

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 23.11.2012

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 11.06.2014  
(Věstník č. 24/2014)

(21) Číslo dokumentu:

## 2012-829

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

<i>C07K 14/315</i>	(2006.01)
<i>C12N 15/31</i>	(2006.01)
<i>A61K 38/16</i>	(2006.01)
<i>A61P 37/00</i>	(2006.01)
<i>A61P 1/00</i>	(2006.01)
<i>A61P 17/06</i>	(2006.01)
<i>A61P 19/02</i>	(2006.01)

(71) Přihlašovatel:  
Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, CZ

(72) Původce:  
RNDr. Petr Malý, CSc., Praha 4, CZ  
doc. Ing. Peter Šebo, CSc., Praha 4, CZ  
Mgr. Milan Kuchař, Ph.D., Sobůlky, CZ  
Ing. Lucie Vaňková, Praha 4, CZ  
Ing. Hana Petroková, Ph.D., Praha 9, CZ

(74) Zástupce:  
Inventia s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na  
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Polypeptidy pro léčbu autoimunitních  
chorob založenou na blokaci receptoru pro  
lidský cytokin IL-23**

(57) Anotace:  
Předkládané řešení se týká polypeptidů, které jsou odvozeny z albumin-vazebné domény streptokokového proteinu G divokého typu o sekvenci LAEAKVLNRELDKYGVSDDYKLNINNAKTVEGV KALIDEILAAP (ABDwt) a vykazují schopnost vazby na receptor pro lidský cytokin IL-23 s afinitní konstantou  $K_d$  menší než  $10^{-7}$  M. Tyto polypeptidy byly vybrány z ABD peptidové knihovny, připravené randomizací 11 zbytků ABDwt, s ohledem na vazbu k IL-23R. Součástí řešení je také jejich použití pro přípravu léčiva pro léčbu autoimunitních chorob, zejména psoriázy, Crohnovy choroby, revmatoidní artritidy a roztroušené sklerózy.

Polypeptidy pro léčbu autoimunitních chorob založenou na blokaci receptoru pro lidský cytokin IL-23

### Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových polypeptidů odvozených od albumin-vazebné domény (ABD) streptokokového proteinu G, které jsou vhodné pro léčbu autoimunitních chorob a jako diagnostická činidla.

### Dosavadní stav techniky

O autoimunitních chorobách, jakými jsou například psoriáza, Crohnova choroba, revmatoidní artritida nebo roztroušená skleróza, je známo, že souvisejí s cytokinem IL-23 indukujícím signalizační funkci zprostředkovanou subpopulací  $T_{H17}$  buněk nebo přirozených zabijeečských buněk (NKC), které exprimují buněčně povrchový receptor pro IL-23 (Oppmann B et al.: *Immunity* 2000;13(5):715-725; Cua DJ et al.: *Nature* 2003;421(6924):744-748; Langrish CL et al.: *J Exp Med* 2005;201(2):233-240; Chan JR et al.: *J Exp Med* 2006;203(12):2577-2587; Capon F et al.: *Hum Genet* 2007;122(2):201-206; Vaknin-Dembinsky A et al.: *J Immunol* 2006;176(12):7768-7774; Duerr RH et al.: *Science* 2006;314(5804):1461-1463). V těchto typech buněk cytokin IL-23, uvolněný z dendritických buněk a sestávající z unikátní podjednotky p19 a obecné podjednotky p40 (Beyer BM et al.: *J Mol Biol* 2008;382(4):942-955; Lupardus PJ et al.: *J Mol Biol* 2008;382(4):931-941), aktivuje signální dráhu prostřednictvím interakce p19 podjednotky se svým buněčným membránovým receptorem IL-23R a interakcí podjednotky p40 s povrchovým receptorem  $\beta 1$  cytokinu IL-12 (Parham C et al.: *J Immunol* 2002;168(11):5699-5708; Kastelein RA et al.: *Annu Rev Immunol* 2007;25:221-242). Synergická vazba heterodimeru IL-23 k oběma receptorovým jednotkám vede k heterodimerizaci receptoru následované tvorbou kvarterního komplexu, která spouští signální kaskádu dráhy jak/stat, zahrnující molekuly Jak2, Tyk2, Stat1, Stat3, Stat4 a Stat5. Transdukce signálu aktivuje transkripci, která vyvolává sekreci směsi modulátorů zánětu, jimiž jsou IL-17A, IL-17F, IL-22 a některé chemokiny stimulující keratinocyty a další typy buněk, a tedy hrajících zásadní roli v prozánětlivém procesu (přehledový článek Boniface K et al.: *Immunol Rev* 2008;226:132-146).

Efektivní terapeutická intervence potlačující hyperproliferační keratinocytů jako klinický projev psoriázy vede k blokadě interakce mezi podjednotkami p19/p40 IL-23 a jejich receptory v buněčných membránách (Toichi E et al.: *J Immunol* 2006;177(7):4917-4926; Krueger GG et al.: *N Engl J Med* 2007;356(6):580-592; Gottlieb AB et al.: *Curr Med Res Opin* 2007;23(5):1081-1092). Nedávno bylo ukázáno, že léčivo na bázi monoklonální protilátky Stelara (ustekinumab, Janssen Biotech), blokující podjednotku p40 cytokinu IL-23 a bránící její interakci s  $\beta$ 1 receptorem cytokinu IL-12, dosahuje výborných výsledků v léčbě středních a těžkých forem psoriázy (Leonardi CL et al.: *Lancet* 2008;371(9625):1665-1674; Papp KA et al.: *Lancet* 2008;371(9625):1675-1684). Protože však podjednotka p40 je součástí cytokinů IL-12 i IL-23, ovlivňuje léčivo dvě rozdílné signální dráhy, což přináší nežádoucí vedlejší účinky včetně kardiovaskulárních problémů a vyššího rizika rakoviny. Pozornost se proto v současné době soustředí na vývoj nových léčiv cíleně zasahujících pouze signální dráhu zprostředkovanou IL-23, jakými jsou specifické anti-p19 protilátky MK-3222 (Merck), CNTO 1959 (Janssen Biotech) and AMG 139 (Amgen/MedImmune) (Garber K: *Nat Biotechnol* 2012;30(6):475-477), nebo cílené protilátky popsané v patentových přihláškách WO 2008/103432, WO 2010/027766 a WO 2012/093127. Protilátky jsou však velké molekuly, náročné na přípravu a s omezenou pohyblivostí v organismu, a to především z hlediska prostupnosti kůží a tkáněmi.

Alternativou ke konvenčním léčivům založeným na monoklonálních protilátkách jsou uměle vytvořené vazebné molekuly odvozené od malých proteinových struktur (Binz HK et al.: *Current Opinion in Biotechnology* 2005;16(4):459-469; Nygren PA et al.: *Journal of Immunological Methods* 2004;290(1-2):3-28; Gronwall C et al.: *J Biotechnol* 2009;140(3-4):254-269). Malé proteinové struktury vzniklé modifikací aminokyselin ABD streptokokového proteinu G jsou známy z US 2008/0187517, kde byly připraveny za účelem zvýšení afinity k lidskému sérovému albuminu (HSA). Dále jsou známy proteiny odvozené od fibronektinu, vážící IL-23 (WO 2011/103105).

Receptor IL-23 patří do rodiny cytokinových receptorů třídy I a sdílí typické znaky s tandemovými doménami fibronektinového typu III (FnIII) obsahujícími typické disulfidové vazby a WQPWS sekvenci, podobající se WSXWS sekvenci cytokinových receptorů lokalizované v transmembránově proximální doméně FnIII (Parham C et al.: *J Immunol* 2002;168(11):5699-5708). Obě domény tvoří cytokin-vážící homologní oblast (CHR), která je spolu s terminální imunoglobulinu podobnou doménou považována za zásadní pro vazbu IL-23.

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

#### Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou polypeptidy obsahující sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující:

KYKNGINNALCVRRVKALIDWILAYLP (SEQ. ID NO. 1)

TYKNDINAASYVPAVKWADRILASLP (SEQ. ID NO. 2)

YYKNRINPACHVLSVKSNDWILASLP (SEQ. ID NO. 3)

VYKNTINIAIPVRVVKRVIDWILAVLP (SEQ. ID NO. 4)

AYKNLINAALIVAKVKLLIDAILAPLP (SEQ. ID NO. 5)

HYKNWINPARRVRPVKWLIDAILAALP (SEQ. ID NO. 6)

RYKNSINRALPVAAVKWALDLILAWLP (SEQ. ID NO. 7)

WYKNCITAARAVTTVKLLIDTILALLP (SEQ. ID NO. 8)

HYKNSINPAPQVIVVKVNIDLILAGLP (SEQ. ID NO. 11)

RYKNWINRAWLVALVKRQIDQILALLP (SEQ. ID NO. 12)

EYKNAINAANPVSQVVKRPIDVILAALP (SEQ. ID NO. 13)

WYKNRINTALTVACVKLVIDWILAALP (SEQ. ID NO. 15)

příčemž na N-konci uvedené sekvence je přímo připojena sekvence mající alespoň 80% sekvenční identitu se sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující

LAEAKVLNRELDKYGVSD (SEQ ID NO. 17)

LAEAKVLNRELDKYGVSD (SEQ ID NO. 18)

LAETKVLNRELDKYGVSD (SEQ ID NO. 19),

příčemž asociační a disociační rovnováha vazby uvedeného polypeptidu na receptor pro lidský cytokin IL-23 charakterizovaná vazebnou afinitní konstantou  $K_d$  vykazuje hodnotu menší než  $10^{-7}$  M.

V rámci předkládaného vynálezu bylo zjištěno, že polypeptidy podle vynálezu, odvozené z albumin-vazebné domény streptokokového proteinu G divokého typu (ABDwt, SEQ. ID NO. 16), jsou vhodnými kandidáty pro látky vážící se na receptor pro lidský cytokin IL-23 a blokující tak specificky jeho vazbu s podjednotkou p19 IL-23. ABDwt je tříhelikální struktura a bylo zjištěno, že zejména helixy 2 a 3 (aminokyselinové zbytky 20 až 46) jsou důležité pro

vazbu na receptor IL-23. Sekvence helixu 1 (aminokyselinové zbytky 1 až 19) nebo její část může být připojena na N-konec sekvence nebo na C-konec sekvence odvozené od aminokyselinových zbytků 20 až 46 nebo její části. Dále mohou být prováděny bodové záměny aminokyselin, s výhodou alespoň 5 aminokyselinových zbytků, a také zkrácení či prodloužení sekvence.

Asociační a disociační rovnováha vazby polypeptidu (P) podle předkládaného vynálezu na receptor IL-23 (L) za vzniku komplexu (C), je vyjádřena vztahem  $C \rightleftharpoons P + L$ , a je charakterizována vazebnou afinitní konstantou  $K_d$  spočítanou podle vzorce  $K_d = \frac{[P][L]}{[C]}$  (kde [P] je koncentrace P, [L] je koncentrace L a [C] je koncentrace C vyjádřené v mol/l), která vykazuje hodnotu menší než  $10^{-7}$  M. Tato vazebná afinitní konstanta může být stanovena známými metodami, které poskytují ekvivalentní výsledky, vhodnou metodou může být například metoda povrchové rezonance plasmonů (SPR).

S výhodou je polypeptid vybrán ze skupiny zahrnující sekvence SEQ ID NO. 1 až SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 11 až SEQ ID NO. 13, a SEQ ID NO. 15, které mají na C-konci nebo na N-konci připojenu sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO. 17 až SEQ ID NO. 19.

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

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

Polypeptidy podle vynálezu jsou vhodné pro použití v medicíně, zejména v léčbě autoimunitních chorob. Zejména terapeuticky vhodné jsou polypeptidy obsahující sekvence SEQ. ID NO. 1-7, nejvhodnější jsou polypeptidy obsahující sekvence SEQ ID NO. 3 a 6.

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

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

Polypeptidy podle vynálezu inhibují vazbu podjednotky p19 k receptoru IL-23R interakcí s receptorem, čímž specificky blokují prozánětlivou signální dráhu, tedy jsou vhodné jako léčiva další generace pro léčbu autoimunitních chorob. Tato inhibiční schopnost byla prokázána v *in vitro* vazebných stanoveních, kompetičních experimentech i v *ex vivo* funkčním stanovení. Dále sekvence podle předkládaného vynálezu vykazují sníženou afinitu proti sérovým albuminům.

*obrázku na úkolu 2*  
Přehled vyobrazení

**Obr. 1.** Vazba rozpustného fúzního rekombinantního proteinu DH-MBP-p19 a refoldovaného DH-p19 k imobilizovanému IL-23 receptoru ověřená testem ELISA. Receptor byl produkován v bakteriálním kmeni *E. coli* SHuffle a po extrakci refoldován z roztoku 8M močoviny. Interakce byla detegována pomocí myší polyklonální protilátky proti lidskému interleukinu 23 (anti-human IL-23 (p19)) a sekundární kozí protilátky fúzované s křenovou peroxidázou (anti-

-IgG-HRP). Výsledek ukazuje, že námi připravené bakteriální produkty se vzájemně rozpoznávají na základě specifické vazby.

**Obr. 2.** Vazebná doména ABD jako strukturní kostra pro konstrukci vazebných proteinů proti různým cílovým molekulám (tzv. ABD scaffold). Proteinová struktura (PDBID 1GJT) s vyobrazenými 11 aminokyselinovými pozicemi vybranými pro randomizovanou mutagenézi byla použita k tvorbě vysoce komplexní knihovny ABD variant o teoretické komplexitě  $10^{14}$  variant (podrobnosti jsou uvedeny v publikaci Ahmad a ost., *Proteins* 2012;80(3):774-789, 2012).

**Obr. 3.** Fylogenetický strom znázorňující sekvenční podobnost klonů REX selektovaných pro vazbu na receptor exIL-23R. Sekvenční analýza klonů ukázala 18 unikátních variant z celkového počtu 34 analyzovaných klonů. Pro tuto analýzu byla použita oblast sekvencí mezi 20. a 46. pozicí aminokyselin. Předcházející část (N-konec) aminokyselin 1-19 představující nemutovanou oblast aminokyselinové sekvence nebyla do této analýzy zahrnuta.

**Obr. 4.(a)** Vazba REX variant k imobilizovanému receptoru exIL-23 s použitím ELISA. Receptor byl produkován v kmeni *E. coli* SHuffle a po extrakci refoldován z roztoku 8M močoviny. Interakce byla detegována pomocí streptavidinu konjugovaného s křenovou peroxidázou. **(b)** Vazba receptoru exIL-23R k imobilizovaným REX variantám. Interakce byla detegována pomocí polyklonální protilátky proti lidskému receptoru exIL-23R (anti-human IL-23R) a sekundární protilátky fúzované s křenovou peroxidázou (anti-goat IgG-HRP). Grafy ukazují cíleně navozenou vazbu REX variant k IL-23 receptoru v porovnání s původní nemutovanou molekulou ABDwt.

**Obr. 5.** Kompetiční ELISA stanovení. Deset variant REX-TolA-AVI (obr. 4 a, b) soutěží s fúzním proteinem DH-MBP-p19 o vazbu k imobilizovanému receptoru exIL-23R vyprodukovanému z bakteriálního kmene *E. coli* SHuffle. Z jednotlivých variant REX klonů byly připraveny série ředění v roztoku PBST s 1% BSA obsahující 20 nM DH-MBP-p19. Zvyšující se koncentrace inhibujících REX variant měla za následek snížení vazby p19 proteinu na receptor v protikladu k původní nemutované molekule ABDwt. Vazba p19 na receptor byla detegována pomocí myší polyklonální protilátky anti-IL-23 (p19) rozpoznané anti-IgG-HRP konjugátem kozí protilátky s křenovou peroxidázou. Tyto výsledky ukazují

inhibiční účinky příslušných REX variant ve vazebném systému využívajícím bakteriální refoldovaný receptor.

**Obr. 6.** Kompetice inhibičních variant REX009 a REX125 s p19/IL-23 o vazbu na receptor IL-23R. Zvýšení koncentrace inhibičních variant REX (REX-TolA-AVI) má za následek úbytek vazby jak rekombinantního fúzního proteinu DH-MBP-p19 (a), tak kompletního eukaryotického produktu IL-23 cytokinu (b) k imobilizovanému rozpustnému receptoru ve formě chiméry IL-23R-IgG vyprodukované v myších fibroblastech. Vazba p19 byla detegována pomocí myší polyklonální protilátky anti-IL-23 (p19) rozpoznané sekundární kozí protilátkou anti-IgG-HRP konjugovanou s křenovou peroxidázou. Původní nemodifikovaná varianta ABD použitá jako negativní kontrola ve formě proteinu ABDwt-TolA-AVI v rozmezí použitých koncentrací proteinů neovlivňuje vazbu p19 na IL-23R. Tento výsledek dokumentuje, že inhibiční účinek použitých REX variant nalezený s použitím bakteriálního receptoru je zachován i v případě rozpustné eukaryoticky produkované a glykosylované formy IL-23 receptoru a je potvrzen i sníženou vazbou kompletního lidského IL-23.

**Obr. 7.** Termální stability vazebných variant REX-TolA-AVI měřené metodou fluorescenčního posunu vlivem tepelné denaturace (tzv. fluorescence-based thermal-shift assay). Během vzrůstající teploty dochází k postupnému rozvolňování struktury proteinu (denaturaci), a tím zpřístupnění těchto oblastí pro vazbu fluorescenčního činidla SYPRO<sup>®</sup> Orange, v důsledku čehož narůstá měřený fluorescenční signál (excitace při 470 nm a emise 570 nm). Grafy ukazují průběhy normalizovaných hodnot fluorescence v závislosti na vzrůstající denaturační teplotě (a) a její derivace (b). Zjištěná teplota tání  $T_m$  pro REX009 je 50,0°C, pro REX125 je 56,0°C a pro REX128 je měřením odhadnuta na 56,5 °C. Tyto výsledky dokumentují dostatečnou stabilitu použitých variant.

**Obr. 8.** (a) K-562 a THP-1 buňky exprimují na svém povrchu molekuly IL-23 receptoru a toto je dokumentováno vazbou anti-IL23R protilátky. Buňky byly vystaveny vazbě protilátky proti lidskému IL-23R značené APC nebo její izotypové kontrole konjugované s APC a poté analyzovány průtokovou cytometrií. (b) Analýza vazby různých variant ligandů REX-TolA-AVI na K-562 a THP-1 buňky. Buňky byly inkubovány s *in vivo* biotinylovanými REX proteiny nebo s negativními kontrolami, a to s ABDwt nebo s variantou His-TolA molekuly postrádající ABD doménu, tzv. klonem delta ( $\Delta$ ) ABD. Navázané proteiny byly následně

obarveny streptavidinem značeným fycoerytrinem a analyzovány průtokovou cytometrií. N.P. značí vzorek samotných buněk bez ABD i REX proteinu.

**Obr. 9.** Vazba různých variant REX ligandů na lidské buněčné linie koreluje s expresí IL-23 receptoru na těchto buňkách. (a) K-562 a Jurkat buňky exprimují na svém povrchu molekuly IL-23 receptoru. Buňky byly vystaveny vazbě protilátky proti lidskému IL-23R značené APC nebo její izotypové kontrole a analyzovány průtokovou cytometrií. (b) Profil vazby REX ligandů na K-562 a Jurkat buňky koreluje s intenzitou vazby protilátky proti lidskému IL-23R. Buňky byly inkubovány s *in vivo* biotinylovanými REX proteiny nebo s negativní kontrolou (ABDwt) a navázané proteiny byly následně obarveny streptavidinem značeným fycoerytrinem a analyzovány průtokovou cytometrií.

**Obr. 10.** REX varianty inhibují produkci IL-17 pozitivních T-buněk získaných z mononukleárních buněk periferní krve. (a) Intracelulární barvení buněk produkujících IL-17. Významný pokles výskytu IL-17+ populace byl pozorován ve vzorcích stimulovaných IL-23 kultivovaných v přítomnosti REX ligandů oproti vzorkům s ABD-WT kontrolou nebo bez přítomnosti ABD proteinu. (b) Počet buněk produkujících IL-17 v jedné jamce po třídenní inkubaci s IL-23 a IL-2 bez přídavku ligandu nebo v kombinaci s přidaným REX009, REX125, REX128 nebo negativní kontrolou ABDwt. Buňky byly zpočátku stimulovány anti-CD3 protilátkou a poté znovu stimulovány ve třetím dni inkubace. Přítomnost CD4<sup>+</sup> T-buněk produkujících IL-17 byla prokázána použitím intracelulárního barvení cytokinů. Tento výsledek dokumentuje imunomodulační potenciál vytvořených antagonistů IL-23 receptoru a potvrzuje, že vytvořené vazebné REX proteiny blokují IL-23R-zprostředkovanou aktivaci T-buněk vedoucí k produkci a sekreci IL-17.

### Příklady provedení vynálezu

#### **Materiály a metody**

Protilátky a detekční činidla: monoklonální protilátky (mAbs) anti-lidský IL-23R- Allophycocynin (APC) (myší IgG2B) specifický pro lidský receptor IL-23 a IgG2B isotypová kontrola-APC (myší IgG2b) byly získány od R&D Systems, Minneapolis, MN. Myší anti-p19 monoklonální protilátka byla získána od Biolegend, San Diego, CA. Cy5 konjugovaný kozí

anti-myší IgG (F(ab')<sub>2</sub> fragment) byl získán z Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA. Streptavidin-fykoerytrin byl zakoupen od eBioscience, San Diego, CA.

Buněčné linie a podmínky kultivace: v příkladech byly použity buněčné linie lidské akutní monocytické leukémie THP-1 (ATCC číslo: TIB-202), lidské leukémie K-562 (ATCC číslo: CCL-243) a lidského T-buněčného lymfomu Jurkat (ATCC číslo: TIB-152). Buňky byly kultivovány v médiu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementovaném 10% fetálním telecím sérem (FCS) (GIBCO, Grand Island, N.Y.) a roztokem antibiotik a antimykotik (ATB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

### **Příprava rekombinantního IL-23R**

Lidský gen pro receptor IL-23 se skládá z 10 exonů kódujících 629 aminokyselin receptorové molekuly. cDNA kódující extracelulární část (fragment Gly24-Asn350) lidského receptoru IL-23 (IL-23R, GenBank: AF461422.1) byla amplifikována metodou PCR pomocí forward primeru  
 IL23Rex-F-Nco-his  
 (ATTACCATGGGCAGCAGCCACCATCATCATCATCACAGCAGCGGAATTACAAATA  
 TAAACTGCTCTGG), obsahujícího startovní kodón a polyhistidinylovou sekvenci (His<sub>6</sub>), a reverzního primeru  
 IL23Rex-R-Xho  
 (GGGCACCTTACTTCTGACAACTGACTCGAGATAT) nesoucího TGA stop kodón. Výsledný PCR produkt byl vložen do pET-28b vektoru (Novagen, Německo) za využití NcoI a XhoI klonovacích míst a vložen do buněk *Escherichia coli* TOP10. Výsledný plasmid byl použit pro produkci proteinu v *E. coli*, kmene SHuffle (SHuffle T7 Express Competent *E. coli*, New England Biolabs, Ipswich, MA). Bakteriální buňky byly kultivovány v LB médiu s kanamycinem (60 µg/l) při 30 °C, produkce proteinu byla indukována přidavkem 1 mM isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) poté, co kultura dosáhla denzity OD<sub>600</sub> = 0,6, a buňky byly sklizeny centrifugací 4 hodiny po indukci. Protein byl extrahován po sonikaci v TN pufru (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 8,0) jako nerozpustný při fyziologickém pH. Sraženina proteinu byla zcentrifugována při 40000xg po dobu 20 minut a promyta TN pufrém, poté centrifugována a rozpuštěna v TN pufru obsahujícím 8M močovinu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 8M močovina, pH = 8,0). Pro zvýšení čistoty proteinu byla provedena Ni-NTA afinitní chromatografie a výsledný protein byl eluován v elučním pufru EB (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 250 mM imidazolu, pH = 8,0) obsahujícím 4M močovinu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 250 mM imidazolu, 4M močovina, pH = 8,0).

Pro produkci proteinu v periplasmě byla příslušná cDNA vložena po směru čtení (downstream) za pelB-vedoucí sekvenci do pET-26b vektoru (Novagen, Německo) s využitím stejných restrikčních míst jak je uvedeno výše a poté vložena do *E. coli* kmene BL21 (DE3). Kultura v LB médiu s kanamycinem (60 µg/l) byla pěstována při 30 °C do dosažení denzity  $OD_{600} = 1,0$ , produkce proteinu byla indukována 1 mM IPTG a buňky byly sklizeny po 4 hodinách. Exprese vedla k produkci nerozpustného proteinu, který byl po sonikaci extrahován 8M močovinou v TN pufru a přečištěn na koloně s Ni-NTA-agarózou.

### **Produkce rekombinantní podjednotky p19 cytokinu IL-23**

Pro studium interakcí mezi IL-23R a IL-23 byly sestrojeny plasmidové konstrukty pro produkci p19/IL-23 v bakteriích. Rekombinantní p19/IL-23 (jeho vypočtená molární hmotnost je 23,3 kDa) s N-terminálním dvojitým polyhistidylovým motivem His<sub>6</sub> a TEV konzervativním štěpícím místem pro proteázu (tzv. DH-p19 protein) byl připraven použitím syntetické, kodónově optimalizované p19 kódující cDNA (GENEART, Německo), která byla vpravena do vektoru pET-28b klonováním s využitím NcoI+XhoI restrikčních míst. Vzniklý plasmid byl vložen do buněk *E. coli* Top10, namnožen a sekvenováním ověřen. Protein byl poté produkován v hostitelských buňkách *E. coli* BL21(DE3). Kultivace přes noc v 50 ml média LB obsahujícím 60 µg/ml kanamycinu byla použita pro inokulaci 1 l LB média a následnou kultivaci při 37 °C do dosažení  $OD_{600} = 1,0$ . Kultura byla indukována 1 mM IPTG po dobu 4 h při 37 °C. Buňky byly sklizeny centrifugací (6000xg, 20 min), promyty TN pufr (50 mM Tris pufr s 150 mM NaCl, pH = 8) a znovu centrifugovány (5000xg, 10 min). Pelety byly resuspendovány v 10 ml TN pufru a rozrušeny sonikátorem MISONIX 3000. Lyzáty byly centrifugovány 20 min při 40000xg a nerozpustný DH-p19 byl extrahován z inkluzních tělísek 2 ml 8M močoviny v TN pufru. Močovinový extrakt byl ponechán třepat 1 h při laboratorní teplotě a centrifugován 20 min při 40000xg. Supernatant byl aplikován na 1 ml Ni-NTA agarózovou kolonu ekvilibrovanou 5 ml TN pufru. Promývání bylo prováděno 10 ml TN pufru s 8M močovinou a poté TN pufr obsahujícím 8M močovinu a 20 mM imidazol. DH-p19 byl eluován TN pufr obsahujícím 8M močovinu a 250 mM imidazol v 0,5 ml frakcích.

Alternativně byl rozpustný p19 připraven z upraveného konstruktu DNA ve formě fúzního proteinu s cDNA proteinu vázícího maltózu (MBP) (*Mal E*) nesoucího dvojitě His<sub>6</sub> značení na N-konci (vypočtená molární hmotnost 69 kDa). Bylo zjištěno, že malE cDNA kódující MBP v kombinaci s modifikací na C-konci podporuje rozpustnost výsledného p19-MBP fúzního proteinu. Sekvence p19 byla vložena do vektoru odvozeného od pET-28b, nesoucího sekvenci

kódující dvojitý polyhistidinový tag za tvorby výsledné sekvence pro produkci proteinu His<sub>6</sub>-MBP-TEV-MCS-TEV-6xHis, a to s použitím primerů p19-F-NheI (GGGCTAGCTAGCAGAGCTGTGCCTGGGGGC) a p19-R-XhoI (GCGCCTCGAGGGGACTCAGGGTTGCTGCTC). Hostitelské buňky *E. coli* TOP10 (Life Technologies, Carlsbad, CA) byly transformovány vektorem s klonovaným p19 a vysety na LB agar suplementovaný 60 µg/ml kanamycinu. Protein byl produkován v *E. coli* BL21(DE3). K inokulaci 50 ml LB média obsahujícího 60 µg/ml kanamycinu byla použita jediná kolonie. 20 ml kultury pěstované přes noc bylo použito k inokulaci 1 l kultivačního média a dále pěstováno při 37 °C do dosažení OD<sub>600</sub> = 0,6. Kultura byla indukována IPTG při 20 °C a ponechána růst 4 h. Buňky byly sklizeny centrifugací 20 min při 6000xg, promyty TN pufrém (pH = 8) a centrifugovány 10 min při 5000xg. Pelety byly resuspendovány v 10 ml TN pufru a rozrušeny ultrazvukovými pulsy na sonikátoru MISONIX3000. Lyzáty byly centrifugovány 20 min při 40000xg. Cytoplasmatická frakce obsahující rozpustný DH-MBP-p19 byla nalita na 5 ml His-Trap kolonu s Ni-NTA agarózou a přečištěna na ÄKTA purifier (GE Healthcare, Británie). Eluce byla provedena ve třech krocích s pufrém obsahujícím 250, 500 a 1000 mM imidazolu. Frakce o objemu 1,5 ml získané elucí 500 mM imidazolem byly ověřeny na SDS-PAGE a ty, které obsahovaly DH-MBP-p19, byly sloučeny a použity dále.

### **ELISA test vazebné aktivity exIL-23R a p19**

Rekombinantní extracelulární receptor IL-23 (exIL-23R) nebo protein p19 byly imobilizovány přímo na NUNC Polysorp 96-jamkovou destičku zředěním ve vazebném pufru (100 mM hydrogenuhličitanový/uhličitanový roztok, pH = 9,6) na koncentraci 5<sup>12</sup> µg/ml a inkubovány za nízké teploty (cca 7 °C) přes noc. Další den byla destička omyta PBS pufrém obsahujícím 0,05% Tweenu (PBST) a blokována 1% BSA rozpuštěným ve stejném roztoku (PBSTB). V případě imobilizace exIL-23R (*E. coli* SHuffle a BL21 (DE3)) byl tento receptor v 4M močovinném roztoku zředěn alespoň 20x ve vazebném pufru; a přečištěné rekombinantní proteiny DH-MBP-p19 i DH-p19 byly aplikovány v sériovém ředění v PBSTB a detegovány za použití kozí polyklonální protilátky proti lidskému IL-23 (anti-p19) a následně myšího anti-kozího konjugátu IgG-křenové peroxidázy (HRP) (BioLegend, San Diego, CA), obojí zředěno v PBSTB 1:1000. Vazba exIL-23R k imobilizovanému DH-MBP-p19 byla detegována pomocí kozí polyklonální protilátky anti-IL-23R (1:250) a následně sekundárního králičího anti-kozího konjugátu s HRP (1:1000) (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Všechny experimenty ELISA byly vizualizovány enzymatickou reakcí HRP s OPD substrátem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) v citrátovém pufru (3,31% dihydrátu citrátu trisodného, fosforečná kyselina, pH = 5,0), reakce byla zastavena 2M kyselinou sírovou a byla měřena absorbance při 492 nm.

Pomocí ELISA, kde byly imobilizované proteiny exIL-23R testovány na vazbu p19, bylo ověřeno, že oba rekombinantní exIL-23R proteiny rozeznávají p19 protein. Jak je ukázáno na obr. 1, rozpustný DH-MBP-p19 se váže na imobilizovaný produkt H-exIL23R s vysokou afinitou. Tento výsledek byl potvrzen i inverzním provedením ELISA, kde byl imobilizován DH-MBP-p19, a také ELISA testy, kde byl protein DH-MBP-p19 zaměněn za refoldovaný DH-p19. Obě varianty proteinů p19 vázaly také pelB-H-exIL-23R. Kombinace všech dat ukazuje, že refolding H-exIL-23R je dostačující pro to, aby byl protein rozpoznán p19, a tedy může být používán jako cíl pro selekci IL-23R-specifických vazebných molekul.

### **Konstrukce ABD knihovny a selekce pomocí ribozomálního displeje**

Kombinatoriální knihovna DNA o teoretické komplexitě  $10^{14}$  variant proteinů byla vytvořena metodami popsány dříve (Ahmad JN et al.: *Proteins* 2012;80(3):774-789). Sestavená knihovna byla transkribována/translatována *in vitro* v jediném kroku pomocí extraktu *E. coli* (EasyXpress Protein Synthesis Mini Kit, QIAGEN, Německo) a použita pro selekci přeložených vazebných proteinů pomocí metody ribozomálního displeje. Pro selekci vazebných proteinů byly jamky na Maxisorp destičce (NUNC, Dánsko) pokryty rekombinantním IL-23R, vyprodukovaným kmenem *E. coli* SHuffle (DH-exIL-23R) a blokovány 3% BSA. Preselekce byla prováděna v jamkách pokrytých jen BSA. Dvě skupiny cDNA vazebných proteinů ABD přepsaných po třetím nebo pátém kole selekčního procesu byly klonovány mezi restrikční místa NcoI a XhoI ve vektoru pET-28b obsahujícím vloženou úplnou sekvenci tolA cDNA, a transformovány do hostitelských buněk *E. coli* TOP10. Dále byla na C-konec tolA přidána sekvence AviTag (GLNDIFEAQKIEWHE), umožňující *in vivo* biotinylacii na lysinu a vazbu streptavidinu. Sekvence AviTag byla vložena pomocí PCR s forward primerem EWT5-ABDfor1 (TTCCTCCATGGGTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTA) a reverzním primerem tolA-AVirev1 (TTTCCGCTCGAGCTATTCGTGCCATTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTCA GGCCCGGTTTGAAGTCCAATGGCGC). Finální fúzní vazebné proteiny 6xHis-ABD-TolA-AviTag byly připraveny jako biotinylované proteiny v kmeni *Escherichia coli* BL21 (DE3)

BirA exprimujícím biotin ligázu (BirA). Bakteriální buňky byly kultivovány v LB médiu obsahujícím kanamycin (60 µg/ml) a 50 µM d-biotinu (připraven 5 mM roztok v 10 mM bicinovém pufru, pH = 8.3). Produkce proteinů byla indukována přidáním 2 mM IPTG poté, co kultura dosáha denzity OD<sub>600</sub> = 0,6. Kultura byla sklizena 4 hodiny po indukci, sonikována v Tris pufru (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 8,0), centrifugována a protein byl pak přečištěn na koloně s Ni-NTA agarózou.

Byla identifikována sada vazebných polypeptidů vážících se na rekombinantní H-exIL-23R. Aby bylo možno produkovat *in vivo* biotinylované varianty ABD potřebné pro ověření vazebné afinity metodou ELISA, byly varianty ABD nalezené po třetím nebo pátém kole selekčního procesu modifikovány vložem Avitag sekvence po směru přepisu (downstream) od C-konce TolA.

Dále byly testovány následující sekvence vazebných polypeptidů:

LAEAKVLANRELDKYGVSDKYKNGINNALCVRRVKALIDWILAYLP (SEQ. ID NO. 20) (REX001)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDTYKNDINAASYVPAVKWAIDRILASLP (SEQ. ID NO. 21) (REX005)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNRINPACHVLSVKSNIWILASLP (SEQ. ID NO. 22) (REX009)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDVYKNTINIAIPVRVVKRVIDWILAVLP (SEQ. ID NO. 23) (REX115)  
 LAEAKVLTNRELDKYGVSDAYKNLINAALIVAKVKLLIDAILAPLP (SEQ. ID NO. 24) (REX122)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDHYKNWINPARRVRPVKWLIDAILAALP (SEQ. ID NO. 25) (REX125)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDRYKNSINRALPVAAVKWALDLILAWLP (SEQ. ID NO. 26) (REX128)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDWYKNCITAARAVTTVKLLIDITILALLP (SEQ. ID NO. 27) (REX129)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDHYKNPINVAWTVGRVKVWIDAILAPLP (SEQ. ID NO. 28) (REX012)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDPYKNPINCACPVTEVKPPIDAILALLP (SEQ. ID NO. 29) (REX016)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDHYKNSINPAPQVIVVKVNIIDLILAGLP (SEQ. ID NO. 30) (REX101)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDRYKNWINRAWLVALVKRQIDQILALLP (SEQ. ID NO. 31) (REX107)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDYKNAINAANPVSGVKRPIDVILAALP (SEQ. ID NO. 32) (REX108)  
 LAEAKVLANRELDKYGVSDHYKNSINPAFKVHSVKGIDWILAGLP (SEQ. ID NO. 33) (REX127)  
 LAETKVLNRELDKYGVSDWYKNRINTALTVACVKLVIDWILAALP (SEQ. ID NO. 34) (REX136).

### **Konstrukce a produkce proteinu ABD divokého typu (ABDwt)**

Pro všechny vazebné testy byl používán fúzní protein TolA s původní albumin-vazebnou doménou (ABDwt) jako negativní kontrola. Konstrukce ABDwt se sekvencemi TolA a AviTag (6xHis-ABDwt-TolA-AVI) byla provedena PCR amplifikací s ABDwt-tolA plasmidovou

DNA jako templátem, forward primerem EWT5-ABDfor1 (viz výše) a reverzním primerem ABDrev (TTACTAGGATCCAGGTAATGCAGCTAAAATTTC). Amplifikovaný produkt PCR byl štěpen enzymy NcoI a BamHI a ligován do vektoru pET-28b nesoucího sekvenci tolA-AVI po směru (downstream) od BamHI. Výsledný exprimovaný protein ABDwt-TolA-AVI byl produkován a přečištěn stejným způsobem jako modifikované varianty, jak je popsáno výše.

### **Screening vazebných variant IL-23R metodou ELISA**

Pro vazebné testy byly použity vybrané klony a vkládaná sekvence byla ověřena restrikční analýzou (NcoI, BamHI, XhoI) a DNA sekvenováním. Klony obsahující správnou sekvenci 6xHis-ABD-TolA-AviTag byly použity pro izolaci plasmidové DNA a následnou transformaci kmene *E. coli* BL21 (DE3) BirA. Pro ELISA analýzu produkováných modifikovaných variant ABD byl použit buněčný lyzát klonů připravený podle dříve popsaného protokolu (Ahmad JN et al.: *Proteins* 2012;80(3):774-789) nebo přečištěné proteiny. Byla použita dvě různá sendvičová uspořádání. V prvním případě byla destička NUNC Polysorp přímo pokryta proteinem exIL-23R (5 µg/ml, rekombinantní varianta produkována v kmenu *E. coli* SHuffle) ve vazebném pufru za nižší teploty (cca 7°C) přes noc. Další den byla destička omyta puftrem PBST a jamky byly blokovány PBSTB. Vzorokly lyzátů REX variant v PBSTB nebo varianty přečištěných proteinů a kontrolní ABDwt byly aplikovány v sériovém ředění v PBSTB a vázané biotinylované REX klony byly detegovány konjugátem streptavidinu-HRP naředěném ve stejném pufru 1:1000 (Pierce). V druhém případě byla destička pokryta streptavidinem (1 µg/ml) ve vazebném pufru a blokována stejným způsobem. Biotinylované varianty modifikovaného ABD naředěné v PBSTB na koncentraci 5 µg/ml byly imobilizovány streptavidinem. exIL-23R v roztoku 4M močoviny byl naředěn 20x a pak dále vždy 3x, takže byla připravena série ředění proteinu v PBSTB a vazba receptoru k variantám modifikovaného ABD byla detegována kozí polyklonální protilátkou anti-exIL-23R (1:250) a následně sekundárním králičím anti-kozím HRP konjugátem (1:1000) (R&D Systems, Minneapolis, MN). Metodou ELISA testované pozitivní buněčné lyzáty klonů polypeptidů podle předkládaného vynálezu s TolA-AVI sekvencemi byly použity pro další analýzu.

### **Kompetiční ELISA stanovení**

Destičky Maxisorp nebo Polysorp (NUNC, Denmark) byly pokryty H-exIL-23R vyprodukovaným v kmenu *E. coli* SHuffle nebo periplasmatickým pelB-exIL-23R

vyprodukovaným v *E. coli* BL21(DE3), a vazba DH-MBP-p19 nebo DH-p19 jako analytů byla detegována pomocí protilátek, jak bylo popsáno výše. Alternativně byly destičky pokryty DH-MBP-p19 nebo DH-p19 a byla detegována vazba receptorových variant pomocí odpovídajících protilátek. V obou uspořádáních experimentu byla použita konstantní koncentrace každého analytu (20 nM DH-MBP-p19, 50 nM DH-p19, 60 nM oba exIL-23R) v roztoku v PBSTB, z níž byly sériovým ředěním připravovány vzorky pro kompetici s testovanými modifikovanými ABD proteiny. Dvě neúčinněji inhibující varianty, REX009 a REX125, byly testovány na imobilizovaném rekombinantním IL-23R Fc chiméřním proteinu (R&D Systems, Minneapolis, MN) produkovaném buněčnou linií myšního myelomu. Destička Polysorp byla pokryta 1 až 2 µg/ml IL-23R chiméřního proteinu naředěného ve vazebném pufru, a DH-MBP-p19 (20 nM) nebo lidský cytokin IL-23 (23 nM) (R&D Systems, Minneapolis, MN) byl následně použit pro kompetici s REX009 a REX125 obsahujícími klony.

Na základě výsledků vazebných testů byla dále zkoumána schopnost nejlepších modifikovaných ABD proteinů inhibovat vazbu p19/IL-23R. Zde byla použita kompetiční ELISA s imobilizovaným H-exIL-23R a konstantním množstvím DH-MBP-p19 analytu s různými koncentracemi modifikovaných ABD proteinů-TolA-AVI. Zjistili jsme, že 11 variant vykazuje inhibici vazby p19 v mikromolárních koncentracích, a dvě nejlepší varianty, REX009 a REX125, dokonce v nanomolárních koncentracích. Výsledky kompetiční ELISA pro 10 nejlepších modifikovaných ABD proteinů jsou ukázány na obr. 5. Pro ověření inhibičního potenciálu polypeptidů podle předkládaného vynálezu byla zopakována kompetiční ELISA i v opačném uspořádání, která potvrdila výsledky.

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

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

### **Detekce IL-23R na povrchu buněk a vazba modifikovaných ABD proteinů a p19/IL-23 k buněčným liniím**

Všechna stanovení byla prováděna v pufru HBSS (10 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl) doplněném 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> a 1% (v/v) FCS (cHBSS) na 96-jamkových kultivačních destičkách (NUNC, Roskilde, Denmark). Barvení molekul IL-23R na buněčném povrchu bylo prováděno tak, že bylo 30 min při 4 °C inkubováno 5 x 10<sup>5</sup> buněk v 50 μl pufru cHBSS obsahujícího anti-lidský IL-23R-APC (ředění 1:5) nebo monoklonální protilátky isotypové kontroly-APC (ředění 1:5). Ve vazebných stanoveních pro modifikované ABD proteiny bylo inkubováno 5 x 10<sup>5</sup> buněk ve 100 μl pufru cHBSS s biotinylovanými modifikovanými ABD proteiny nebo ABD kontrolami (10 μg/ml) po dobu 30 min při 4 °C, promyto cHBSS, a na buňkách vázaný komplex modifikovaného ABD proteinu s biotinem nebo ABD-biotin byl barven streptavidin-phycoerythrinem (ředění 1:400) po dobu 30 min při 4 °C. Při vazebném stanovení s DH-p19 bylo inkubováno 5 x 10<sup>5</sup> buněk ve 100 μl cHBSS s nebo bez DH-p19 (10 μg/ml) po dobu 30 min při 4 °C. Buňky byly promyty cHBSS a na buňkách vázaný DH-p19 byl barven myší monoklonální protilátkou proti p19 (ředění 1:50) po dobu 30 min při 4 °C a po promytí dále kozí anti-myší protilátkou IgG značenou Cy5 (ředění 1:50) po dobu 30 min při 4 °C.

Buňky byly promyty, resuspendovány v 100 μl HBSS a analyzovány průtokovou cytometrií na přístroji FACS LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA) v přítomnosti 5 μg/ml propidium jodidu. K vyloučení buněčných agregátů a mrtvých buněk byly použity odpovídající nastavení parametrů pro třídění buněk a vazebná data byla stanovena na základě průměrných intenzit fluorescence (MFI).

### **DH-p19 blokování vazby modifikovaných ABD proteinů k buňkám THP-1**

Blokování vazby modifikovaných ABD proteinů k buňkám k molekule receptoru IL-23 proteinem DH-p19 bylo zkoumáno tak, že buňky THP-1 (2 x 10<sup>5</sup>) byly preinkubovány po dobu 15 min při 4 °C v přítomnosti sériově ředěného DH-p19 v 50 μl pufru cHBSS. Biotinylované klony REX-TolA-AVI nebo ABD-WT-TolA-AVI jako negativní kontrola v 50 μl pufru cHBSS v konečné koncentraci 13 nM byly přidány k buňkám ve stálé přítomnosti DH-p19 a inkubovány při 4 °C po dobu 30 min. Buňky byly promyty cHBSS a na buňce vázané biotinylované modifikované ABD proteiny nebo ABDwt byly detegovány konjugátem streptavidinu-fykoerytrinu (ředění 1:400) po dobu 30 min při 4 °C. Buňky byly promyty, resuspendovány v 100 μl HBSS a analyzovány průtokovou cytometrií jak je popsáno výše.

### **Testování T-buněk produkujících IL-17 pomocí anti-CD3 stimulace PBMC**

Neseparované buňky periferní krve odebrané do zkumavek obsahujících EDTA byly použity pro získání přečištěných mononukleárních buněk (PBMCs) za použití Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). PBMCs byly jednou promyty PBS a resuspendovány v úplném médiu RPMI 1640 (RPMI 1640 suplementované 10% tepelně inaktivovaným FCS, 100 U/ml penicilinem, 100 µg/ml streptomycin sulfátem a 1,7 mM glutamátem sodným). Buňky PBMC byly vyředěny na koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/ml a aktivovány na 96-jamkové destičce předem potažené anti-CD3 (MEM-57, 10 µg/ml, Exbio Praha a.s., Praha) v přítomnosti kostimulačních protilátek (CD28/CD49d, 1 µg/ml, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), IL-23 (10 ng/ml), IL-2 (100 U/ml). Do každé jamky buď nebyl přidán žádný inhibitor, nebo byly přidány modifikované ABD proteiny REX009, REX125, REX128 nebo kontrola ABDwt REXWT (7 µg/ml), a buňky byly inkubovány tři dny při 37 °C. Pak byly buňky ponechány stát přes noc při 37 °C v čerstvých jamkách. Další ráno byly buňky restimulovány v jamkách předem pokrytých protilátkou anti-CD3 (10 µg/ml, Exbio Praha, Praha) a znovu byly přidány kostimulační protilátky (CD28/CD49d, 1 µg/ml, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Buňky byly inkubovány 2 h při 37 °C. Poté byl do každé jamky přidán brefeldin A (10 µg/ml, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Stimulace pokračovala další 4 h při 37 °C. Po inkubaci byly buňky barveny protilátkami proti CD8 Horizon V-500 (BDB) po dobu 15 min ve tmě. Buňky byly pak promyty promývacím pufrem (PBS obsahující 0,1% azidu sodného a 2% želatiny (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a fixovány pomocí lyzačního roztoku pro FACS/FACS Perm 2 (BDB) podle instrukcí výrobce. Po fixaci a permeabilizaci byly buňky promyty a barveny CD3 PerCP-Cy5.5 (eBioscience, San Diego, CA, USA), CD4 ECD (Immunotech, Marseille, France) a intracelulárními markery lidského interferonu- $\gamma$  PE Cy7, IL2 APC, IL17 PB (eBioscience) a CD154 PE (Immunotech). Buňky pak byly znovu promyty a měřeny na průtokovém cytometru FACS ARIA II (BDB). Pomocí trubiček BD Truecount (BDB) naplněných známým množstvím referenčních perliček byly získány absolutní počty buněk, a buňky byly barveny Syto-16 a DAPI (Invitrogen).

Sequence Listing ABD\_ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.  
<120> Polypeptidy pro léčbu autoimunitních chorob založenou na blokaci  
receptoru pro lidský cytokin IL-23  
<130> P  
<160> 34  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial  
<220>  
<223> modified ABD sequence  
<400> 1

Lys Tyr Lys Asn Gly Ile Asn Asn Ala Leu Cys Val Arg Arg Val Lys  
1 5 10 15

Ala Leu Ile Asp Trp Ile Leu Ala Tyr Leu Pro  
20 25

<210> 2  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 2

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

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

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

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 3

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

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

<210> 4

Sequence Listing ABD\_ST25

<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 4

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

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

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

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 5

Ala Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Ala Ala Leu Ile Val Ala Lys Val Lys  
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asp Ala Ile Leu Ala Pro Leu Pro  
20 25

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

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 6

His Tyr Lys Asn Trp Ile Asn Pro Ala Arg Arg Val Arg Pro Val Lys  
1 5 10 15

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

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

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 7

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

Trp Ala Leu Asp Leu Ile Leu Ala Trp Leu Pro

Sequence Listing ABD\_ST25

20

25

<210> 8  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 8

Trp Tyr Lys Asn Cys Ile Thr Ala Ala Arg Ala Val Thr Thr Val Lys  
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asp Thr Ile Leu Ala Leu Leu Pro  
20 25

<210> 9  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 9

His Tyr Lys Asn Pro Ile Asn Val Ala Trp Thr Val Gly Arg Val Lys  
1 5 10 15

Val Trp Ile Asp Ala Ile Leu Ala Pro Leu Pro  
20 25

<210> 10  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 10

Pro Tyr Lys Asn Pro Ile Asn Cys Ala Cys Pro Val Thr Glu Val Lys  
1 5 10 15

Pro Pro Ile Asp Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro  
20 25

<210> 11  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 11

His Tyr Lys Asn Ser Ile Asn Pro Ala Pro Gln Val Ile Val Val Lys

Sequence Listing ABD\_ST25

1 5 10 15

Val Asn Ile Asp Leu Ile Leu Ala Gly Leu Pro  
20 25

<210> 12  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 12

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

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

<210> 13  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 13

Glu Tyr Lys Asn Ala Ile Asn Ala Ala Asn Pro Val Ser Gly Val Lys  
1 5 10 15

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

<210> 14  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 14

His Tyr Lys Asn Ser Ile Asn Pro Ala Phe Lys Val His Ser Val Lys  
1 5 10 15

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

<210> 15  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

Sequence Listing ABD\_ST25

<400> 15

Trp Tyr Lys Asn Arg Ile Asn Thr Ala Leu Thr Val Ala Cys Val Lys  
1 5 10 15

Leu Val Ile Asp Trp Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
20 25

<210> 16

<211> 46

<212> PRT

<213> Streptococcus sp.

<400> 16

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

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu  
20 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
35 40 45

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> modified ABD sequence

<400> 17

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

Val Ser Asp

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> modified ABD sequence

<400> 18

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

Val Ser Asp

<210> 19

<211> 19

Sequence Listing ABD\_ST25

<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 19

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

Val Ser Asp

<210> 20  
<211> 46  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 20

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

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

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

<210> 21  
<211> 46  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 21

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

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

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

<210> 22  
<211> 46  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

Sequence Listing ABD\_ST25

<400> 22

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

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Arg Ile Asn Pro Ala Cys His Val Leu  
20 25 30

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

<210> 23

<211> 46

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> modified ABD sequence

<400> 23

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

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

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

<210> 24

<211> 46

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> modified ABD sequence

<400> 24

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

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

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

<210> 25

<211> 46

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> modified ABD sequence

<400> 25

Sequence Listing ABD\_ST25

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

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

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

<210> 26  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> modified ABD sequence

<400> 26

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

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

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

<210> 27  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> modified ABD sequence

<400> 27

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

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

Thr Val Lys Leu Leu Ile Asp Thr Ile Leu Ala Leu Leu Pro  
 35 40 45

<210> 28  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> modified ABD sequence

<400> 28

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

Sequence Listing ABD\_ST25

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

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

<210> 29  
<211> 46  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 29

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

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

Glu Val Lys Pro Pro Ile Asp Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro  
35 40 45

<210> 30  
<211> 46  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 30

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

Val Ser Asp His Tyr Lys Asn Ser Ile Asn Pro Ala Pro Gln Val Ile  
20 25 30

Val Val Lys Val Asn Ile Asp Leu Ile Leu Ala Gly Leu Pro  
35 40 45

<210> 31  
<211> 46  
<212> PRT  
<213> artificial

<220>  
<223> modified ABD sequence

<400> 31

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



Sequence Listing ABD\_ST25

Cys Val Lys Leu Val Ile Asp Trp Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
35 40 45

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polypeptid, obsahující sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující:

KYKNGINNALCVRRVKALIDWILAYLP (SEQ. ID NO. 1)

TYKNDINAASYVPAVKWAIDRILASLP (SEQ. ID NO. 2)

YYKNRINPACHVLSVKSNIWILASLP (SEQ. ID NO. 3)

VYKNTINIAIPVRVVKRVIDWILAVLP (SEQ. ID NO. 4)

AYKNLINAALIVAKVKLLIDAILAPLP (SEQ. ID NO. 5)

HYKNWINPARRVRPVKWLIDAILAALP (SEQ. ID NO. 6)

RYKNSINRALPVAAVKWALDLILAWLP (SEQ. ID NO. 7)

WYKNCITAARAVTTVKLLIDTILALLP (SEQ. ID NO. 8)

HYKNSINPAPQVIVVKVNIDLILAGLP (SEQ. ID NO. 11)

RYKNWINRAWLVALVKRQIDQILALLP (SEQ. ID NO. 12)

EYKNAINAANPVSGVKRPIDVILAALP (SEQ. ID NO. 13)

WYKNRINTALTVACVKLVIDWILAALP (SEQ. ID NO. 15)

přičemž na N-konci uvedené sekvence je přímo připojena sekvence mající alespoň 80% sekvenční identitu se sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující

LAEAKVLNRELDKYGVS (SEQ ID NO. 17)

LAEAKVLNRELDKYGVS (SEQ ID NO. 18)

LAETKVLNRELDKYGVS (SEQ ID NO. 19),

přičemž asociační a disociační rovnováha vazby uvedeného polypeptidu na receptor pro lidský cytokin IL-23 charakterizovaná vazebnou afinitní konstantou  $K_d$  vykazuje hodnotu menší než  $10^{-7}$  M.

2. Sekvence DNA vybraná ze skupiny zahrnující komplementární DNA kódující aminokyselinovou sekvenci polypeptidů podle nároku 1 a DNA hybridizující s uvedenou komplementární DNA za vysoce stringentních podmínek.

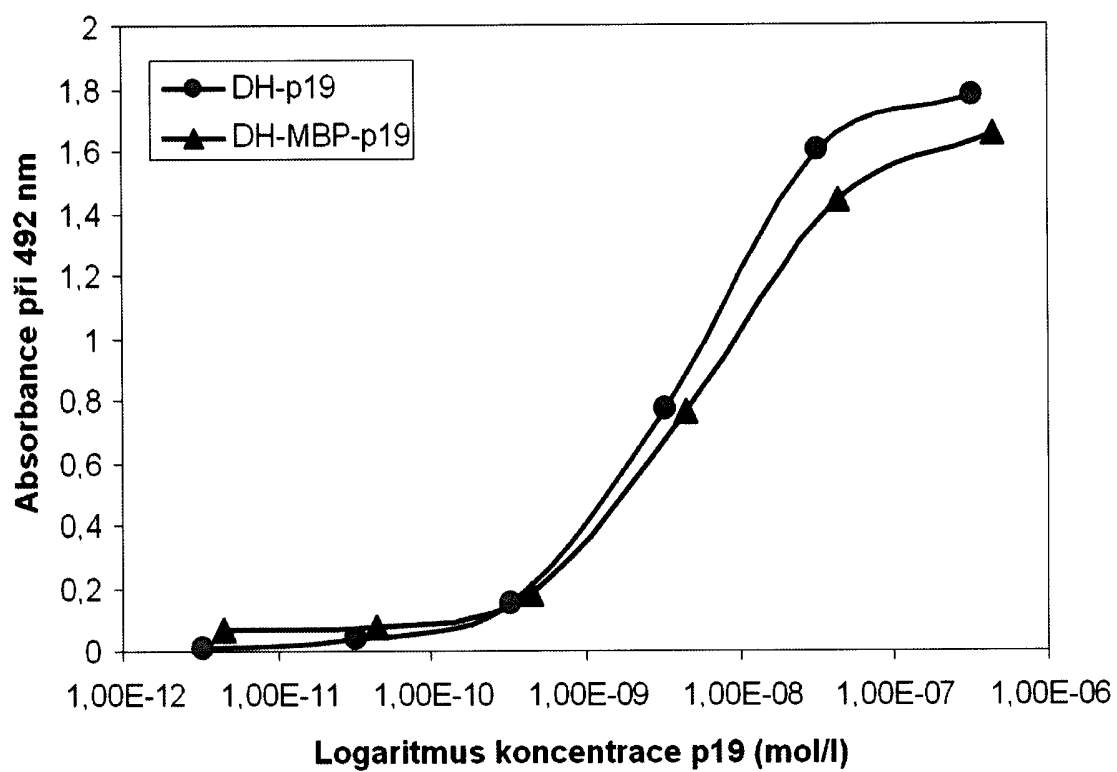
3. Použití sekvence DNA podle nároku 2 pro přípravu polypeptidů podle nároku 1 produkovaných v bakteriálních, kvasinkových, hmyzích, savčích nebo lidských hostitelských buňkách.

4. Hostitelské buňky obsahující komplementární sekvenci DNA podle nároku 2 kódující aminokyselinovou sekvenci polypeptidů podle nároku 1.

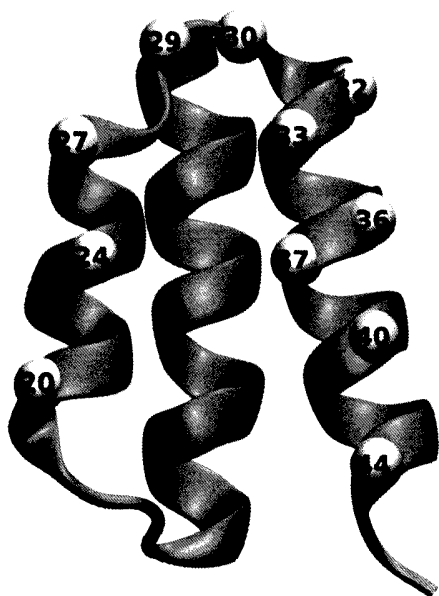
20  
19

5. Polypeptid podle nároku 1 pro použití v medicíně.
6. Polypeptid podle nároku 1 pro použití v léčbě autoimunitních chorob.
7. Polypeptid podle nároku 1 pro použití v léčbě autoimunitních chorob vybraných ze skupiny zahrnující psoriázu, Crohnovu chorobu, revmatoidní artritidu a roztroušenou sklerózu.
8. Polypeptid podle nároku 1 pro použití jako diagnostické činidlo.
9. Použití polypeptidu podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro léčbu autoimunitních chorob.
10. Použití polypeptidu podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro léčbu autoimunitních chorob vybraných ze skupiny zahrnující psoriázu, Crohnovu chorobu, revmatoidní artritidu a roztroušenou sklerózu.

24 1/8



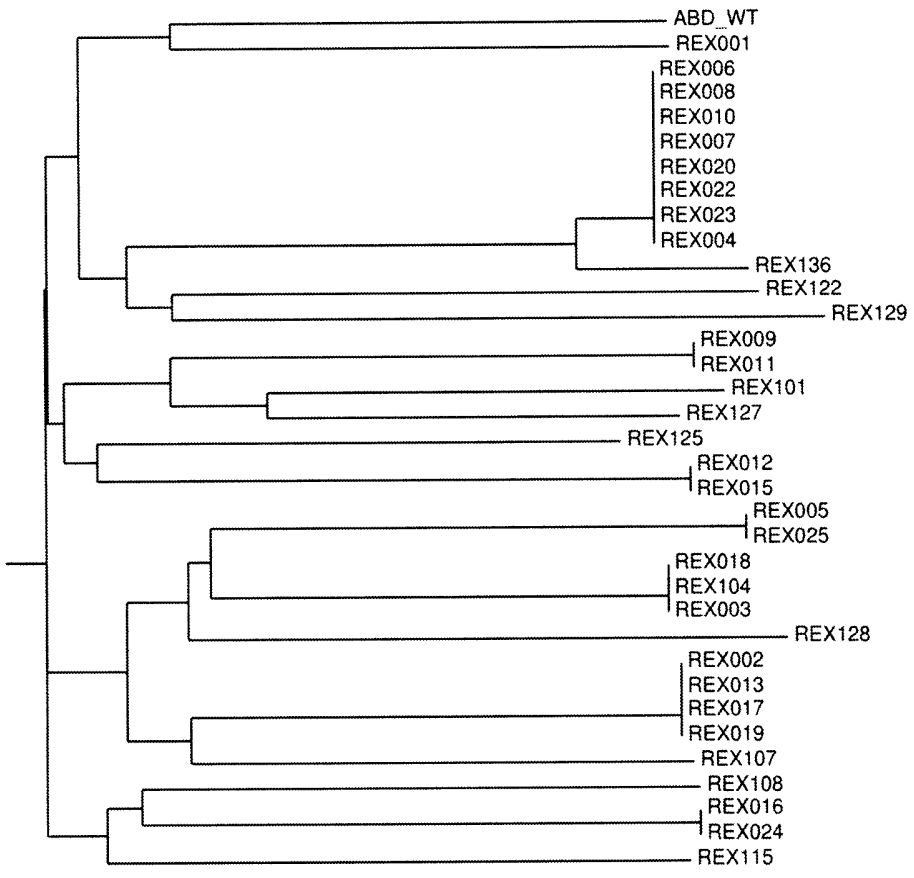
Obr. 1



Obr. 2

22 2/8

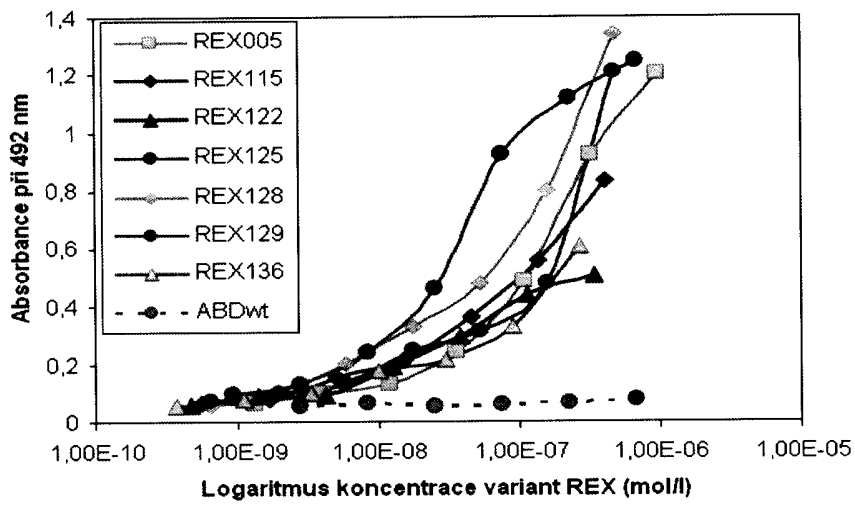
2010



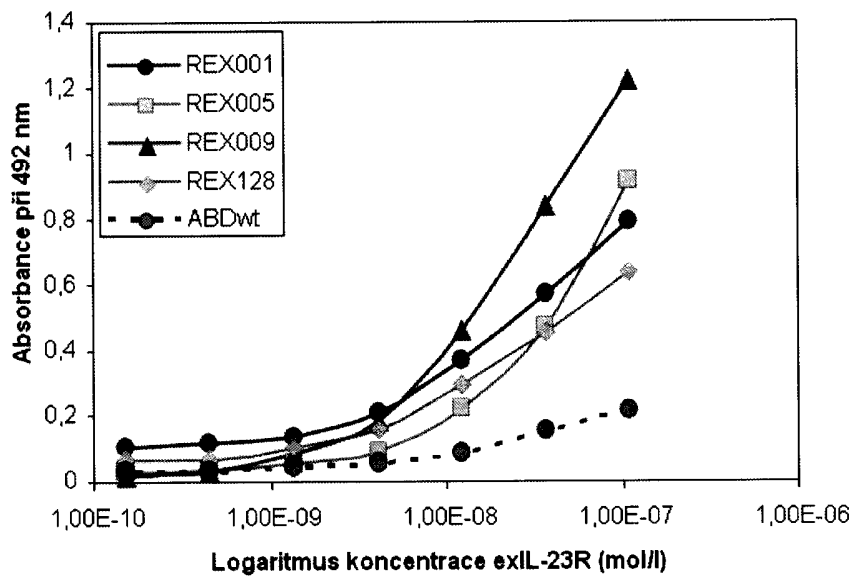
Obr. 3

23 3/P

2011



Obr. 4 a

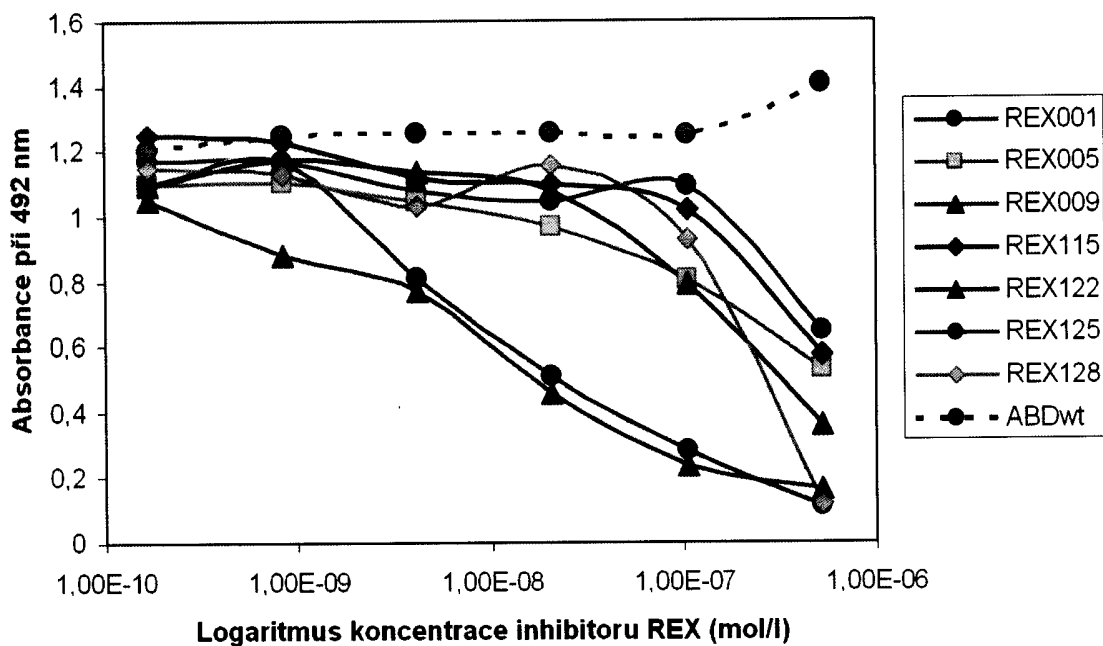


Obr. 4 b

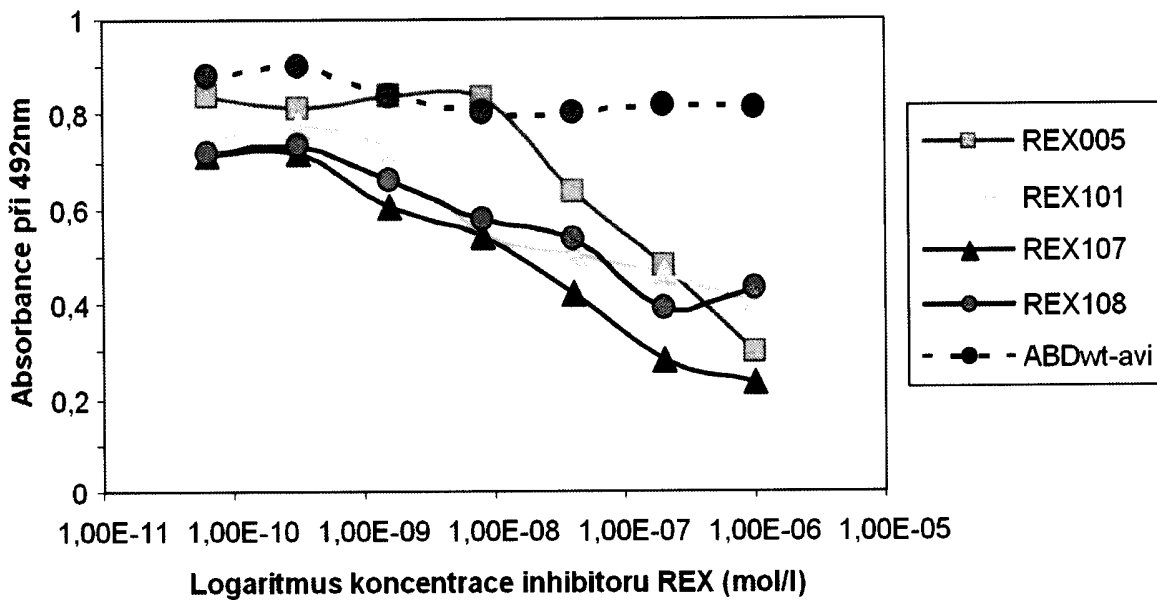
4/8

24

2011



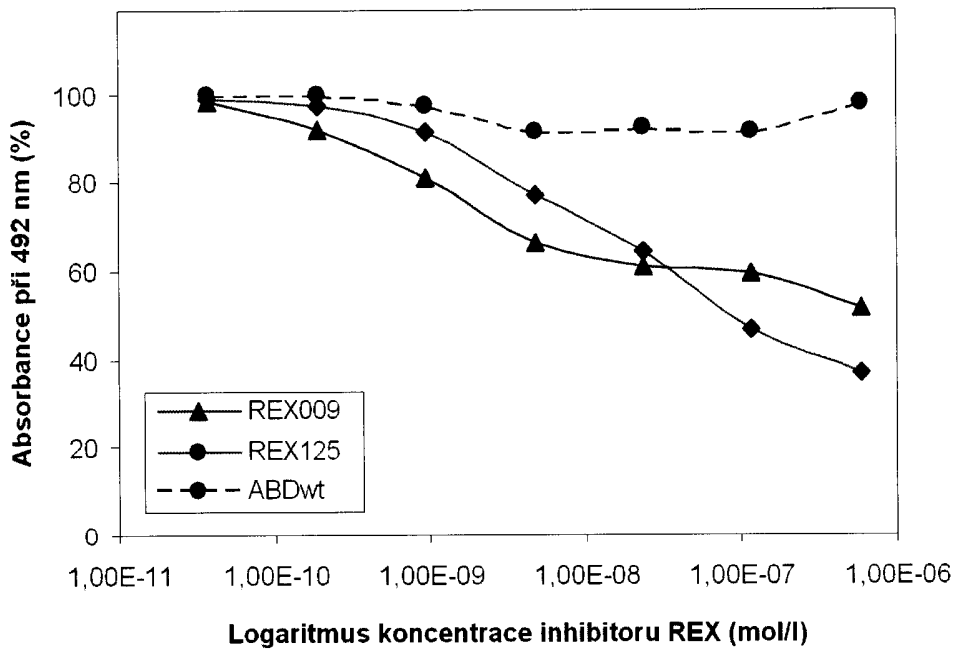
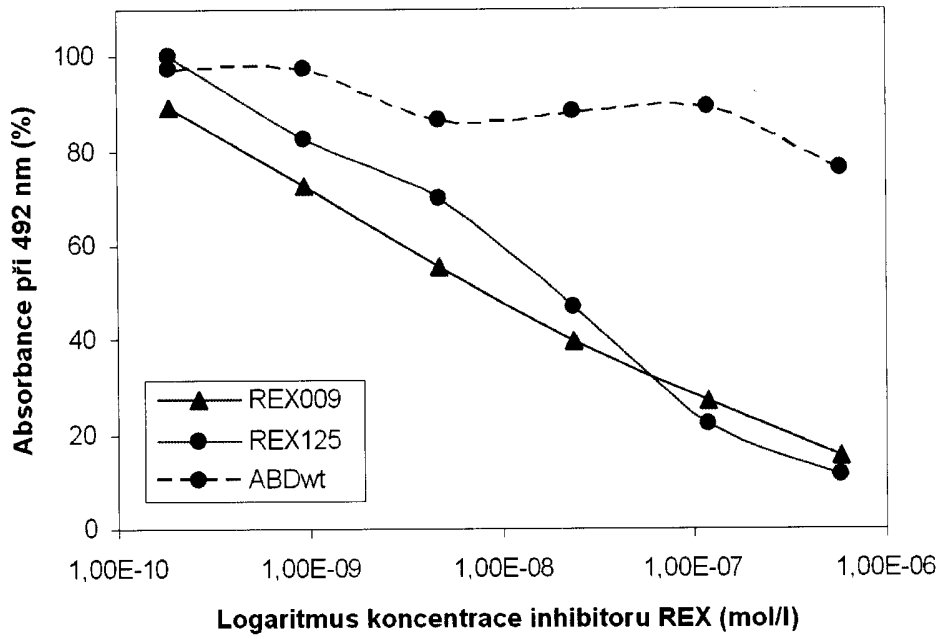
Obr. 5a



Obr. 5 b

5/8 25

201112

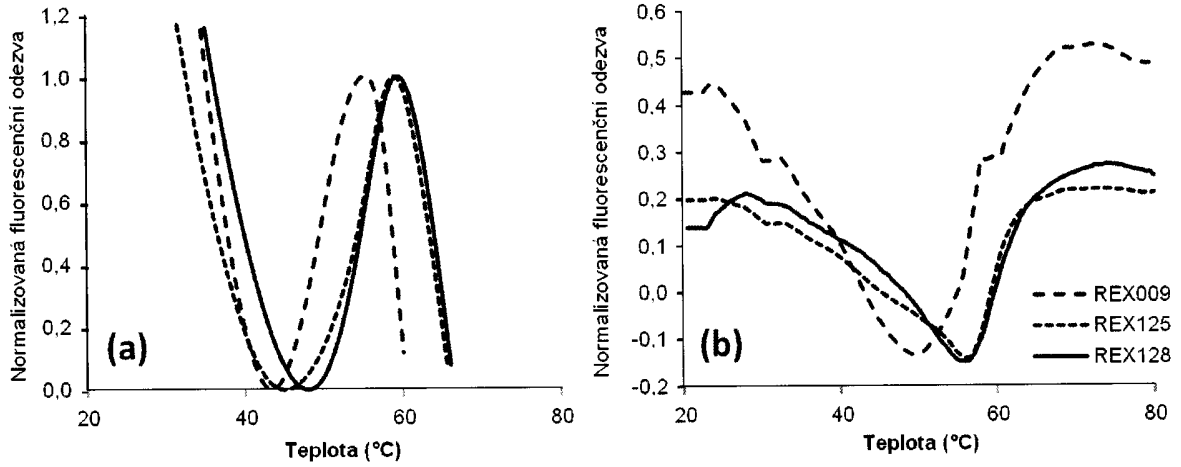


Obr. 6

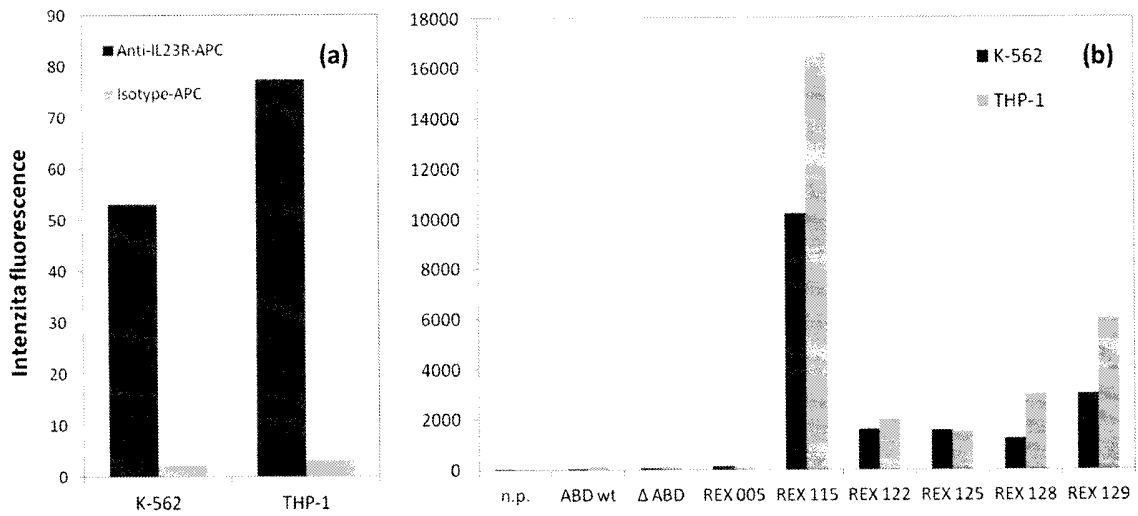
G/P

26

2011



Obr. 7

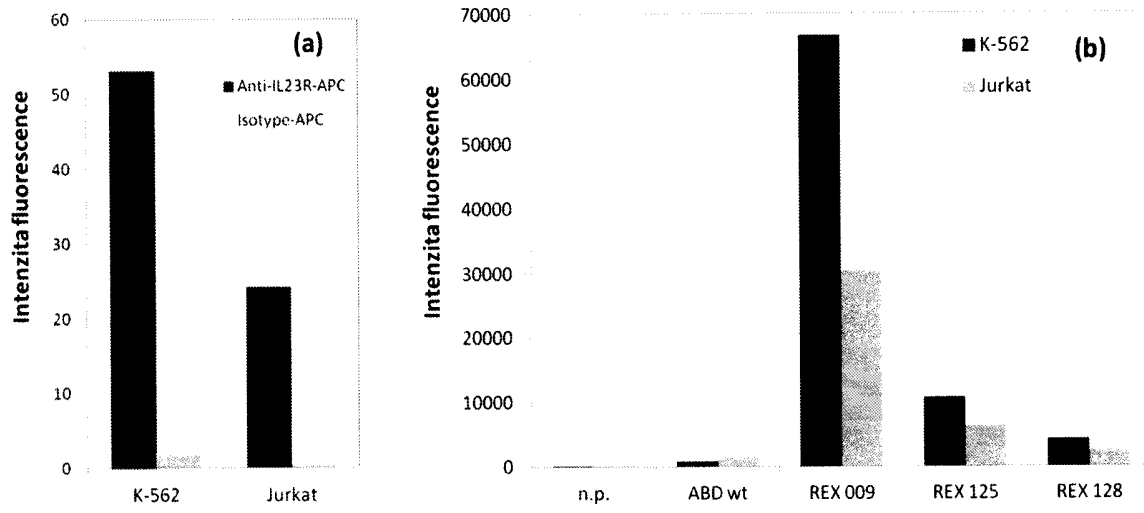


Obr. 8

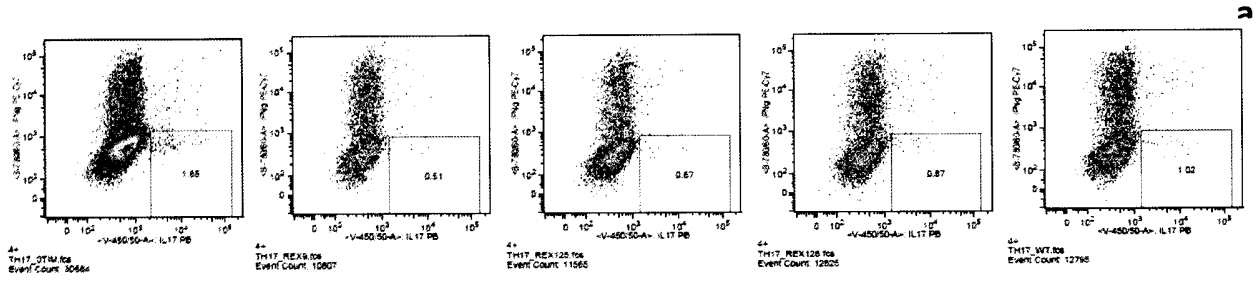
7/8

27

20110



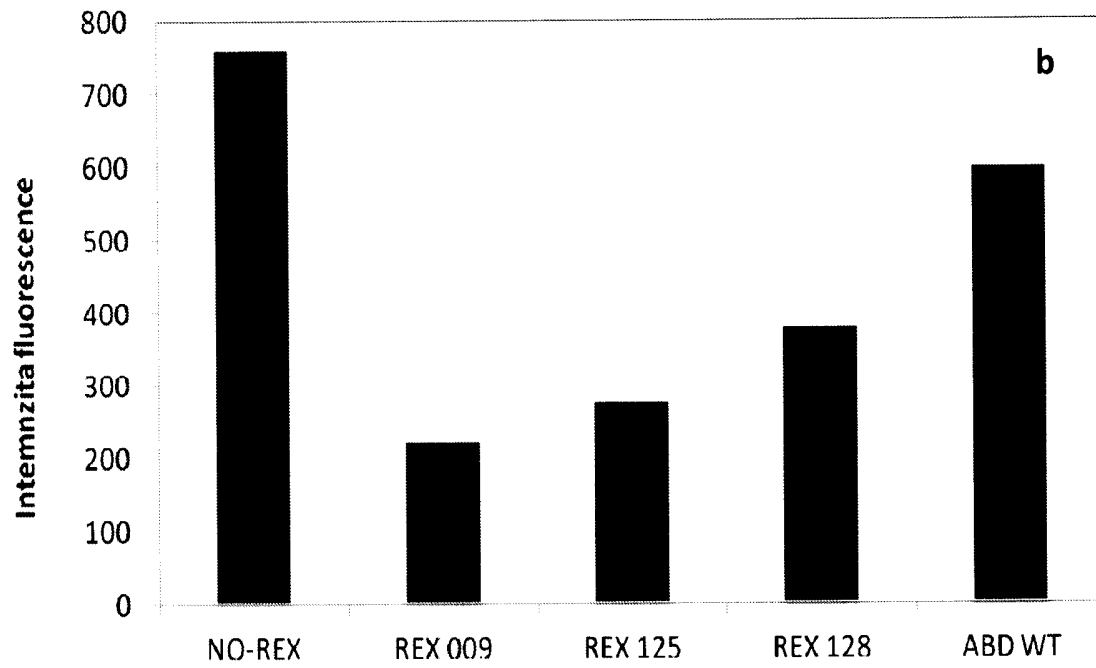
Obr. 9



Obr. 10 a

P/P

2011



Obr. 10 b