Zellen für zwei Wochen in Selektionsmedium mit sich erhöhenden (50-200 ng/ml) Konzentrationen von MTX in DMEM übertragen wurden. Am Ende der zwei Wochen wurden einzelne Kolonien von Zellen selektiert und vermehrt. Überstände, die von 22 CHO-Clonen stammen, wurden in antiviralen Tests getestet.

## Aktivität:

**[0157]** Die antivirale Aktivität der Fusionsproteine wurde in CPE-Tests, wie im Beispiel 4 beschrieben, bestimmt. Basierend auf der 60 MU/mg spezifischen Aktivität des Interferon-beta-1a-Standards, der im Test verwendet wurde, war die Aktivität des transient (EBNA) exprimierten, menschlichen Interferon-beta-1a/menschliches IgG1-Fc-Proteins mit dem Verknüpfung 900 E/ml, und die Aktivität ohne einen Linker war 440 E/ml. Die Aktivität des CHO-exprimierten, menschlichen Interferon-beta-1a/menschliches IgG1-Fc-Fusionsproteins war 50 E/ml.

Beispiel 6: Messung der antiviralen Interferon-beta-1a-Aktivität im Plasma von Mäusen, die mit Interferon-beta-1a und dem Interferon-beta-1a/murines IgG2a-Fusionsprotein behandelt wurden

**[0158]** Mäuse (C57/B16) wurden i.v. durch die Schwanzvene mit 50 000 Einheiten Interferon-beta-1a (Hauptmasse) oder 5 000 Einheiten Interferon-beta-1a-murines IgG2a-Fusionsprotein injiziert. Ein gleiches Volumen Phosphatpuffer wird als eine Kontrolle gegeben.

**[0159]** Eine Blutprobe wird durch retro-orbitale Blutentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten (sofort, 0,25, 1, 4, 24 und 48 Stunden) nach der Interferon-beta-Injektion gezogen. Es gibt mindestens 3 Mäuse pro Zeitpunkt. Vollblut wird in Röhrchen, die einen Gerinnungshemmer enthalten, gesammelt, die Zellen werden entfernt, und das resultierende Plasma wird bis zum Zeitpunkt des Tests eingefroren. Die Plasmaproben werden 1:10 in Serum-freies Testmedium verdünnt und durch einen 0,2-µm-Spritzenfilter passiert.

**[0160]** Die verdünnten Proben werden dann in bestimmte Vertiefungen einer Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen, enthaltend A549-Zellen, titriert. Ein Standard-Interferon-beta-1a (10, 6,7, 4,4, 2,9, 1,3, 0,9 und 0,6 E/ml AVONEX) und 4 Proben wurden auf jeder Platte laufen gelassen. Die Zellen werden mit den Proben für 24 Stunden vor der Herausforderung mit EMC-Virus vorbehandelt. Nach einer zweitägigen Inkubation mit dem Virus werden die lebensfähigen Zellen mit einer Lösung von MTT (zu 5 mg/ml in Phosphatpuffer) für 1 Stunde gefärbt, mit Phosphatpuffer gewaschen und mit 1,2N HCl in Isopropanol gelöst. Die Vertiefungen wurden bei 450 nm abgelesen. Standardkurven werden für jede Platte hergestellt und verwendet, um die Menge der Interferon-beta-1a-Aktivität in jeder Probe zu bestimmen. Die Aktivität in den Proben von den verschiedenen Mäusen sind in [Fig. 9](#) gegen die Zeitpunkte graphisch dargestellt.

**[0161]** Der langsamere Verlust der Interferon-beta-1a-Fusion aus dem Kreislauf als eine Funktion der Zeit weist darauf hin, dass die Halbwertszeit der Fusionsprotein-Probe viel länger ist als jene der unmodifizierten

Interferon-beta-1a-Kontrolle. Ein zweites hochsignifikantes Ergebnis der Studie war, dass sehr wenig des Fusionsproteins während der Verteilungsphase verloren ging, was durch die ähnlich hohen Spiegel der Aktivität bei den Zeitpunkten 15 und 60 Minuten deutlich wird. Die Daten weisen darauf hin, dass die Verteilung des Interferon-beta-1a-Fusionsproteins im Gegensatz zum Kontroll-Interferon-beta-1a zum Großteil auf das Gefäßsystem beschränkt ist.

Beispiel 7: Vergleichende Pharmakokinetik und Pharmakodynamik in Primaten

**[0162]** Vergleichsstudien werden mit der Interferon-beta-1a-Fusion und natürlichem Interferon-beta-1a (als nicht-formuliertes Massenzwischenprodukt AVONEX® Interferon-beta-1a in 100 mM Natriumphosphat, 200 mM NaCl, pH 7,2) durchgeführt, um ihre relative Stabilität und Aktivität in Primaten zu bestimmen. In diesen Studien wird die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Interferon-beta-1a-Fusion in Primaten mit jener des natürlichen Interferon-beta-1a verglichen, und sinnvolle Rückschlüsse können auf Menschen ausgedehnt werden.

Tiere und Verfahren

Versuchsaufbau

**[0163]** Dies ist eine Parallelgruppen-, wiederholte Dosierungsstudie, um die vergleichende Pharmakokinetik und Pharmakodynamik des Interferon-beta-1a-Fusionsproteins und des nicht-Fusions-Intereron-beta-1a zu bewerten.

**[0164]** Gesunde Primaten (vorzugsweise Rhesusaffen) werden für diese Studie verwendet. Vor der Dosierung werden alle Tiere auf Zeichen einer Krankheit durch eine Labortier-Veterinär an zwei Gelegenheiten innerhalb von 14 Tagen vor der Testartikel-Verabreichung bewertet; eine Bewertung muss innerhalb von 24 Stunden vor der ersten Testartikel-Verabreichung sein. Nur gesunde Tiere werden den Testartikel erhalten. Die Bewertungen werden eine allgemeine ärztliche Untersuchung und Blutprobennahmen vor der Dosierung für eine klinische Basis-Pathologie und einen Basis-Antikörperspiegel gegenüber Interferon-beta-1a einschließen. Alle Tiere werden gewogen werden, und die Körpertemperaturen werden innerhalb von 24 Stunden vor den Testartikel-Verabreichungen aufgezeichnet werden.

**[0165]** Zwölf Individuen sind eingeschrieben und zu Gruppen von drei zugeteilt, um 1 ME/kg Interteron-beta-1a entweder als fusioniertes oder nicht-fusioniertes, aber sonst identisches Interferon-beta-1a zu erhalten. Die Verabreichung erfolgt entweder auf den subcutanen (SC) oder intravenösen (IV) Wegen. Sechs männliche Tiere werden den Testartikel auf dem IV-Weg (3/Behandlung) erhalten, und weitere 6 männliche Tiere werden den Testartikel auf dem SC-Weg (3/Behandlung) erhalten. Alle Tiere müssen naiv gegenüber der Interferon-beta-Behandlung sein. Jedes Tier wird an zwei Gelegenheiten dosiert werden; die Dosen werden durch vier Wochen getrennt sein. Das Dosisvolumen wird 1,0 mL/kg sein.

**[0166]** Blut wird für pharmakokinetische Tests 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach jeder Injektion gezogen. Blutproben für Messungen des Markers für die Interferon-induzierten biologischen Antwort, Serum-Neopterin, werden 0, 24, 48, 72, 96, 168, 336, 504 Stunden nach der Verabreichung des Studienarzneistoffs gezogen.

**[0167]** Bewertungen während des Studienzeitraums schließen klinische Beobachtungen auf Zeichen einer Toxizität ein, die 30 Minuten und 1 Stunde nach der Dosierung durchgeführt werden. Tägliche Beobachtungen im Käfig werden durchgeführt und das allgemeine Erscheinungsbild, Zeichen einer Toxizität, Unbehagen und Änderungen im Verhalten werden aufgezeichnet werden. Körpergewichte und Körpertemperaturen werden in regelmäßigen Abständen über 21 Tage nach der Dosierung aufgezeichnet werden.

Testverfahren

**[0168]** Die Interferon-beta-Spiegel im Serum werden unter Verwendung eines biologischen Tests auf eine cytopathischen Wirkung (CPE) quantifiziert. Der CPE-Test misst die Spiegel der Interferon-vermittelten antiviralen Aktivität. Der Spiegel der antiviralen Aktivität in einer Probe reflektiert die Zahl an Molekülen von aktivem Interferon, die in dieser Probe zur Zeit der Blutentnahme enthalten ist. Diese Methode war das Standardverfahren, um die Pharmakokinetik von Interferon-beta zu bewerten. Der CPE-Test, der in der derzeitigen Studie verwendet wird, weist die Fähigkeit von Interferon-beta nach, menschliche Lungenkarzinomzellen (A549, #CCL-185, ATCC, Rockville, MD) vor einer Cytotoxizität aufgrund des Encephalomyocarditis (EMC)-Virus zu

schützen. Die Zellen werden für 15 bis 20 Stunden mit Serumproben vorinkubiert, um die Induktion und Synthese von Interferon-induzierbaren Proteinen, die dann eine antivirale Antwort errichten, zu erlauben. Danach wird das EMC-Virus zugefügt und für weitere 30 Stunden inkubiert, bevor die Bewertung der Cytotoxizität unter Verwendung einer Kristallviolett-Färbung gemacht wird. Ein interner Interferon-beta-Standard sowie ein interner Interferon-beta-Ig-Standard wird gleichzeitig mit den Proben auf jeder Testplatte getestet. Dieser Standard wird gegen einen natürlichen, menschlichen Fibroblasten-Interferon-Bezugsstandard (WHO Zweiter Internationaler Standard für Interferon, Menschlicher Fibroblast, Gb-23-902-53) kalibriert. Jede Platte schließt auch Zellwachstumskontroll-Vertiefungen, die weder Interferon-beta von irgendeiner Art noch EMC enthalten, und Viruskontroll-Vertiefungen, die Zellen und EMC, aber kein Interferon-beta enthalten, ein. Kontrollplatten, die den Standard und Proben enthalten, werden auch hergestellt, um die Wirkung, wenn überhaupt vorhanden, der Proben auf das Zeltwachstum festzustellen. Diese Platten werden ohne die Zugabe von Virus gefärbt.

**[0169]** Proben und Standards werden in doppelter Ausführung auf jeder der zwei Wiederholungs-Testplatten getestet, was vier Datenpunkten pro Probe ergibt. Die geometrische Durchschnittskonzentration der vier Wiederholungen wird angegeben. Die Nachweisgrenze in diesem Test ist 10 Einheiten (E/ml).

**[0170]** Die Serumkonzentrationen von Neopterin werden in der klinischen Pharmakologie-Einheit unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Tests bestimmt.

#### Pharmakokinetische und statistische Verfahren

**[0171]** Die Rstrip™-Software (MicroMath, Inc., Salt Lake City, UT) wird verwendet, um Daten an pharmakokinetische Modelle anzupassen. Geometrische Durchschnittskonzentrationen werden pro Zeiteinheit für jede Gruppe dargestellt. Da die Testergebnisse in Verdünnungen ausgedrückt werden, werden die geometrischen Mittelwerte als geeigneter als arithmetischen Mittelwerte angesehen. Die Serum-Interferonspiegel werden auf Basiswerte angepasst, und nicht-nachweisbare Serumkonzentrationen werden auf 5 E/ml gesetzt, was der Hälfte der unteren Nachweisgrenze entspricht.

**[0172]** Für die IV-Infusions-Daten wird ein zwei-Kompartiment IV-Infusionsmodell an die nachweisbaren Serumkonzentrationen für jedes Individuum angepasst, und die SC-Daten werden an ein zwei-Komponent-Injektionsmodell angepasst.

**[0173]** Die folgenden pharmakokinetischen Parameter werden berechnet:

- (i) die beobachtete Spitzenkonzentration,  $C_{\max}$  (E/ml);
- (ii) die Fläche unter der Kurve von 0 bis 48 Stunden, AUC unter Verwendung der trapezförmigen Regel;
- (iii) Eliminations-Halbwertszeit;

und von den IV-Infusionsdaten (wenn IV angewendet wird):

- (iv) die Verteilungs-Halbwertszeit (h);
- (v) die Beseitigung (ml/h)
- (vi) das scheinbare Verteilungsvolumen  $V_d$  (L).

**[0174]** Die WinNonlin (Version 1.0, Scientific Consulting Inc., Apex, NC)-Software wird verwendet, um die Eliminations-Halbwertszeiten nach SC- und IM-Injektion zu berechnen.

**[0175]** Für Neopterin sind die arithmetischen Mittel pro Zeit für jede Gruppe dargestellt.  $E_{\max}$ , die maximale Änderung von der Basislinie, wird berechnet.  $C_{\max}$ , AUC und  $E_{\max}$  werden einer Einweg-Varianzanalyse zugrundegelegt, um die Dosierungsgruppen zu vergleichen.  $C_{\max}$  und AUC werden vor der Analyse logarithmisch transformiert; die geometrischen Mittel werden angegeben.

Beispiel 8: Anti-angiogenetische Wirkungen der Interferon-beta-1a-Fusion Beurteilung der Fähigkeit einer Interferon-beta-1a-Fusion, eine endotheliale Zellproliferation in vitro zu inhibieren

**[0176]** Menschliche, venöse Endothelzellen (Cell Systems, Kat. # 2V0-P75) und menschliche, dermale, mikrovaskuläre Endothelzellen (Cell Systems, Kat. # 2M1-C25) werden mit einem CS-C-Medium-Kit (Cell Systems, Kat. # 4Z0-500) in Kultur gehalten. Vierundzwanzig Stunden vor dem Experiment werden die Zellen trypsinisiert und im Testmedium, 90% M199 und 10% fötales bovin Serum (FBS), resuspendiert und auf die gewünschte Zelldichte angeglichen. Die Zellen werden dann auf Gelatine-beschichtete Platten mit 24 oder 96 Vertiefungen entweder zu 12 500 Zellen/Vertiefung oder 2 000 Zellen/Vertiefung plattiert.

**[0177]** Nach einer Inkubation übernacht wird das Testmedium durch frisches Medium, welches 20 ng/ml eines menschlichen, rekombinanten, basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (Becton Dickinson, Kat. # 40060) und verschiedene Konzentrationen von Fusions- und nicht-Fusions-Interferon-beta-1a-Proteinen oder die Positivkontrolle (Endostatin so wie ein Antikörper gegen bFGF kann als eine Positivkontrolle verwendet werden) enthält, ersetzt. Das endgültige Volumen wird auf 0,5 ml in den Platten mit 24 Vertiefungen oder 0,2 ml in den Platten mit 96 Vertiefungen angepasst.

**[0178]** Nach 72 Stunden werden die Zellen für die Coulter-Zählung trypsinisiert, für CyQuant-Fluoreszenz-Ablesung eingefroren oder mit [3H]-Thymidin markiert.

**[0179]** Dieser in vitro-Test testet die menschlichen Interferon-beta-Moleküle der Erfindung auf die Wirkungen auf endotheliale Zellproliferation, die für anti-angiogenetische Wirkungen in vivo hinweisend sein können. Siehe O'Reilly, M.S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukal, G. Vasios, W. Lane, E. Flynn, J. Birkhead, B. Olsen und J. Folkman. (1997). Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. Cell 88, 277-285.

Beispiel 9: In vivo-Modell, um die anti-angiogenetischen und Neovaskularisierungs-Wirkungen der Interferon-beta-1a/Ig-Fusion zu testen

**[0180]** Eine Vielzahl von Modellen sind entwickelt worden, um auf die anti-angiogenetischen und anti-Neovaskularisierungs-Wirkungen der hier beschriebenen Moleküle zu testen. Einige dieser Modelle sind in den Patenten 5,733,876 (31. März, 1998: „Method of inhibiting angiogenesis“) und 5,135,919 (4. Aug., 1992: „Method and a pharmaceutical composition for the inhibition of angiogenesis“) der Vereinigten Staaten beschrieben worden. Andere Tests schließen den schalenlosen Chorioallantois-Membran (CAM)-Test von S. Taylor und J. Folkman; Nature, 297, 307 (1982) und R. Crum. S. Szabo und J. Folkman; Science. 230. 1375 (1985); das dorsale Maus-Luftsack-Verfahren-Angiogenese-Modell von Folkman, J. et al.; J.Exp.Med., 133, 275 (1971) und den cornealen Ratten-Mikrotaschen-Test von Gimbrone, M. A. Jr. et al., J. Natl. Cancer Inst. 52, 413 (1974) ein, in dem die corneale Vaskularisierung in erwachsenen, männlichen Ratten des Sprague-Dawley-Stamms (Charles River, Japan) durch Implantieren von 500 ng basischem FGF (bovin, R & D Systems, Inc.), getränkt in EVA (Ethylenvinylacetat-Copolymer)-Pellets, in jede Cornea implantiert wird.

**[0181]** Andere Verfahren zum Testen von Interferon-beta/Ig-Fusionen auf anti-angiogenetische Wirkungen in einem Tiermodell schließen (sind aber nicht darauf beschränkt) Protokolle zum Screenen von neuen potenziellen anti-Krebsmitteln, wie in den ursprünglichen Cancer Chemotherapy Reports, Teil 3, Bd. 3, Nr. 2, September 1972 und in der Ergänzung In Vivo Cancer Models, 1976-1982, NIH-Veröffentlichung Nr. 84-2635, Februar 1984 beschrieben, ein. Aufgrund der Speziesbeschränkungen von Typ I-Interferonen, wurden Nager-Interferon-beta/Ig-Fusions-Präparate hergestellt, um die anti-angiogenetische Aktivität von Interferon-beta-Fusionen in Nagermodellen zu bewerten. Solche Screening-Verfahren sind durch ein Protokoll, um auf die anti-angiogenetischen Wirkungen von murinen Interferon-beta/Ig-Fusionen auf ein subcutan implantiertes Lewis-Lungenkarzinom zu testen, beispielhaft dargestellt.

Ursprung der Tumorlinie:

**[0182]** Entstand spontan in 1951 als ein Karzinom der Lunge in einer C57BL/6-Maus. Zusammenfassung der Test-Vorgehensweisen: Ein Tumorträger wird subcutan in die Achselregion einer B6D2F1-Maus implantiert. Das Testmittel (d.h. ein Fusionsprotein der Erfindung) wird in verschiedenen Dosen subcutan (SC) oder intraperitoneal (IP) an mehreren Tagen nach der Tumorimplantation verabreicht. Der gemessene Parameter ist die mittlere Überlebenszeit. Die Ergebnisse sind als Prozentsatz der Kontroll-Überlebenszeit ausgedrückt.

Tiere:

Vermehrung: C57BL/6-Mäuse.

Untersuchung: B6D2F1-Mäuse.

Gewicht: Die Mäuse sollten innerhalb eines 3 g-Gewichtsbereichs mit einem minimalen Gewicht von 18 g für männliche und 17 g für weibliche Tiere liegen.

Geschlecht: Ein Geschlecht wird für alle Test- und Kontrolltiere in einem Experiment verwendet.

Quelle: Eine Quelle, wenn machbar, für alle Tiere in einem Experiment.

Experiment-Größe:

Zehn Tiere pro Testgruppe.

Tumor-Transfer:

VERMEHRUNG:

Fragment: Stelle ein 2-4 mm-Fragment eines s.c.-Spendertumors her

Zeit: Tag 13-15

Stelle: Implantiere das Fragment s.c. in der Achselregion, mit einer Punktionsöffnung in der Leistenregion.

UNTERSUCHUNG:

Fragment: Stelle ein 2-4 mm-Fragment eines s.c.-Spendertumors her.

Zeit: Tag 13-15.

Stelle: Implantiere das Fragment s.c. in der Achselregion, mit einer Punktionsöffnung in der Leistenregion.

Untersuchungszeitplan:

Tag 0: Implantiere den Tumor. Lege Bakterienkulturen an. Teste positive Kontrollverbindung in jedem ungerad-zahligen Experiment. Stelle Materialien her. Berichte Todesfälle täglich.

Tag 1: Kontrolliere die Kulturen. Verwerfe das Experiment, wenn es kontaminiert ist. Ordne die Tiere willkürlich an. Behandle, wie angeordnet (am Tag 1 und an den folgenden Tagen).

Tag 2: Kontrolliere wieder die Kulturen. Verwerfe das Experiment, wenn es kontaminiert ist.

Tag 5: Wiege Tag 2 und den Tag der ersten Testagens-Toxizitätsbeurteilung ab.

Tag 14: Tag des frühzeitigen Todes für Kontrollen.

Tag 48: Tag an dem keine Kontrollen genommen werden.

Tag 60: Beende und beurteile das Experiment. Untersuche die Lungen grob auf einen Tumor.

Qualitätskontrolle:

**[0183]** Plane die Positivkontroll-Verbindung (NSC 26271 (Cytoxin in einer Dosis von 100 mg/kg/Injektion)) in jedem ungerade-nummerierten Experiment, dessen Kur intraperitoneal nur am Tag 1 ist. Die niedrigere Test/Kontrollgrenze für die Positivkontrolle ist 140%. Die annehmbare mittlere Überlebenszeit der unbehandelten Kontrolle ist 19-35,6 Tage.

Bewertung:

**[0184]** Der gemessene Parameter ist die mittlere Überlebenszeit. Berechne die mittleren Tier-Körpergewichte für Tag 1 und Tag 5, berechne das Test/Kontroll-Verhältnis anhand aller Testgruppen. Die mittleren Tier-Körpergewichte für den Bereitstellungstag und den finalen Bewertungstag werden berechnet. Das Test/Kontroll-Verhältnis wird für alle Testgruppen mit > 65 % Überlebende am Tag 5 berechnet. Ein Test/Kontroll-Verhältniswert < 86% weist auf eine Toxizität hin. Ein überhöhter Unterschied in der Körpergewichts-Änderung (Test minus Kontrolle) könnte ebenfalls in der Bewertung der Toxizität verwendet werden.

Kriterien für die Aktivität:

**[0185]** Ein anfängliches Test/Kontroll-Verhältnis größer als oder gleich 140% wird als notwendig erachtet, um eine angemessene Aktivität zu zeigen. Ein reproduzierbarer Test/Kontroll-Verhältniswert von mehr als oder gleich 150% wird als eine signifikante Aktivität erachtet.

**Patentansprüche**

1. Polypeptid umfassend:

(a) eine Interferon-beta-1a (IFN- $\beta$ )-Mutante, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus IFN- $\beta$  Mutanten, welche die Aminosäuresequenz wie in Tabelle 1 als A1, B1, C1, CD1 und CD2 gezeigt besitzen; und  
(b) eine Gelenk-, CH2- und CH3-Domäne eines Immunglobulins.

2. Polypeptid nach Anspruch 1, wobei das Immunglobulin ein menschliches Immunglobulin ist.

3. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Immunglobulin ein IgG ist.

4. Polypeptid nach Anspruch 3, wobei das IgG IgG1 ist.

5. Polypeptid nach Anspruch 4, welches die in [Fig. 10](#) gezeigte Aminosäuresequenz umfasst.
6. Polypeptid nach Anspruch 4, welches die in [Fig. 11](#) gezeigte Aminosäuresequenz umfasst.
7. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Polypeptid an einer Aminosäure in der Aminosäuresequenz glycosyliert ist.
8. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Polypeptid zusätzlich ein Derivat umfasst.
9. Polypeptid nach Anspruch 8, wobei das Derivat ein Polyalkylglycolpolymer umfasst.
10. Polypeptid nach Anspruch 9, wobei das Polyalkylglycolpolymer an das N-terminale Ende der Aminosäuresequenz gekoppelt ist.
11. Nucleinsäuremolekül, welches das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6 codiert.
12. Wirtszelle, welche mit dem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 11 transformiert ist.
13. Verfahren zur Bereitstellung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend die Anzucht der Wirtszelle nach Anspruch 12 unter Bedingungen, welche die Expression des Polypeptids erlauben, und die Isolierung des exprimierten Polypeptids.
14. Arzneimittel, umfassend eine therapeutisch wirksame Menge des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
15. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung eines Medikaments.
16. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 10 für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Vorbeugung von Entzündungs-, Autoimmun-, angiogenetischen, Tumor- oder viralen Krankheiten.
17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die virale Krankheit eine ECM-Infektion, Influenza, eine Infektion der Atemwege, Tollwut oder Hepatitis ist.
18. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Autoimmunkrankheit Lupus oder Multiple Sklerose ist.
19. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Entzündungskrankheit Fibrose ist.
20. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die angiogenetische Krankheit diabetische Retinopathie, Frühgeborenenretinopathie, Makuladegeneration, eine Hornhaut-Transplantatabstoßung, ein neovaskuläres Glaukom, retrolentale Fibroplasie, Rubeosis oder das Osler-Webber Syndrom ist.
21. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Tumorkrankheit ein osteogenisches Sarkom, ein Lymphom, akute lymphatische Leukämie, Brustkrebs, ein Melanom, ein nasopharyngeales Karzinom oder ein Hämangiom ist.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

1 TCCGGGGGCC ATCATCATCA TCATCATAGC TCCGGAGACG ATGATGACAA GATGAGCTAC  
 1>Ser Gly Gly H I s His H I s His H I s His H I s Ser Ser Gly Asp A spAspAspLy sMetSerTyr  
 61 AACTTGCTTG GATT CCTACA AAGAAGCAGC AATTTTCAGT GTCAGAAGCT CCTGTGGCAA  
 21>AsnLeuLeuG I yPheLeuGI nArgSer Ser AsnPheGI nC ysGI nLysLe uLeuTr pGI n  
 121 TTGAATGGGA GGCTTGAATA CTGCCTCAAG GACAGGATGA ACTTTGACAT CCCTGAGGAG  
 41>LeuAsnGlyA rgLeuGluTy rCysLeuLys AspArgMetA snPheAspII eProGluGlu  
 181 ATTAAGCAGC TG CAGCAGTT CCAGAAGGAG GACGCCGCAT TG ACCATCTA TGAGATGCTC  
 61>IleLysGlnL euGlnGlnPh eGlnLysGlu AspAlaAlaL euThrIleTy rGluMetLeu  
 241 CAGAACATCT TTGCTATTT CAGACAAGAT TCATCTAGCA CTGGCTGGAA TGAGACTATT  
 81>GlnAsnIleP heAlaIlePh eArgGlnAsp SerSerSerT hrGlyTrpAs nGluThrIle  
 301 GTTGAGAACCC TCCTGGCTAA TGTCTATCAT CAGATAAACCC ATCTGAAGAC AGTCCCTGGAA  
 101>ValGluAsnL euLeuAlaAs nValTyrHis GlnIleAsnH isLeuLysTh rValLeuGlu  
 361 GAAAAACTGG AGAAAGAAGA TTTCACCAAGG GGAAAACCTCA TGAGCAGTCT GCACCTGAAA  
 121>GluLysLeuG IuLysGluAs pPheThrArg GlyLysLeuM etSerSerLe uHisLeuLys  
 421 AGATATTATG GGAGGATTCT GCATTACCTG AAGGCCAAGG AGTACAGTCA CTGTGCCTGG  
 141>ArgTyrTyrG IyArgIleLe uHisTyrLeu LysAlaLysG IuTyrSerHi sCysAlaTrp  
 481 ACCATAGTCA GAGTGGAAAT CCTAAGGAAC TTTTACTTC A TAAACAGACT TACAGGTTAC  
 161>ThrIleValA rgValGluIleLeuArgAsn PheTyrPhel IeAsnArgLe uThrGlyTyr  
 541 CTCCGAAAC  
 181>LeuArgAsn

FIG. 1

FIG.  
2A-1

FIG.  
2A-2

## FIG. 2A

## FIG. 2A-1

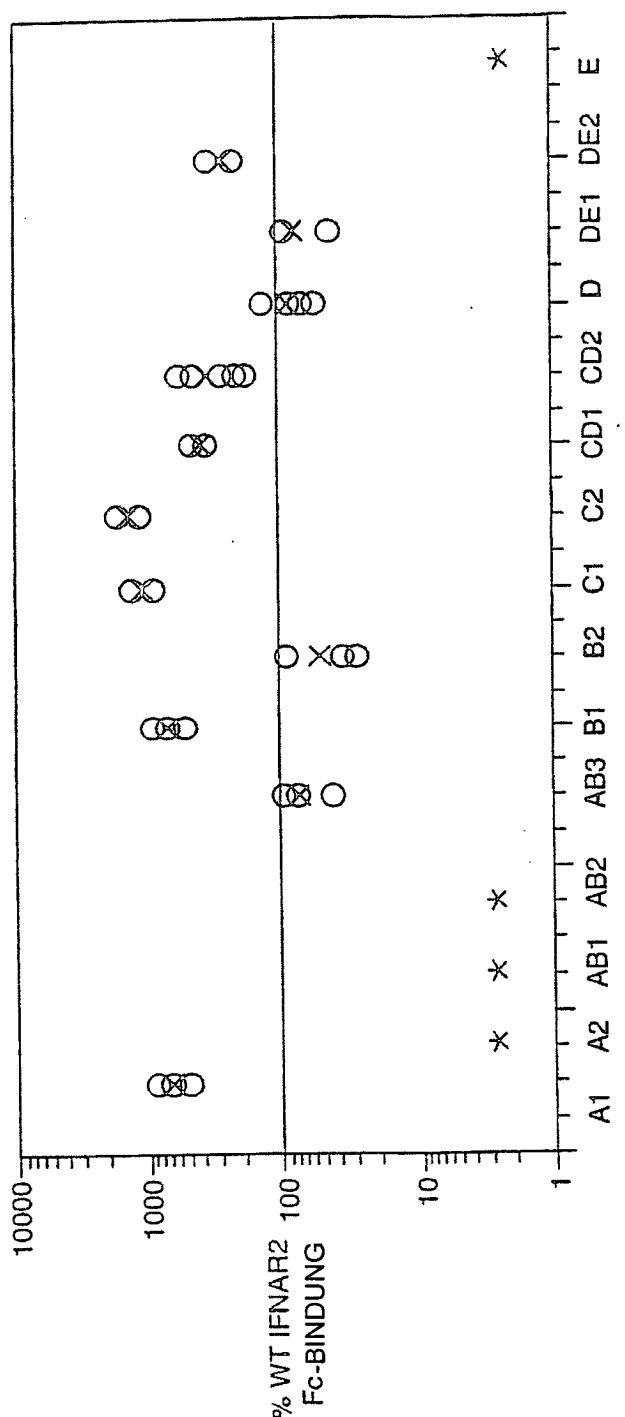
1 ATGAGCTACA ACTTGCTTGG ATT CCTACAA AGAACAGCA ATTTCAAGTG TCAGAAGCTC  
 1>MetSer TyrA snLeuLeuGl yPheLeuGl n ArgSer SerA snPheGl nCy sGl nLysLeu  
 61 CTGTGGCAAT TGAATGGGAG CCTTGAATAC TGCCTCAAGG ACAGGATGAA CTTTGACATC  
 21>LeuTrpGl nL euAsnGl yAr gLeuGl uTyr CysLeuLysA spArgMetAs nPheAspI e  
 121 CCTGAGGAGA TTAAGCAGCT GCAGCAGTTC CAGAAGGAGG ACGCCGCATT GACCATCTAT  
 41>ProGl uGl uI IeLysGl nLe uGl nGl nPhe Gl nLysGl uA spAl aAl aLe uThr II eTyr  
 181 GAGATGCTCC AGAACATCTT TGCTATTTTC AGACAAGATT CATCTAGCAC TGGCTGGAAT  
 61>Gl uMetLeuG l nAsnII ePh eAl aII ePhe ArgGl nAspS erSerSerTh rGlyTrpAsn  
 241 GAGACTATTG TTGAGAACCT CCTGGCTAAT GTCTATCATC AGATAAACCA TCTGAAGACA  
 81>Gl uThr II eV al Gl uAsnLe uLeuAl aAsn ValTyrHisG l nI eAsnHI sLeuLysThr  
 301 GTCCCTGGAAG AAAAAGTGGAA GAAAGAAGAT TTCACCAGGG GAAAAGTCAT GAGCAGTCTG  
 101>ValLeuGl uG luLysLeuGl uLysGl uAsp PheThrArgG lyLysLeuMe tSerSerLeu  
 361 CACCTGAAAA GATATTATGG GAGGATTCTG CATTACCTGA AGGCCAAGGA GTACAGTCAC  
 121>HisLeuLysA rgTyrTyrGl yArgII eLeu HisTyrLeuL ysAl aLysGl uTyrSerHis  
 421 TGTGCCTGGA CCATAGTCAG AGTGGAAATC CTAAGGAAC TTTACTTCAT TAACAGACTT  
 141>CysAl aTrpT hrII eValAr gValGl uII e LeuArgAsnP heTyrPhell eAsnArgLeu  
 481 ACAGGTTACC TCCGAAACGA CGATGATGAC AAGGTCGACA AAACACAC ATGCCACCG  
 161>ThrGlyTyrL euArgAsnAs pAspAspAsp LysValAspL ysThrHisTh rCysProPro  
 541 TGCCCAGCAC CTGAACCTCCT GGGGGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAAG

**FIG. 2A-2**

181 ▶ CysProAlaP roGluLeuLe uGlyGlyPro SerValPheL euPheProPr oLysProLys  
 601 GACACCCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG TGTTGGTGGAA CGTGAGGCCAC  
 201 ▶ AspThrLeuM etIleSerAr gThrProGlu ValThrCysV alValValAs pValSerHis  
 661 GAAGACCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG  
 221 ▶ GluAspProG luValLysPh eAsnTrpTyr ValAspGlyV alGluValHisAsnAlaLys

**FIG. 2B**

721 ACAAAAGCCGC GGGAGGAGCA GTACAACAGC ACGTACCGTG TGTCAGCGT CCTCACCGTC  
 1 ▶ ThrLysProA rgGluGluGI nTyrAsnSer ThrTyrArgV alValSerVa lLeuThrVal  
 781 CTGCACCAGG ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC  
 21 ▶ LeuHisGlnA spTrpLeuAs nGlyLysGlu TyrLysCysL ysValSerAs nLysAlaLeu  
 841 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA ACCACAGGTG  
 41 ▶ ProAlaProI leGluLysTh rIleSerLys AlaLysGlyG InProArgGI uProGlnVal  
 901 TACACCCCTGC CCCCATCCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACCC AGGTCAAGCCT GACCTGCCCTG  
 61 ▶ TyrThrLeuP roProSerAr gAspGluLeu ThrLysAsnG InValSerLe uThrCysLeu  
 961 GTCAAAGGCT TCTATCCCAG CGACATGCC GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG  
 81 ▶ ValLysGlyP heTyrProSe rAspIleAla ValGluTrpG luSerAsnGlyGlnProGlu  
 1021 AACAACTACA AGACCACGCC TCCCCTGTTG GACTCCGACG GCTCCTCTT CCTCTACAGC  
 101 ▶ AsnAsnTyrL ysThrThrPr oProValLeu AspSerAspG lySerPhePh eLeuTyrSer  
 1081 AAGCTCACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGAAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG  
 121 ▶ LysLeuThrV alAspLysSe rArgTrpGln GlnGlyAsnV alPheSerCysSerValMet  
 1141 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC CGGGAAA  
 141 ▶ HisGluAlaL euHisAsnHi sTyrThrGln LysSerLeuSerLeuSerPr oGlyLys



三  
〇  
正

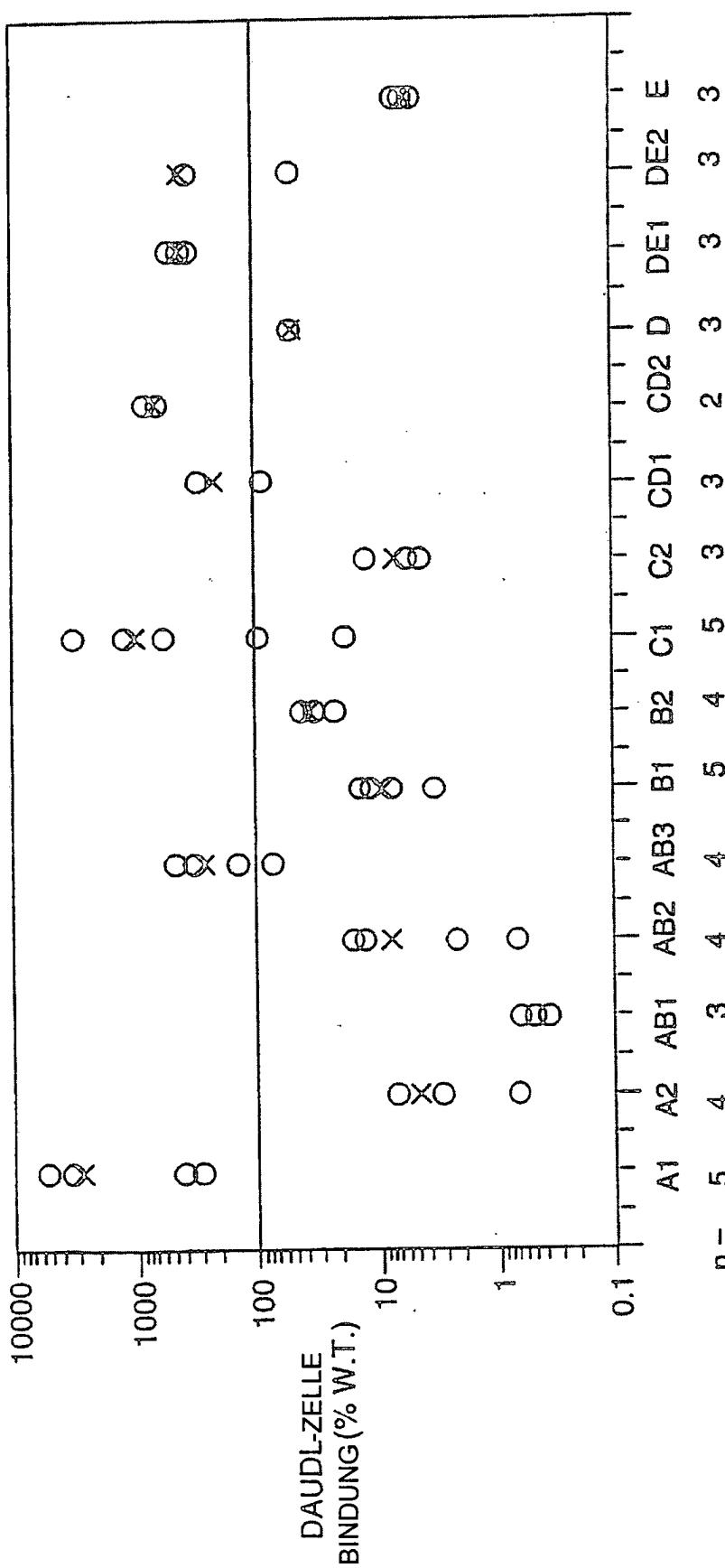


FIG. 4

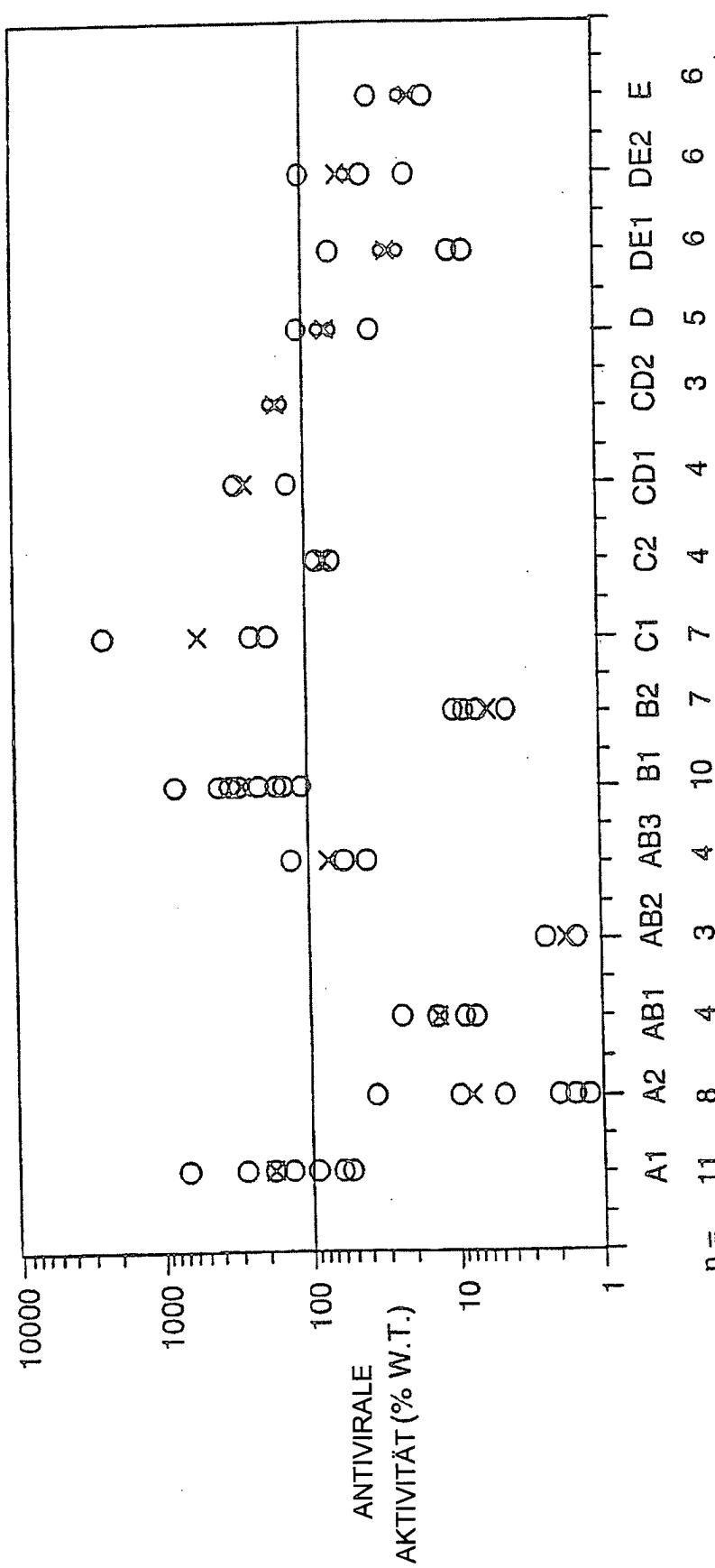


FIG. 5

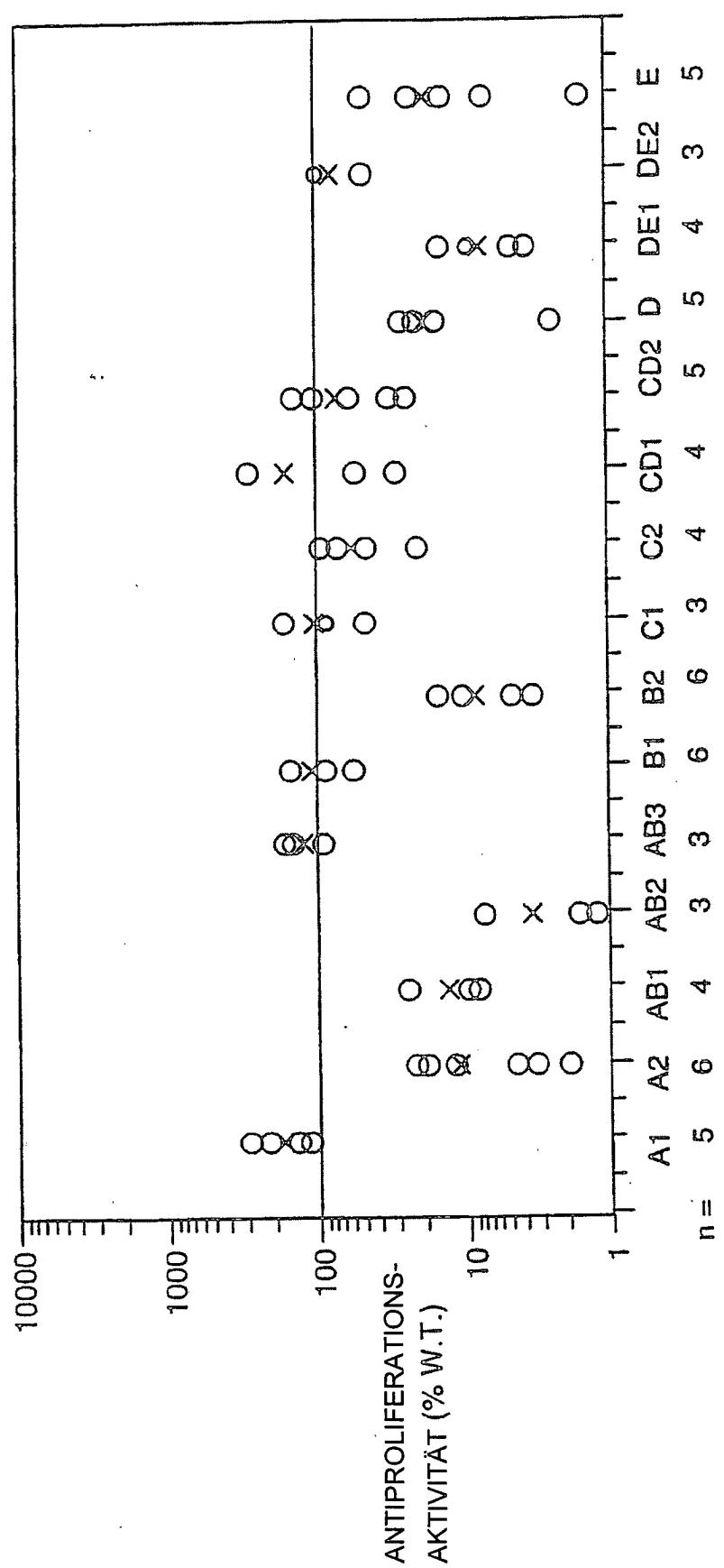


FIG. 6

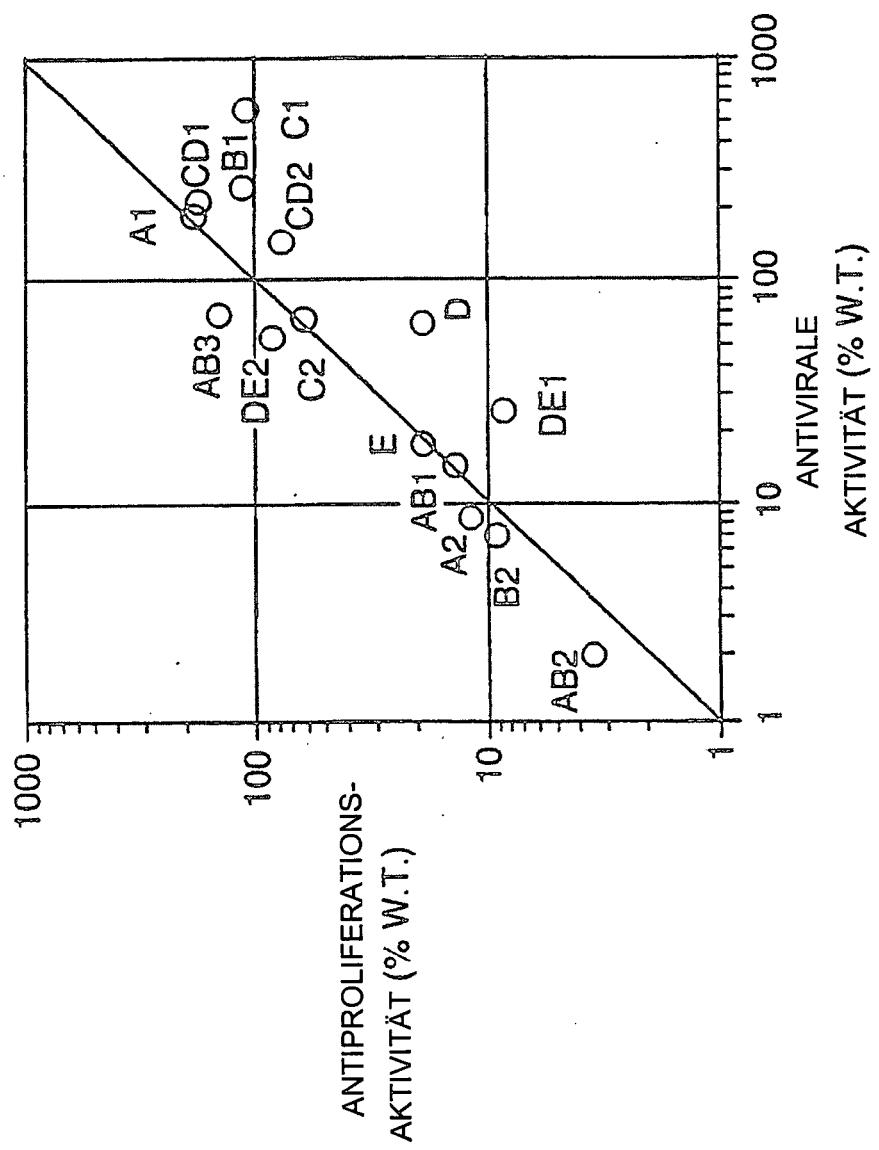
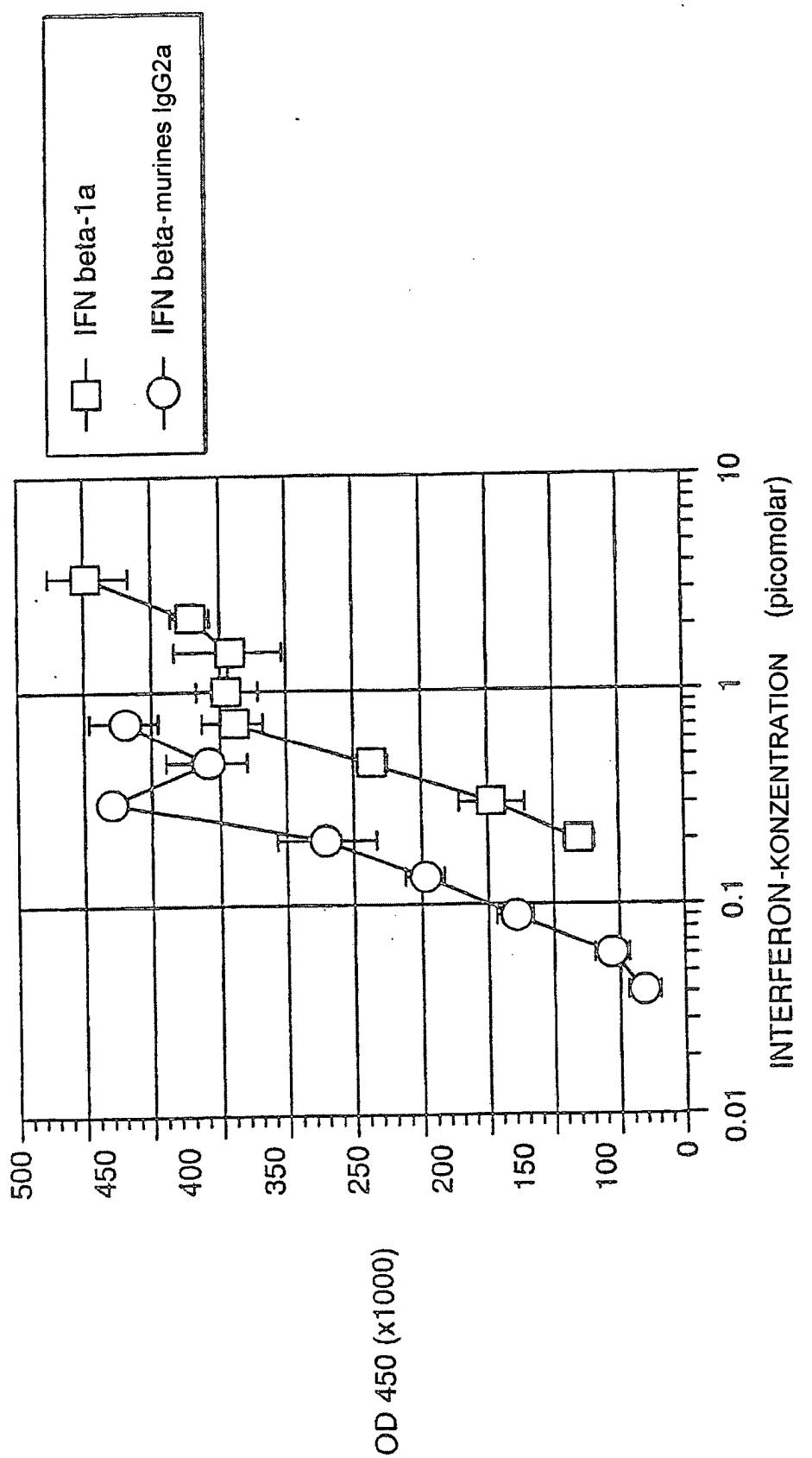


FIG. 7



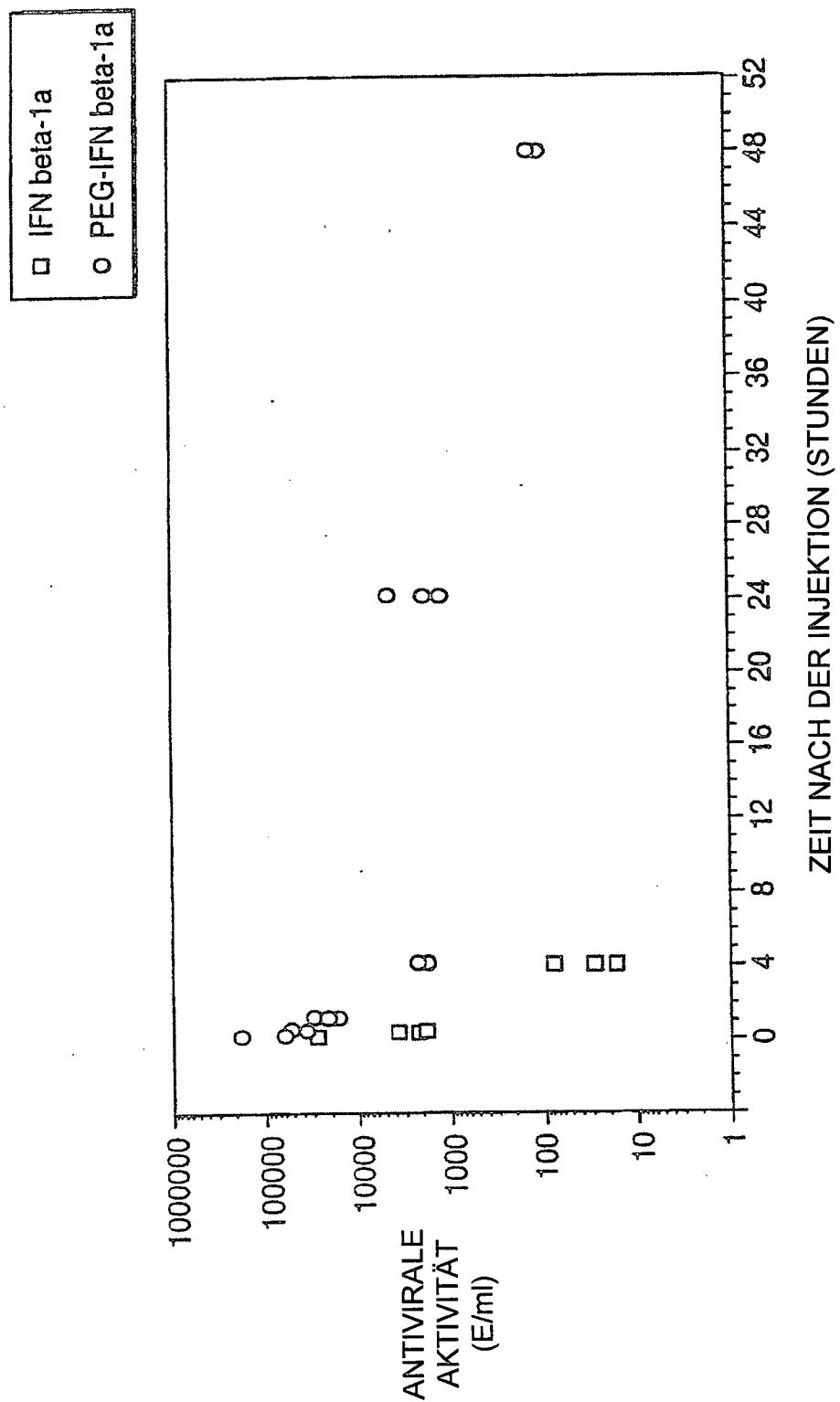


FIG. 9

IFN $\beta$  G162C-Ig direktes Fusionskonstrukt – offener Leserahmen

FIG. 10A

1 ATGCCTGGAAAGATGGTCGTGATCCTGGAGCCTCAAAATACTTGGATAATGTTTGCA 60  
 M P G K M V V I L G A S N I L W I M F A

FIG. 10B

61 GCCTCTCAAGCCATGAGCTTACAACTTGCTTGGATTCCCTACAAAGAACCGAGCAATTTCAG 120  
 A S Q A M S Y N L L G F L Q R S S N F Q

FIG. 10C

121 TGTCAAGCTCCTGTGGCAAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCCTCAAGCACAGGATG 180  
 C Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R M

FIG. 10

181 AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAAGCAGCTTGAGCAGTTCCAGAAGGGAGGCCGA 240  
 N F D I P E E I K Q L Q F Q K E D A A

241 TTGACCATTGAGATGACTCTCAGAACATCTTGTCTATTTCAGACAAGATTCATCTAGC 300  
 L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S

301 ACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAAATGTCATCATCAGATAAAC 360  
 T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I N

361 CATCTGAAGACAGTCCTGGAAAGAACCTGGAGAAAGAAGATTCACCAAGGGAAACTC 420  
 H L K T V L E E K L E D F T R G K L

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

FIG. 10A

481 GAGTACAGTCACTGTGCCCTGGACCATAAGTCAGAGTGAAATCCTAAGGAACTTTACTTC 540  
 E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F  
  
 541 ATTAACAGACTTACATGTTACCTCCGAAACGTCGACAAACTCACACATGCCAACCGTGC 600  
 I N R L T C Y L R N V D K T H T C P P C  
  
 601 CCAGCACCTGAACTCCTGGGGACCGTCAAGTCTTCTCTTCCCCAAACCCAAAGGAC 660  
 P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D  
  
 661 ACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCAACATGCCGTGGTGGACGTGAGCCACGAA 720  
 T L M I S R T P E V T C V V D V S H E  
  
 721 GACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA 780  
 D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T  
  
 781 AAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGGTACCGTACGGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTCG 840  
 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L  
  
 841 CACCAAGGACTGGCTGAATGCCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCCA 900  
 H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P  
  
 901 GCCCCCATCGAGAAAACCATTCTCCAAGCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTAC 960  
 A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y

FIG. 10B

961 ACCCTGCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAACCTGCCTGGTC 1020  
 T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V  
  
 1021 AAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGACTGGAGACTGGAGACAATGGGCAGCCGGAGAAC 1080  
 K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N  
  
 1081 AACTACAAGACCACGGCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTCTCTACAGCAAG 1140  
 N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K  
  
 1141 CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGGTCTCATGCTCCGTGATGCAT 1200  
 L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H  
  
 1201 GAGGCTCTGCACAAACCAACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGCTCCGGAAATGTA 1257  
 E A L H N H Y T Q K S L S P G K \*

FIG. 10C

FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C

TEN $\beta$  G162C-Ig - Fusions - G4S - Linkerkonstrukt - offener Leserahmen

1 ATGGCTGGAAAGATGGTCGTGATCCTGGAGGCCTCAAATATACTTGGATAATGTTTGCA 60  
 M P G K M V V I L G A S N I L W I M F A

61 GCTTCTCAAGCCATGAGCTACAACCTTGGATTCCTACAAAGAACGAAATTTCAG 120  
 A S Q A M S Y N L L G F L Q R S S N F Q

121 TGTCAAGAAGCTCCTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCCTCAAGGACAGGATG 180  
 C Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R M

181 AACCTTGACATCCCTGAGGAGATTAAAGCAGCTGAGCAGTTCCAGAAAGGGACGCCGCA 240  
 N F D I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A

241 TTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTGTCTATTTCAGACAAGATTCACTCTAGC 300  
 L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S : S

301 ACTGGCTGGAATGAGACTATTGTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCCTATCATCAGATAAAC 360  
 T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I N

361 CATCTGAAGACAGTCCTGGAAAGAAAACCTGGAGAAAGAGATTTCACCAGGGAAACTC 420  
 H L K T V L E E K E D F T R G K L

FIG. 11A

421 ATGAGCAGTCTGCACCTGTAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAG 480  
 M S S L H L K R Y G R I L H Y L K A K  
  
 481 GAGTACAGTCACTGTGGACCATACTGTCAAGACTGGAAATCCTAACCGAACCTTC 540  
 E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F  
  
 541 ATTAAACAGACTTACATGTTACCTCCGAAACGGCCGGTGGCTGAAATCCTAACTCAC 600  
 I N R L T C Y L R N G G G S V D K T H  
  
 601 ACATGCCAACCGTGGCACCTGAACCTCTGGGGGACCCGTCAAGTCTCTCTCCCC 660  
 T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P  
  
 661 CCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGTG 720  
 P K P K D T L M I S R T P E V T C V ; V V  
  
 721 GACGTGAGCCACGAAACGCCCTGAGGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG 780  
 D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V  
  
 781 CATAATGCCAAGACAAGCCGGGGAGGAGCAGTACACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC 840  
 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S  
  
 841 GTCCCTCACCGTCCCTGCACCGAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGGCAAGGTCCTCC 900  
 V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S  
  
 901 AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA 960  
 N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R

FIG. 11B

961 GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCCGATGAGCTGACCAAGAACCGGTAGGC 1020  
 E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S  
  
 1021 CTGACCTGGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGGAGTGAGGGAGACAA 1080  
 L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N  
  
 1081 GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAACCAAGGCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTTC 1140  
 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F  
  
 1141 TTCCCTCACAGCAAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGGTCTCTCA 1200  
 F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S  
  
 1201 TGCTCCCGTGTGCATGAGGCTCTGCACAAACCAACTACACGGCAGAAGAGCCTCCCTGTCT 1260  
 C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S  
  
 1261 CCCGGAAATGGA 1272  
 P G K \*

FIG. 11C

