



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ  
ЗА  
ИЗОБРЕТЕНИЕ

5(51) C 07 K 15/06  
C 07 K 15/26  
C 12 N 15/22  
C 12 N 15/26  
A 61 K 37/66

## ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 96074

(22) Заявено на 16.03.92

(24) Начало на действие  
на патента от: 16.03.92

## Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в  
бюлетин № на

(45) Отпечатано на 29.09.95

(46) Публикувано в бюлетин № 6  
на 30.06.95

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег.

(73) Патентоприетател(и):

CETUS ONCOLOGY CORPORATION,  
EMERYVILLE, CA (US)

(72) Изобретател(и):

David F. Mark, Plainsboro, NJ

Leo S. Lin, Walnut Creek, CA

Shi-Da Y. Lu, Cupertino, CA (US)

(74) Представител по индустриална  
собственост:

Фани Владимирова Божинова, 1000

София, ул. "Кърниградска" 17, п.к. 728

(86) № и дата на PCT заявка:

(87) № и дата на PCT публикация:

Издава се съгласно § 4 от Преходните и заключителните разпоредби на Закона за патентите на основание издаден патент на US № Re. 33653 от 30.07.91

## (54) ЧОВЕШКИ РЕКОМБИНАНТНИ ИНТЕРЛЕВКИН-2 МУТЕИНИ

(57) Мутеините се използват при диагностика и лечение на вирусни, бактериални, протозойни и гъбични инфекции. С тях се усилва клетъчно посредстваната цитотоксичност и се подпомага възстановяването на имунните функции, включително и при състояния на придобита имунна недостатъчност. Мутеините се получават при бактериална експресия на мутантни гени, които кодират за мутеини, синтезирани от гените за родителските протеини чрез олигонуклеотидно насочена мутагенеза. Характерно за мутеините на биологично активни протеини като IFN- $\beta$  и IL-2 е, че цистеинови остатъци, които не са съществени за биологичната им активност, се изпускат или заместват с други аминокиселини, с което се елиминират места за образуване на неправилни дисулфидни връзки в молекулата.

10 претенции, 17 фигури

**(54) ЧОВЕШКИ РЕКОМБИНАНТНИ ИНТЕРЛЕВКИН-2 МУТЕИНИ****1. Област на техниката.**

Това изобретение е в общата област на рекомбинантната ДНК технология. По-специално, то се отнася до мутационни променени биологично активни протеини, които се различават от техните родителски аналози по едно или повече замествания/делеции на цистеинови остатъци.

**2. Предшествашо състояние на техниката.**

Биологично активните протеини, които са получени микробиологично чрез рекомбинантна ДНК технология, означавана по-нататък като рДНК, могат да съдържат цистеинови остатъци, които са несъществени за тяхната активност, но са свободни да образуват нежелани интермолекулярни или интрамолекулярни връзки. Такъв протеин е микробно продуциран човешки бета интерферон (IFN- $\beta$ ) В хода на получаване на IFN- $\beta$  по метода рДНК се наблюдава, че се образуват димери и олигомери на микробиално продуциран IFN- $\beta$  от екстракти от *E. coli*, съдържащи високи концентрации IFN- $\beta$ . Това образуване на мултимери прави пречистването и сепарирането на IFN- $\beta$  твърде трудоемко и отнемащо време. Налагат се няколко допълнителни операции при процеса за пречистване и изолиране като редукция на протеина по време на пречистването и повторно окисляване за възстановяване на неговата изходна конформация, като с това се повишава възможността за образуване на некоректна дисулфидна връзка. Установено е освен това, че микробиално продуцираният IFN- $\beta$  проявява трайно ниска специфична активност, което се дължи може би на образуването на мултимери или на случайни интрамолекулярни дисулфидни мостове. Поради това е желателно да може да се променят микробиално продуцираните биологично активни протеини като IFN- $\beta$  по начин, който оказва нежелано влияние върху тяхната активност, но намалява или елиминира способността им да причиняват интермолекулярно или интрамолекулярни връзки, при което протеинът придобива нежелана третична структура, (т.е. една конформация, която намалява неговата активност).

Настоящото изобретение се отнася до получаване методи на директна мутагенеза на мутационно променени биологично активни протеини (такива протеини се наричат "мутеини"-Речник по генетика и цитогенетика, 4-то изд. Шпрингер, 1976, които запазват активността на родителските аналози, обаче не притежават способността да образуват интермолекулярни връзки или нежелани интрамолекулярни дисулфидни мостове. В тази връзка Separd et al., Nature (1981) 294:563-565 описват един мутеин на IFN- $\beta$ , в който цистеинът в позиция 141 от неговата аминокиселинна последователност (има три цистеина в естествения човешки интерферон-бета в позиции 17, 31 и 141, Gene (1980) 10:11-15 и Nature (1980) 285:542-547) е заместен от тирозин. Този мутеин е получен чрез бактериална експресия на хибриден ген, получен от частичен IFN- $\beta$  сДНК клон, имащ G $\rightarrow$ A преминаване при нуклеотид 485 на IFN- $\beta$  гена. При мутеина липсва биологичната активност на природния IFN- $\beta$ , което води до извода, че заместеният цистеин е бил съществен за активността.

Методите за насочена мутагенеза са добре известни и са разгледани от Lather u Lecoq, Genetic Engineering Academic Press (1983) стр.31-50. Олигонуклеотидно насочената мутагенеза е специално разгледана от Smith and Gillam, Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press (1981) 3:1-32.

**Техническа същност на изобретението**

Една страна на изобретението мутеин на биологично активен протеин, който има поне един цистеинов остатък, свободен да образува дисулфидна връзка и несъществен за споменатата биологична активност, като в мутеина най-малко един от споменатите цистеинови остатъци е премахнат или заместен от друга аминокиселина.

Друга страна на изобретението се отнася до синтетични структурни гени, имащи ДНК последователности, които са специално моделирани (гени) за кодиране на описания синтетичен мутеин. Част от този аспект са експресионни вектори, които включват такива структурни гени, гостоприемникови клетки или микроорганизми, трансформирани с такива вектори, и процеси за получаване на синтетичен мутеин чрез култивиране на такива трансформанти или техни прогени и възстановя-

ване на мутеина от културата. В случая с мутеини, които имат терапевтично приложение, терапевтичните средства, съдържащи терапевтично активни количества мутеини и терапевтичните методи, са друга страна на изобретението.

Изобретението се отнася и до метод за предотвратяване на образуването на нежелана дисулфидна връзка в протеин, който има един или повече цистеинови остатъци, свободни да образуват такава връзка, мутационно променяне на протеина чрез делеция на цистеинов остатък (остатъци) или заместването им с други аминокиселини.

Друга една страна на изобретението е метод за получаване на описания синтетичен структурен ген чрез олигонуклеотидно насочена мутагенеза, обхващаща следните етапи:

а) хибридизация на едноверижна ДНК, обхващащ верига от структурен ген, кодиращ родителския протеин, с мутантен олигонуклеотиден праймер, комплементарен към една зона на веригата, включваща кодона за цистеина, които трябва да бъде премахнат или заместен или в някои случаи безсмислен триплет, сдвоен с кодона, освен в случай на несъвпадане на този кодон или безсмислен триплет, което определя делеция на кодона или триплет, кодиращ споменатата друга аминокиселина;

б) разширяване на праймера с ДНК полимераза за образуване на мутационен хетеродуплекс и

в) репликация на мутационния хетеродуплекс.

Мутантният олигонуклеотиден праймер, използван в този процес е друга страна на изобретението.

Описание на приложените фигури

Фигура 1 е диаграма на аминокиселинната последователност на IFN- $\beta$ .

Фигура 2 е схема, илюстрираща получаването на мутантен на IFN- $\beta$  ген чрез олигонуклеотидно насочена мутагенеза.

Фигура 3 показва диаграма на плазмид р 1trp, включващ IFN- $\beta$  гена.

Фигура 4 е диаграма на клониращия вектор M13mp8 фаг.

Фигура 5 е рестрикционна карта на клон M13- $\beta$  1.

Фигура 6 е гелен отпечатък на секвенцията на мутантен IFN- $\beta$ <sub>ser17</sub> ген, показващ промяна в единична база в кодиращата зона.

Фигура 7 е диаграма на изразяващия плазмид рTrp3.

Фигура 8(a) показва Hinfl ограничен клон рSY2501, а фигура 8 (б)-резултантните две 169 bp и 28 bp фрагмента на същия.

Фигура 9 е рестрикционна карта на клон рSY2501.

Фигура 10 показва кодиращата ДНК последователност за мутеин IFN- $\beta$ <sub>ser17</sub> със съответната аминокиселинна последователност на същата.

Фигура 11 показва единична протеинова верига 18,000 далтона, отговаряща на IFN- $\beta$ <sub>ser17</sub> в частта на клонове рSY2501 и р $\beta$  1trp.

Фигура 12 е диаграма на плазмид рLW1, който съдържа човешкия интерлевкин-2 (IL-2) ген под контрола на E.coli trp промотор.

Фигура 13 е рестрикционна карта на фагов клон M13-IL2.

Фигура 14 е рестрикционна карта на плазмид рLW46.

Фигури 15(a) и 15(б) показват съответно нуклеотидната последователност на кодиращата верига на клон рLW46 и съответната аминокиселинна последователност на мутеина IL-2, означен IL-2<sub>ser125</sub>.

Фигури 16 е диаграма на плазмид рLW32.

Фигура 17 е диаграма на плазмид рLW55.

Техническа същност на изобретението

Настоящото изобретение се отнася до мутеини на биологично активни протеини, в които несъществени за биологичната активност цистеинови остатъци са умишлено премахнати или заместени с други аминокиселини за премахване възможността за интермолекулярно омрежване или образуване на неправилна интрамолекулярна дисулфидна връзка; мутантни гени, кодиращи за такива мутеини; и начини за получаване на такива мутеини.

Протеини, които могат да бъдат мутационно променени съгласно изобретението, се идентифицират според наличната информация за цистеиновото съдържание на биологично активни протеини и по ролята на тези цистеинови остатъци по отношение на активността и третичната структура. Протеини, за които няма такава информация в литературата, могат за бъдат определени чрез систематично променяне на всеки от цистеиновите остатъци на протеина по методите, които са описани, и

определяне на биологичната активност на резултантните мутеини и тяхната склонност да образуват нежелани интермолекулярни или интрамолекулярни дисулфидни връзки. В съответствие с това, въпреки че в изобретението е специално описано и онагледено с примери по-долу получаването на мутеините на IFN- и IL-2, трябва да бъде разбрано, че същите методи могат да се прилагат за всеки друг биологично активен протеин, съдържащ функционално несъществен цистеинов остатък, който прави протеина чувствителен към образуването на нежелани дисулфидни връзки. Примери за протеини, различни от IFN- $\beta$  и IL-2, които са кандидати за мутационно променяне според изобретението, са лимфотоксини (фактор на туморната некроза), стимулиращ колонии фактор  $\alpha$ -1 и IFN- $\beta$  1. Кандидат протеините имат обикновено нечетен брой цистеинови остатъци.

В случая с IFN- $\beta$  е известно от литературата, че и гликозилирания и негликозилирания интерферон показват качествено сходни специфични активности и това, че гликозилните групи не са включени във и не допринасят за биологичната активност на IFN- $\beta$ . Но бактериално продуциран IFN- $\beta$ , който е негликозилиран, проявява постоянно количествено по-малка специфична активност, отколкото природния IFN- $\beta$ , който е гликозилиран. За IFN- $\beta$  е известно, че има три цистеинови остатъка в позиции 17, 31 и 141. Цистеин 141 е определен от Shepard et al (виж по-горе), като есенциален за биологическа активност. При IFN- $\beta$ , който съдържа четири цистеинови остатъка, има две интрамолекулярни S-S връзки: една между *cys* 29 и *cys* 138 и друга между *cys* 1 и *cys* 98. Като се основаваме на хомоложността между IFN- $\beta$  и IFN- $\alpha$  с *cys* 141 от IFN- $\beta$  би могъл да бъде включен в интрамолекулярна -S-S- връзка със *cys* 31, оставяйки *cys* 17 свободен за интрамолекулярно омрежване. Чрез отстраняване на *cys* 17 или заместването му с различна аминокиселина може да се определи дали той е съществен за биологичната активност и неговата роля в образуването на -SS-връзка. Ако *cys* 17 не е съществен за биологичната активност на протеина, резултантният протеин е отстранен или заместен *cys* 17 може да прояви специфична активност, близка до тази на природния IFN- $\beta$  и би могло също да се улесни изолирането и пречистването на протеина.

Чрез използване на олигонуклеотидно насочена мутагенеза със синтетичен олигонуклеотиден праймер, който е комплементарен към зоната на IFN- $\beta$  гена при кодона за *cys* 17, но който съдържа единична или множествени промени на бази в този кодон, може да бъде получен един ген, което има като резултат заместването на *cys* 17 с някоя друга аминокиселина по избор. Когато се желае делеция в олигонуклеотидният праймер, липсва кодон за *cys* 17. Превръщането на *cys* 17 в неутрална аминокиселина като глицин, валин, аланин, левцин, изолевцин, тирозин, фенилаланин, хистидин, триптофан, серин, треонин и метионин е предпочитаният подход. Серин и треонин са най-предпочитаните заместители поради тяхната химическа аналогия с цистеина. Когато цистеинът е премахнат, зрелият мутеин е една аминокиселина по-къс от природния родителпротеин или микробилно продуцирания IFN- $\beta$ .

За човешкия IL-2 се съобщава, че има три цистеинови остатъка, разположени в позиции 58, 105 и 125 на протеина. Както в случая с IFN- $\beta$ , IL-2 е в агрегатирана олигомерна форма, когато е изолиран от бактериални клетки и трябва да бъде редуциран с редуциращи агенти, за да се получи добър добив от бактериални екстракти. Освен това пречиственият редуциран IL-2 протеин е нестабилен и лесно се реокислява при съхраняване до една олигомерна неактивна форма. Наличието на три цистеина означава, че след реокисляване, протеинът може случайно да образува един от трите възможни интрамолекулярни дисулфидни моста, като само един от тях е правилният, т.е. какъвто е в природната молекула. Тъй като дисулфидната структура на природния IL-2 протеин не е известна, е възможно да се използва изобретението за създаване на мутации в кодоните 58, 105 и 125 на IL-2 гена и да се определи кои цистеинови остатъци са съществени за активността и поради това е най-вероятно да бъдат включени при естественото образуване на дисулфидна връзка (мост). В същата връзка цистеиновият остатък, който не е съществен за активността, може да бъде модифициран за да се предотврати образуването на неправилни интрамолекулярни дисулфидни мостове и да се сведе до минимум вероятността за образуване на интермолекулярни дисулфидни мостове чрез от-

страняване или заместване на свободен цистеинов остатък.

Големината на олигонуклеотидния праймер се определя от изискването за стабилна хибридизация на праймера до зоната на гена, в която ще бъде индуцирана мутацията, и от ограниченията на известните методи за синтезиране на олигонуклеотиди. Факторите, които трябва да се имат предвид при проектиране на олигонуклеотиди за използване при олигонуклеотидно насочена мутагенеза (например обща големина, големина на частта, граничеща с мястото на мутация), са описани от Smith и Gillam. Общата дължина на олигонуклеотида трябва да е такава, че да оптимизира стабилна, уникална хибридизация на мястото на мутация, като 5' и 3' от мястото на мутацията трябва да са с достатъчна големина за избягване редактиране на мутацията от екзонуклеазната активност на ДНК полимеразата. Използвани за мутагенеза олигонуклеотиди съгласно изобретението съдържат обикновено от 12 до 24 бази, за предпочитане около 14 до 20, и по-добре от 15 до 18 бази. Обикновено те съдържат най-малко около три бази 3' от променения или липсващ кодон.

Методът за получаване на модифициран IFN- $\beta$  ген най-общо включва индуциране на специфична по място мутагенеза в IFN- $\beta$  гена при кодон 17 (TGT), като се използва синтетичен нуклеотиден праймер, който изпуска кодона или го променя така, че той да кодира за друга аминокиселина. Когато тронин замества цистеина и праймерът е хибридиран до безсмислената верига IFN- $\beta$  гена, предпочитаният нуклеотиден праймер е GCAATTTTCAGACTCAG (подчертаването означава променения кодон). Когато се желае премахване на цистеина, предпочитаният праймер

е AGCAATTTTCAGCAGAAGCTCCTG, който изпуска TGT кодона за сус. Когато цистеинът се замества със серин, се избира един 17-нуклеотиден праймер, GCAATTTTCAGAGTCAG, включващ AGT кодон за серин. Преминаването T  $\rightarrow$  A при първата база в сус 17 кодон резултира в променяне на цистеина до серин. Трябва да се отбележи, че когато се въвеждат делеции, трябва да бъде подържана подходяща рамка за ДНК последователността за експресия на желанния протеин.

Праймерът се хибридира до едноверижен фаг, като M13, fd, или X174, в който е клонирана една верига на IFN- $\beta$  гена. Трябва да се отбележи, че фагът може да носи смислената или безсмислената верига на гена. Когато фагът носи безсмислената верига, праймерът е идентичен с тази част на смислената верига, която съдържа кодона, който ще мутира, освен при несъвпадение с кодона, който определя премахването на кодона или триплет който кодира за друга аминокиселина. Когато фагът носи смислената верига, праймерът е комплементарен към тази част на смислената верига, съдържаща кодона, който мутира, освен при подходящо несъвпадение, в триплета, сдвоен с кодона, който трябва да бъде премахнат. Условието, които трябва да се използват при хибридирането, са описани от Smith и Gillam. Температурата обикновено е от 0 до 70°C, по-специално от 10 до 50°C. След хибридирането праймерът се разширява върху фаговата ДНК чрез реакция с ДНК полимеразата I, T<sub>4</sub> ДНК полимеразата, обратима транскриптаза или друга подходяща ДНК полимеразата. Получената dsДНК се преобразува в затворена кръгова dsДНК чрез третиране с ДНК лигаза, например T<sub>4</sub> ДНК лигаза. ДНК молекулите, съдържащи едноверижни зони, могат да бъдат разрушени чрез S<sub>1</sub> ендонуклеазно третиране.

Олигонуклеотидно насочената мутагенеза може да се използва за получаване на мутантен IL-2 ген, който кодира един мутеин имащ IL-2 активност, но в който сус 125 е променен в серин 125. Предпочитаният олигонуклеотиден праймер използва за получаване на мутантния IL-2 ген, когато фагът носи чувствителната нишка на гена, е GATGATGCTTCTGAGAAAAGGTAATC. Този олигонуклеотид има C  $\rightarrow$  G промяна в средната база, върху тройката, която е сдвоена с кодон 125 на IL-2 гена.

Тогава резултиращият мутационен хетеродуплекс се използва за трансформиране на компетентен гостоприемников микроорганизъм или клетка.

Реплицирането на хетеродуплекса чрез гостоприемника дава потомство от двете нишки. След реплициране мутантния ген може да се изолира от прогените на мутантната верига, да се включи в един подходящ експресионен вектор и векторът да се използва за

трансформиране на подходящ микроорганизъм или клетка гостоприемник. Предпочитани вектори са плазмидите pBR322, pCR1 и техни варианти, синтетични вектори и други подобни. Подходящи микроорганизми - гостоприемници са *E.coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, различни шамове дрожди, *Bacillus thermophilus*, животински клетки, например от мишка, плъх или от яйчници на китайски хамстер (СНО), растителни клетки и растения гостоприемници, животински и растителни гостоприемници и други. Когато избраният гостоприемник е трансформиран с вектора, се въвеждат също подходящи промотор операторни последователности, за да се изрази мутеинът. Гостоприемниците могат да бъдат прокариотни или еукариотни клетки (методи за инсерция на ДНК в еукариотни клетки са описани в РСТ заявки №№ US 81/00239 и US81/00240, 1981). Предпочитаните гостоприемници са *E. coli* и СНО клетки. Получените съгласно изобретението мутеини могат да са гликозилирани или негликозилирани в зависимост от гликозилирането на природния родителски протеин и микроорганизмът гостоприемник, използван за получаване на мутеина. Ако е необходимо, негликозилираният мутеин, получен когато *E. coli* или *Bacillus* са микроорганизми- гостоприемници, може да бъде евентуално гликозилиране *ин vitro* чрез химическо, ензимно или друг вид модифициране, известно на специалистите.

При предпочитаното приложение на изобретението по отношение на IFN- $\beta$  цистеиновият остатък в позиция 17 на аминокиселинната последователност на IFN- $\beta$ , показана на фигура 1, се променя в серин чрез T $\rightarrow$ A преминаване при първата база на кодон 17 на смислената верига на ДНК последователността, която кодира за зрял IFN- $\beta$ . Сайт-специфичната мутагенеза се индуцира чрез използване на синтетичен 17-нуклеотиден праймер GCAATTTTCAGAGTCAG, който е идентичен с една 17-нуклеотидна последователност от смислената верига на IFN- $\beta$  в участъка на кодон 17, с изключение на единично несъвпадение на бази при първата база на кодон 17. Несъвпадението е при нуклеотид 12 в праймера. Генетичният код е дегенерирал и много от аминокиселините може да са кодирани от повече от един кодон. Основният код за серин например е шесткратен дегенерат, такъв че кодони-

те TCT, TCG, TCC, TCA, AGT и ACG кодират за серин. AGT кодонът е избран за удобство. По подобен начин треонин се кодира от всеки един от кодоните ACT, ACA, ACC и ACG. Посочено е, че когато един кодон е специфичен за определена аминокиселина, включва всичките дегенерирали кодони, които кодират тази аминокиселина. 17-мерът е хибридиизиран до едноверижна ДНК на фага M13, който носи безсмислената верига на IFN-гена. Олигонуклеотидният праймер тогава се разширява върху ДНК чрез ДНК полимераза I-фрагмент на Klenow и получената dsДНК се преобразува в затворена кръгова ДНК с T $_4$  лигаза. Репликацията на получения мутационен хетеродуплекс дава клонове от ДНК веригата съдържаща несъвпадението. Мутантните клонове могат да бъдат идентифицирани и скринирани по наличието или липсата на специфични рестрикционни сайтове, резистентност или чувствителност към антибиотици, или чрез други методи, известни на специалистите. Когато цистеинът е заместен със серин, T $\rightarrow$ A преминаването, показано на фигура 2, има като резултат създаването на нов HinfI рестрикционен сайт в структурния ген. Мутантният клон се идентифицира чрез използване на олигонуклеотиден праймер като индикатор при хибридикационния скрининг на мутантните фагови плаки. Праймерът ще има единично несъвпадение, когато хибридизира до родителя, но ще има точно съвпадение, когато хибридизира до мутантната фагова ДНК, както е показано на фигура 2. Условието на хибридикацията могат следователно да са такива, че олигонуклеотидният праймер да хибридизира с предимство до мутантната ДНК, а не до родителската ДНК. Новополученият HinfI сайт също служи като средство за потвърждаване на мутацията на единичната база в IFN- $\beta$  гена.

M13 фагова ДНК, носеща мутиралия ген, се изолира и разпределя в подходящи експресионни вектори като плазмид pTrc3 и *E. coli* шам MM294 се трансформира с вектора. Подходящите хранителни среди за култивиране на трансформантите и на техните прогени са известни на специалистите в тази област. Изразеният мутеин на IFN- $\beta$  се изолира, пречиства и охарактеризира.

Примери за изпълнение на изобретението поясняват изобретението и го илюстрират.

Те не ограничават неговия обхват. Примери от 1 до 11 описват получаването на мутеин на IFN- $\beta$ . Примери от 12 до 20 описват получаването на мутеин на IL-2.

Пример 1. Клониране на IFN- $\beta$  ген в M13 вектор.

Използването на M13 фагов вектор като източник на едноверижна ДНК матрица е описано от Temple et al, Nature (1982) 296:537-540. Плазмидът р  $\beta$  1trp (фигура 3), съдържащ IFN- $\beta$  гена, под контрола на E.coli trp промотор се смела с рестрикционните ензими HindIII и XhoII. M13mp8 (Messing, Third Cleveland Symposium on Macromolecules: Recombinant DNA 143-153, (1983) репликативната форма (RF) на ДНК (фигура 4) се смела с рестрикционните ензими HindIII и Bam HI и се смесва с р  $\beta$  1trp ДНК, която е смляна преди това с Hind III и Xho II. Сместа се лигира с T<sub>4</sub> ДНК лигаза и лигираната ДНК се трансформира в компетентни клетки от E. coli шам JM103 и се разстила върху Xgal индикаторни плочки (Messing, et al., Nucleic Acids Res (1981) 9:309-321). Плаките, съдържащи рекомбинантен фag (бели плаки), се взимат с игла, инокулират се в прясна култура на JM103 и са минипрепарати на RF молекули, получени от инфективните клетки (H.D.Birnboim and J. Doly, Nucleic Acid Res (1979) 7:1513-1523). RF молекулите се смелат с различни рестрикционни ензими за идентифициране на клоновете, съдържащи IFN- $\beta$  инсерт. Рестрикционната карта на един такъв клон (M13- $\beta$  1) е показана на фигура 5. Едноверижна (SS) фагова ДНК се получава от клона M13- $\beta$  1 да служи като матрица за сайт специфична мутагенеза при използване на синтетичен олигонуклеотид.

Пример 2. Сайт, специфична мутагенеза.

Четиридесет пикомола от синтетичния олигонуклеотид GCAATTTTCAGAGTCAG (праймер) се обработва с T<sub>4</sub> киназа в присъствието на 0,1 mM аденозин трифосфат (АТФ), 50 mM хидроксиметиламинометан хидрохлорид (трис солна киселина) рН 8,0, 10 mM магнезиев двухлорид, 5 mM дитиотреитол (ДТТ) и 9 единици T<sub>4</sub> киназа в 50  $\mu$ l при 37°C за 1 час. Киназираният праймер (12 пикомола) се хибридира до 5  $\mu$ g ss M13- $\beta$  1 ДНК в 50  $\mu$ l смес, която съдържа 50 mM натриев хлорид, 10 mM трис солна киселина с рН 8,0, 10 mM магнезиев двухлорид и 10 mM  $\beta$ -меркаптоетанол, чрез загряване при 67°C за 5 минути

и 42°C за 25 минути. Загряната смес се охлажда върху лед и след това се добавят 50  $\mu$ l реакционна смес, съдържаща по 0,5 mM от дезоксирибонуклеотид трифосфат (dNTP), 80 mM трис-солна киселина с рН 7,4, 8 mM магнезиев двухлорид, 100 mM натриев хлорид, 9 единици ДНК полимераза I, на Klenow фрагмент, 0,5 mM АТФ и 2 единици T<sub>4</sub> ДНК лигаза, инкубиране при 37°C за 3 часа и при 25°C за 2 часа. Реакцията завършва с екстракция с фенол и преципитация с етанол. ДНК се разтваря в 10 mM трис-солна киселина с рН 8,0, 10 mM етилендиаминтетраацетна киселина (ЕДТА), 50 % захароза и 0,05 % бромобензил синьо и се подлага на електрофореза върху 0,8 % агарозен гел в присъствието на 2  $\mu$ g/ml етидиумбромид. ДНК ивиците, отговарящи на RF формите на M13- $\beta$  1, се елуират от гелните срезове по перхлоратния метод (Davis et al., "Advanced Bacterial Genetics" стр. 178-179 (1980). Елуираната ДНК се използва за трансформиране на компетентни JM103 клетки, култивирани едно денонощие, и ssДНК се изолира от настоящата течност на културата. Тази ssДНК се използва като матрица във втори цикъл на разширяване на праймера, гелно пречистените RF форми на ДНК се трансформират в компетентни JM103 клетки, разстилат се върху агарни плочки и се инкубират за едно денонощие за получаване на фагови плаки.

Пример 3. Сайт, специфична мутагенеза.

Експериментът от пример 2 се повтаря, с изключение на това, че използваният за промяна на кодон 17 на IFN- $\beta$  гена от такъв, който кодира за цистеин в такъв, който кодира за треонин синтетичен олигонуклеотиден праймер е GCAATTTTCAGACTCAG.

Пример 4. Сайт, специфична делеция.

Експериментът от пример 2 се повтаря, с изключение на това, че използваният за делеция на кодон 17 от IFN- $\beta$  гена олигонуклеотиден праймер е AGCAATTTTCAGCAGAAGCTCCTG.

Пример 5. Скрининг и идентифициране на мутирани плаки.

Блюда, съдържащи мутирани M13- $\beta$  1 плаки (пример 1), и две блюда, съдържащи немутирани M13- $\beta$  1 фагови плаки, се охлаждат до 4°C и плаките от всяко блюдо се пренасят върху два нитроцелулозни филтърни кръга чрез поставяне на сух филтър върху агарната плочка за пет минути за първия филтър и 15 минути за втория филтър. След това фил-

трите се поставят върху дебели филтърни хартии, напоени в 0,2 нормален натриев хидроксид, 1,5 М натриев хлорид и 0,2 % Triton X-100 за пет минути и се неутрализират чрез поставяне върху филтърна хартия, напоена с 0,5 М трис-солна киселина с рН 7,5 и 1,5 М натриев хлорид за следващи пет минути. Филтрите се измиват по подобен начин два пъти върху филтри, напоени в 2xSSC (стандартен физиологически цитрат), изсушават се и се изпичат във вакуумна пещ при 80°C за два часа. Двойните филтри се прехибридизират при 55°C за четири часа с 10 ml за филтър ДНК хибридационен буфер (5xSSC) с рН 7,0, 4 x разтвор на Denhardt (поливинилпиролонидин, фиколин и говежди серумен албумин, 1 x = 0,02 % от всеки), 0,1 % натриев додецилсулфат (SDS), 50 mM натриев фосфатен буфер с рН 7,0 и 100 µg/ml ДНК от денатурирана сперма от пъстърва. Белязан с <sup>32</sup>P индикатор се приготвя чрез киназиране на олигонуклеотидния праймер с белязана с <sup>32</sup>P АТФ. Филтрите се хибридизират до 3,5x10 cpm/ml от белязания с <sup>32</sup>P праймер в 5 ml за филтър от ДНК хибридационен буфер при 55°C за 24 часа. Филтрите се промиват при 55°C за 30 минути, всеки в промивен буфер, съдържащ 0,1 % SDS и намаляващи количества от SSC. Филтрите се промиват в началото с буфер, съдържащ 2 x SSC, и контролните филтри, съдържащи немутирани M13-β1 плаки, се проверяват за наличност на някаква радиоактивност с Гайгеров брояч. Концентрацията на SSC се понижава стъпаловидно и филтрите се промиват докато не останат откриваема радиоактивност върху контролните филтри с немутирани M13-β1 плаки. Най-ниската концентрация на SSC, която е използвана е 0,1 x SSC. Филтрите се изсушават на въздух и се автордиографират при -70°C за 2-3 дни. 480 плаки на мутирал M13-β1 и 100 немутирани контролни плаки се скринират с киназираната олигонуклеотидна проба. Някоя от контролните плаки не хибридизира с пробата, докато мутиралите M13-β1 плаки хибридизират с индикатора.

Една от петте мутирала плаки M13-β1 (M13-SY2501) се отделя и се инокулира в култура на JM103. От настоящата течност се получава ssДНК, а от утайката-двойноверижна (ds)ДНК. SSДНК се използва като матрица за дидезокси-секвениране на клона с M13 универсален праймер. Резултатът от анализа на

последователността е показан на фигура 6 и потвърждава, че TGT cys кодонът е превърнат в ATG ser кодон.

Пример 6. Експресия на мутирал IFN-β в E. coli.

PF ДНК от M13-SY2501 се смела с рестрикционните ензими Hind III и XhoI и 520 bp инсерционен фрагмент се пречиства върху 1 % агарозен гел. Плазмидът рTrp3, съдържащ E.coli trp промотора (фигура 7), се смела с ензимите Hind III и BamHI, смесва се с пречистен M13-SY2501 ДНК фрагмент и се лигира в присъствие на T<sub>4</sub> лигаза. Лигираната ДНК се трансформира в E. coli щам MM294. Резистентните на ампицилинтрансформанти се скринират за чувствителност към тетрациклин. Плазмидни ДНК от пет ампицилинови резистенти, [тетрациклин]тетрациклин чувствителни клона се смелат с HinfI за скрининг за наличност на M13-SY2501 инсерт. Фигура 8а показва HinfI рестрикционната карта на един от клоновете (pSY2501) и я сравнява с Hinf I картата на оригиналния IFN-β клон рβ trp. Има един допълнителен HinfI сайт в pSY2501, разделящ 197 bp IFN-β вътрешния фрагмент на 169 bp фрагмент и 28 bp фрагмент (фигура 8б). Рестрикционната карта на клона pSY2501 е посочена на фигура 9. Цялата ДНК последователност на мутирания IFN-β ген е показана на фигура 10, заедно с очакваната аминокиселинна последователност.

Плазмидът, означен като клон pSY2501, е депозиран в Колекцията на земеделски изследователски култури (NRRL), Лаборатория по ферментация, Северен регионален изследователски център, Администрация по наука и обучение, М-во на земеделието, 1815 North University St., Peoria, Ill.60604 на 30 март 1983 година и е означен с номера CMCC №1533 и NRRL № B-15356.

Култури на pSY2501 и pβ1trp, които включват техни прогени, се култивират до оптическа гъстота (OD<sub>600</sub>) от 1,0. Свободен от клетки екстракт се получава и се изследва IFN-β антивирусната активност върху GM2767 клетки чрез микротитрационно изследване. Екстракти от клон pSY2501 проявяват три до четири пъти по-голяма активност отколкото рβ1trp (таблица 1), което показва че клонът pSY2501 е или синтезирал повече протеин, проявяващ IFN-β активност, или че полученият протеин има по-висока специфична

активност.

Таблица А

Таблица 1

Екстракт	Антивирусна активност (един/мл)
pSY2501	6 x 10 <sup>5</sup>
pβ1trp	1 x 10 <sup>5</sup>
pтр3 (контрола)	30

С цел да се определи дали клонът pSY2501 синтезира няколко пъти повече активен протеин екстрактите от двата клона се подлагат на електрофореза върху SDS полиакриламиден гел заедно с контролен екстракт, а гелът се оцветява с комази синьо, за да се проявят протеините. Както е показано на фигура 11, има само една протеинова ивица, отговаряща на около 18 000 далтона протеин, който е наличен в екстрактите на клонове pSY2501 и pβ1trp, но не в контролния екстракт на pтр3. За този протеин, който има молекулно тегло от около 20 000 далтона, но показва гел-миграционна картина на 18 000 далтона протеин, е доказано по-рано, че е IFN-β при пречистване на този протеин от екстракти на pβ1trp. Тъй като в екстрактите на pβ1trp, се съдържа по-малко от този протеин специфичната активност на протеина в екстракти от клон pSY2501 е по-висока, отколкото тази в клон pβ1trp.

Пример 7. Плазмидът pSY2501 се трансформира в компетентен субвариант на щам MM294 на *E.coli*, означен MM294-1. Пробен образец от получения трансформант е депозиран в Американската колекция за типове култури 12301 Parklawn Dr., Rockville, Md. 20852 в САЩ на 18 ноември 1983 под ATCC № 39 517.

Пример 8. Продукция на IFN-β<sub>ser17</sub>. IFN-β се възстановява от *E.coli*, които са били трансформирани за продуциране на IFN-β<sub>ser17</sub>. *E.coli* се култивират в следната хранителна среда (виж таблицата) до OD от 10-11 при 600 nm (сухо тегло 8,4 g/l).

Съставка	Концентрация
NH <sub>4</sub> Cl	20 mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,9 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,2 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3 mM
Na <sub>3</sub> цитрат·2H <sub>2</sub> O	1,5 mM
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	30 μM
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30 μM
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	3 μM
L-триптофан	70 mg/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	72 μM
Тиамин HCl	20 mg/L
Глюкоза	40 μg/L

20 Добив от 9.91 (9,9 kg) от трансформирани *E.coli* се охлажда до 20°C и се концентрира чрез пропускане през филтър с напречно протичане при средно налягане от около 110 кра и постоянна скорост на протичане на филтратата от 260 ml/min при тегло на филтратата 8,8 kg. Концентратът (приблизително 1 l) се източва в съд и се охлажда до 15°C. Клетките в концентрата се разрушават чрез пропускане на концентрата през хомогенизатор Manton-Gaulin при 5° C и около 69 000 кра. Хомогенизаторът се промива с един литър буферирани с фосфат физиологичен разтвор, pH 7,4 (PBS) и промивната течност се добавя към хомогенизата за получаване на краен обем от 35 два литра. Това количество се подлага на непрекъснато центрофугиране при 12 000 x g и скорост на протичане 50 ml/min. Утайката се сепарира от настоящата течност и се суспендира повторно в четири литра PBS, съдържащ 2 % SDS. Тази суспензия се разбърква при стайна температура за 15 минути, след което вече няма видим суспендиран материал. След това разтворът се екстрахира с 2-бутанол при обемно съотношение бутанол към разтвор 1:1. 45 Това екстрахиране се извършва в сепаратор течна -течна фаза при скорост на протичане от 200 ml/min. След това органичната фаза се сепарира и изпарява до сухо, при което се получават 21,3 g протеин. Той се ресуспендира в дестилирана вода при обемно съотношение 50 1:10.

Възстановеният продукт се изследва за активност на човешки IFN- $\beta$  чрез изследване за защита срещу вирусен цитопатичен ефект (CPE). Изследването се извършва в микротитрационни плочки. Петдесет микролитра минимална есенциална среда е поставена във всяка ямка, като в първата ямка се поставят 25  $\mu$ l от пробния образец, а в следващите ямки се правят серийно 1:3 обемни разреждания. Във всяка плочка се включва вирус (Vesicular stomatitis), клетки (човешка фибробластна линия GM-2767) и сравнителни IFN- $\beta$  контроли. Използваният за сравняване IFN- $\beta$  е 100 единици на ml. След това плочките се облъчват с ултравиолетови лъчи за 10 минути. След облъчването 100  $\mu$ l от клетъчната суспензия (1,2 x 10<sup>5</sup> клетки/ml) се добавя към всяка ямка и плочките се инкубират 18-24 часа. Вирусна суспензия в количество плако-образуваща единица за клетка се добавя към всяка ямка освен контролата. Тогава плочките се инкубират, докато вирусната контрола покаже 100 % CPE. Това става нормално 18 до 24 часа след добавянето на вирусен разтвор. Резултатите от изследването се интерпретират по отношение разположението на ямката с 50 % CPE спрямо сравнителната IFN- $\beta$  контрола. От тази гледна точка се определя титърът за интерферон за всички проби върху плочката. Специфичната активност на възстановения продукт се определя на 5 x 10<sup>7</sup> единици/mg.

Пример 9. Кисела преципитация и хроматографско пречистване.

Процесът от пример 8 се повтаря, с изключение на това, че след екстрахиране и сепариране на водната и органичната фаза и смесването на органичната фаза с PBS при обемно съотношение 3:1 рН на сместа се понижава до около 5 чрез добавяне на ледена оцетна киселина. Полученият преципитат се сепарира чрез центрофугиране при 10 000 до 17 000 x g за 15 минути и утайката се разтваря повторно в 10 тегловни %/обем SDS и 10 mM буфер натриев ацетат, рН 5,5, и се загрява на 80°C за пет минути.

След това разтворът се поставя в Brownlee RP-300, 10  $\mu$ M "Aquapore колона" при използване на система с Бекманов градиент. Буфер А е 0,1 % трифлуороцетна киселина (TFA) в H<sub>2</sub>O; буфер В е 0,1 % TFA в ацетонитрил. Откриването става по ултравиолетовата абсорбция при 280 nm. Програмата

за разтваряне е линеен градиент на 0% буфер В към 100 % буфер В за три часа. Фракциите, съдържащи най-високи активности интерферон, се отделят и специфичната активност на събрания интерферонов препарат се отчита да е 9,0 x 10<sup>7</sup> до 3,8 x 10<sup>8</sup> международни единици за милиграм протеин, сравнено с 2 x 10<sup>8</sup> единици/mg за природния IFN- $\beta$ .

Пример 10. Биохимическа характеристика на IFN- $\beta$ <sub>ser 17</sub>.

Аминокиселинният състав се определя след 24-72 часова хидролиза на 40  $\mu$ g проби от IFN- $\beta$  в 200  $\mu$ l от 5,7 N солна киселина, 0,1 % фенол при 108°C. Пролин и цистеин се определят по същия начин след окисляване с перформна киселина, в този случай фенолът се отстранява при хидролизата. Триптофанът се анализира след 24 часа хидролиза на 400  $\mu$ g пробен образец в 5,7 N солна киселина, 10 % меркаптооцетна киселина (без фенол). Анализът се извършва в Beckman 121 MB анализатор на аминокиселини при използване на единична колона с AA10 смола.

Аминокиселинният състав, изчислен от представителните 24-, 48- и 72-часови хидролизи на пречистен IFN- $\beta$ <sub>ser 17</sub>, съвпада с този очакван на база ДНК последователността на клониран IFN-ген, с изключение на липсващия N-краен метионин.

Аминокиселинната последователност на първите 58 остатъка от аминокиселинния край на пречистен IFN се определя върху 0,7 mg проба в Beckman 890 C секвенатор с 0,1 M буфер Quadrol.

PTH аминокиселини се определят чрез обратно фазова HPLC върху Altex ultrasphere ODS колона (4,6 x 250 mm) при 45°C, елуиране за 1,3 мин с 40 % буфер А и 8,4 мин с 40 до 70 % буфер В, при което буфер А е 0,0115 M натриев ацетат, 5 % тетраhydroфуран (THF) рН 5,11, а буфер В е 10 % THF в ацетонитрил.

N-крайната аминокиселинна последователност на IFN- $\beta$ <sub>ser 17</sub> съвпада с очакваната на база ДНК последователността, с изключение на липсата на N-краен метионин.

Пример 11. Алтернативна продукция на IFN- $\beta$ <sub>ser 17</sub> и метод за пречистване.

E.coli, трансформирани с pSY2501, се култивират в следната среда:

Таблица Б

Съставка	Приблиз. изходна концентрация
Na <sub>3</sub> цитрат.2H <sub>2</sub> O	3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14 mM
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	46 μM
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	46 μM
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1-2 μM
L-триптофан	351 μM
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	74 M
Тиамин	0,002 %
Глюкоза	0,5 %

При нужда се добавят Dow Corning пеногасител- 25% разтвор гликол, 50 % разтвор глюкоза и 5-N калиев хидроксид.

Температурата се поддържа на  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , рН на  $6,5 \pm 0,1$  с натриев хидроксид и разтвореният кислород-на 30 % насищане на въздуха. Измерванията на оптичката плътност и остатъчната глюкоза се извършват на 14 часа и приблизително през интервали от 1 час след това. Добив се събира, когато консумацията на глюкоза достигне  $40 \pm 6 \text{ g/l}$  (OD при 680 nm = 10 - 11).

Събраният материал се концентрира приблизително трикратно чрез циркулирането му през микропорест филтър с напречно протичане под налягане. Концентрираните клетки се диафилтрират срещу дейонизирана вода, докато събраният материал се концентрира 4-5 пъти. Тогава клетките се разрушават чрез прекарване през хомогенизатор Mantop Gaulin при около 4,1 до 5,5 кра. След началното преминаване се добавя SDS-натриево-фосфатен буфер до крайна концентрация от 2 % SDS, 0,08 м натриев фосфат и хомогенизирането продължава един час. Тогава се добавя твърд DTT до крайна концентрация от 50 mM и хомогенизатът се загрява до  $90 \pm 5^\circ\text{C}$  за 10 минути. Получената клетъчна суспензия се екстрахира с 2-бутанол при обемно съотношение на 2-бутанол към суспензия 1:1 в статичен миксер. Тогава сместа се центрофугира и се събира богатата на 2-бутанол фаза.

Богата на 2-бутанол фаза се размесва с 2,5 обема от 0,1 % SDS в буфериран с фосфат физиологичен разтвор (PBS). Добавя се твърд DTT до крайна концентрация от 2 mM. рН на сместа се наглася на  $6,2 \pm 0,1$  с ледена оцетна киселина и тази смес се центрофугира. Получената утайка се събира и ресуспендира в PBS + 10 % SDS с рН установено на  $8,5 \pm 0,1$  с 1-N натриев хидроксид. Твърд DTT се добавя до крайна концентрация от 100 mM и суспензията се загрява до  $90 \pm 5^\circ\text{C}$  за 10 минути. След това суспензията се охлажда до  $-25^\circ\text{C}$ , рН се наглася на  $5,5 \pm 0,1$  с ледена оцетна киселина и разтворът се филтрира.

Тогава разтворът се поставя в Sephacryl S-200 предколони и фракциите, проявяващи най-високи активности на интерферон, се събират на едно място и се концентрират чрез ултрафилтрация. Концентратът се окислява чрез добавяне на еквимоларни количества протеин и йодособензоена киселина в реакционен съд, съдържащ 2 mM натриев пиродифосфат, 0,1 % SDS и 1 mM EDTA. По време на окисляването рН се поддържа на  $9,0 \pm 0,1$  с 0,5-N натриев хидроксид и се наглася на  $5,5 \pm 0,2$ , когато окисляването е завършено. След окисляването концентратът се подлага отново на ултрафилтрация с разделяне при 10 Kdal молекулно тегло.

Концентратът се поставя в главната Sephacryl S-200 колона и фракциите се анализират чрез SDS- PAGE за определяне на тези, които не съдържат замърсители с високо молекулно тегло. Тези фракции се отделят и пропускат през ултрафилтрационното устройство. Филтрираният концентрат се фракционира върху Sephadex G-75 колона. Прави се SDS-PAGE анализ на фракциите за определяне на тези, които не съдържат замърсители с ниско или високо молекулно тегло. Тези фракции се отделят за обезсолване.

Sephadex G-25 колона, калибрирана с 1 mM натриев хидроксид, се зарежда със събраните от Sephadex G-25 колоната фракции при използване на дестилирана вода, нагласена на рН 10,8-11 с 50 % натриев хидроксид. Пречистеният продукт се събира до празна проба. Този обезсолен, пречистен IFN-β мутеин, може да бъде приготвен по познати начини за терапевтично приложение.

Биологични тестове на  $IFN-\beta_{ser 17}$ .

Антигенно сравняване.

$IFN-\beta_{ser 17}$  се сравнява антигенно с  $IFN-\beta$  продуциран от диплоидни фибробласти при използване на вирусни неутрализационни тестове. Един поливалентен антисерум за  $IFN-\beta$  от диплоидни фибробласти се получава в зайци. Този антисерум блокира антивирусната активност както на диплоиден фибробластен  $IFN-\beta$  така и на  $IFN-\beta_{ser 17}$  при вирусните неутрализационни тестове, което показва че двата протеина са антигенно неразличими.

Антивирусна активност

Пречистен  $IFN-\beta_{ser 17}$  се сравнява по антивирусна активност с естествено продуцирания  $IFN-\beta$ . Инхибирането на репликацията на вируса на везикуларния стоматит в диплоидни кожни фибробласти (HS27F) е неразлично от това на природната молекула. Подобно, инхибирането на вируса херпес симплекс тип 1 в HS27F фибробласти от естествени и мутантни протеини е сравнимо.

Антипролиферативна активност

Антипролиферативната активност на  $IFN-\beta_{ser 17}$  за непрекъснати клетъчни линии се сравнява с тази на естествено продуциран  $IFN-\beta$ .

T24 клетки, произхождащи от транзиционален клетъчен карцином, се третира с 200 единици/ml от протеините. Растежът на клетките се инхибира значимо ( $p < 0,02$ ) и от двата протеина.

Стимулиране на естествени килърни (NK) клетки

Способността на  $IFN-\beta_{ser 17}$  да стимулира NK клетка (спонтанна клетъчна цитотоксичност) се подлага на тест. Сепарирани с Ficoll-hyраque човешки периферни мононуклеарни клетки (PMC) или обогатени с NK лимфоцитни препарати (лишени от моноците чрез пластична адхезия и от ОКТ3-положителни T-клетки чрез третиране с ОКТ3 антияло плюс комплемент) се инкубират едно денонощие в хранителна среда, съдържаща различни концентрации  $IFN-\beta_{ser 17}$ . Белязани с  $^{51}Cr$  клетки-мишени се инкубират с ефекторните клетки (при съотношение на ефекторни клетки към мишенни клетки = 50:1) за 2 до 4 часа. NK клетъчната цитотоксичност се определя чрез измерване количеството на маркираното вещество в средата. Резултатите от този тест са показани в следващата таблица:

Таблица В

Клетка мишена	Ефекторна клетка	NK клетъчна цитотоксичност при интерферон (специфично процентно освобождаване на $^{51}Cr$ -SFM) $IFN$ (единици/ml)				
		0	10	30	100	300
T24	PMC	7,23 ± 5,1	23,1 ± 4,4	24,4 ± 1,1	34,1 ± 2,5	50,0 ± 2,0
Chang	PMC	4,7 ± 0,5	7,2 ± 0,8	9,5 ± 1,7	15,9 ± 1,3	21,9 ± 1,4
Chang	NK Enr	19,2 ± 4,6	39,4 ± 4,1	ND	54,2 ± 6,1	ND
K562	NK Enr	41,0 ± 4,6	48,4 ± 3,6	ND	62,2 ± 3,5	ND

Както е показано клетките-мишени се убиват по-ефективно от третираните с  $IFN-\beta_{ser 17}$  клетки, отколкото от нетретираните клетки.

Клинични опити

Фаза I на клиничните опити е за потвърждаване безопасността на  $IFN-\beta_{ser 17}$  за хора. Тези резултати включват прилагането на протеин на пациенти мускулно и венозно в дози в обхвата между  $1 \times 10^5$  единици (1 g протеин) до  $400 \times 10^6$  единици. В началната фаза I на клиничните опити не се появяват никакви нежелани ефекти.

Както е посочено, препаратите на  $\beta_{ser 17}$  проявяват специфична активност на равнище, твърде близко или по-добро от това на естествения  $IFN-\beta$ .  $IFN-\beta_{ser 17}$  няма свободни сулфхидрилни групи, обаче показва една -S-S-връзка между единствените останали цистеини в позиции 31 и 141. Протеинът не образува лесно олигомери и съществува основно в мономерна форма.  $IFN-\beta_{ser 17}$ , получен съгласно изобретението може да бъде използван самостоятелно или като смес от различните форми за приготвяне на фармацевтично приемливи препарати в инертни,

нетоксични, непредизвикващи алергии, физиологично поносими носители за клинично и терапевтично приложение при терапия на рака или при състояния, при които е необходима терапия с интерферон и при вирусни инфекции като от херпес симплекс вирус I и II, вирусен хепатит В, вирусни простуди и вирусни ринити. Носителите включват, но не се ограничават, с дестилирана вода, физиологичен разтвор, Рингеров разтвор, разтвор на Ханк и други подобни. Нетоксични стабилизатори и улесняващи разтварянето добавки като декстроза, HSA (човешки серумен албумин) и други подобни могат евентуално да бъдат включени. Терапевтичните състави може да се прилагат орално или парентерално, например венозно, мускулно, интраперитонеално и подкожно. Препарати на модифициран IFN- $\beta$  съгласно изобретението могат също да се използват за локално прилагане в подходящи носители, използвани обикновено за такива цели. IFN- $\beta$  мутенът може да се прилага или локално или системно, самостоятелно, смесен или в комбинация с други терапевтични средства като ацикловир за профилактични или лечебни цели. Дозата, в която се прилага мутенът при хора, ще зависи от това, дали се прилага непрекъснато (включително интермитиращо) или като болус. Когато се прилага непрекъснато, количествата обикновено са пониски, отколкото прилаганите като болус. Дозата обикновено е от около  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^8$  единици, за предпочитане около  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$ .

Принципните предимства на описания мутен на IFN- $\beta$  са в елиминирането на една свободна сулфхидрилна група в позиция 17 на IFN- $\beta$ , като с това се принуждава протеинът да образува правилни дисулфидни връзки между *cys* 31 и *cys* 141 и да приеме конформация, необходима за пълна биологическа активност. Повишената специфична активност на IFN- $\beta_{ser17}$  позволява използването на по-малки дози при терапевтично прилагане. Поради делецията на цистеина в позиция 17 и елиминиране на свободната SH-група, IFN- $\beta_{ser17}$  протеинът не образува димери и олигомери така лесно както микробилно продуцираният IFN- $\beta$ . Това улеснява пречистването на протеина и повишава стабилността му.

Пример 12. Нуклеотидната последователност за сДНК клон, кодиращ за човешки

IL-2, методите за получаване на IL-2 сДНК банки и скрининг на същите за IL-2 са описани от Taniguchi et al., Nature, (1983) том 24, стр. 308.

- 5 сДНК банки обогатени с потенциални IL-2 сДНК клонове, се получават от обогатена с IL-2 и РНК [фракция], получена от индуцирани периферни кръвни лимфоцити (PBL), и от клетки на Jurkat по обичайните методи.
- 10 Обогатяването на mРНК с информация за IL-2 се извършва чрез фракциониране на mРНК и идентифициране на фракцията, имаща IL-2 mРНК активност, чрез инжектиране на фракциите в ооцити на *Xenopus laevis* и изследване
- 15 на ооцитните лизати за IL-2 активност върху HT-2 клетки (Watson, J. Exp. Med, (1979) 150:1570-1519 и Gillis et al., Immun. (1978) 120:2027-2032.

- 20 Пример 13. Скрининг и идентифициране на IL-2 сДНК клонове

- IL-2 сДНК банките се скринират чрез метод за хибридиране на колонии. Всяка микротитрационна плочка се реплицира в двойна нитроцелулозна филтърна хартия (S S тип BA-85) и колонии се култивират при 37°C за
- 25 14-16 часа върху L агар, съдържащ  $\mu\text{g/ml}$  ампицилин. Колониите се лизират и ДНК се фиксира към филтъра чрез последователно третиране 5 минути с 500 mM натриев хидроксид,
- 30 1,5 M натриев хлорид и се промива два пъти по 5 минути с 5 x стандартен физиологичен цитрат (SSC). Филтрите се изсушават с въздух и се изпичат при 80°C за 2 часа. Двойните филтри се прехибридизират при 42°C за 6-8
- 35 часа с 10 ml за филтър ДНК хибридационен буфер (50 % формамид, 5 x SSC, pH 7,0, 5 x разтвор на Denhardt (поливинилпиролдин, фикол и говежди серумен албумин, 1 x = 0,2 % от всеки) 50 mM натриев фосфатен буфер с
- 40 pH 7,0, 0,2 % SDS, 20  $\mu\text{g/ml}$  Poly U и 50  $\mu\text{g}$  ДНК от денатурирана сперма на пестърва.

- Една белязана  $^{32}\text{P}$  20-мерна олигонуклеотидна проба се получава въз основа на IL-2 гена последователност, описана от Taniguchi et al. (виж по-горе). Нуклеотидната последователност на пробата е
- 45 GTGGCCTTCTTGGGCATGTA.

- Пробните образци се хибридизират при 42°C за 24 до 36 часа с 5 ml/филтър от ДНК хибридационен буфер, съдържащ  $^{32}\text{P}$  олигонуклеотидната проба. Филтрите се промиват
- 50 два пъти по 30 минути всеки път при 50°C с 2

х SSC, 0,1 % SDS и след това два пъти с 1 х SSC и 0,1 % SDS при 50°C за 90 минути, изсушават се въздушно и се автордиографират при -70°C за 2-3 дни. Положителните клонове се идентифицират и повторно скринират с пробата клонове с пълна дължина и потвърждават чрез изготвяне на карта с рестрикционни ензими и се сравнява с последователността на IL-2 сДНК клона, описан от Taniguchi et al., виж по-горе.

Пример 14. Клониране на IL-2 ген в M13 вектор

IL-2 генът се клонира в M13mp9 по начина, описан в пример 1, при използване на плазмид pLW1 (фигура 12), съдържащ IL-2 гена под контрола на *E. coli* trp промотор. Един пробен образец от pLW1 е депозиран в Американската колекция типове култури през август 1983 и е означен с ATCC номер 39 405. Рестрикционната карта на един клон (означен M13-IL 2), съдържащ IL-2 инсърт е показан на фигура 13. Ендоверижна фагова ДНК се получава от клон M13-IL 2, за да служи като матрица за олигонуклеотидно насочена мутагенеза.

Пример 15. Олигонуклеотидно насочена мутагенеза

Както е посочено, IL-2 съдържа цистеинов остатък в аминокиселинни позиции 58, 105 и 125. Въз основа на нуклеотидната последователност на частите на IL-2 гена, които съдържат кодоните за тези три цистеинови остатъка, три олигонуклеотидни праймера се определят и синтезират за мутация на кодоните за тези остатъци до кодони за серин. Олигонуклеотидите са с последователностите:

СТТСТАГАГАСТGCAGATGTTTC (DM27) за промяна на *сус* 58;

САТCAGCATACTCAGACATGAATG (DM28) за промяна на *сус* 105 и GATGATGCTCTGAAAAGGTAATC (DM29) за промяна на *сус* 125.

Четиридесет пикомола от всеки олигонуклеотид се киназират поотделно в присъствието на 0,1 mM АТФ, 50 mM трис-солна киселина, pH 8,0, 10 mM магнезиев двухлорид, 5 mM DTT и 9 единици от  $T_4$  киназа в 50  $\mu$ l при 37°C. Всеки от киназираните праймери (10 пикомола) се хибридира до 2,6  $\mu$ g на ssM13-IL-2 ДНК в 15  $\mu$ l смес, съдържаща 100 mM натриев хлорид, 20 mM трис-солна киселина, pH 7,9, 20 mM магнезиев двухлорид и 20 mM

$\beta$ -меркаптоетанол, чрез загряване при 67°C за 5 минути и 42°C за 25 минути. Загряните смеси се охлаждат върху лед и тогава се нагласят до краен обем от 25  $\mu$ l на реакционната смес, съдържаща 0,5 mM от всеки dNTP, 17 mM трис-солна киселина, pH 7,9, 17 mM магнезиев двухлорид, 83 mM натриев хлорид, 17 mM  $\beta$ -меркаптоетанол, 5 единици ДНК полимераза I фрагмент на Klenow, 0,5 mM АТФ и 2 единици  $T_4$  ДНК лигаза, инкубирана при 37°C за 5 часа. Реакциите се прекъсват чрез загряване до 80°C и реакционните смеси се използват за трансформиране на компетентни JM103 клетки, разстиляни върху агарни плочки и инкубирани едно денонощие за получаване на фагови плаки.

Пример 16. Скрининг и идентифициране на мутантни фагови плаки

Плочки, съдържащи мутирани M13-IL 2 плаки, и две плочки, съдържащи немутирани M13-IL 2 фагови плаки, се охлаждат до 4°C и фаговите плаки от всяка плочка се пренасят върху два нитроцелулозни филтърни кръга чрез разстиляне на сух филтър върху агарната плочка пет минути за първия филтър и 15 минути за втория филтър. След това филтрите се поставят върху дебела филтърна хартия, напоена в 0,2-N натриев хидроксид, 1,5 M натриев хлорид и 0,2 % Triton за пет минути и се неутрализира чрез разстиляне върху филтърна хартия, напоена с 0,5 M трис-солна киселина pH 7,5, 1,5 M натриев хлорид за следващи пет минути. Филтрите се промиват по същия начин два пъти върху филтри, напоени с 2 х SSC, изсушават се и се изпичат във вакуумна пещ при 80°C за 2 часа. Двойните филтри се прехибридизират при 42°C за 4 часа с 10 ml за филтър ДНК хибридационен буфер (5 х SSC, pH 7,0, 4 х разтвор на Denhardt [поливинилпиролонид] поливинилпиролонид, фикол и говежди серумен албумин, 1x=0,02% от всеки), 0,1 % SDS, 50 mM буфер натриев фосфат, pH 7,0 и 100  $\mu$ g ДНК от денатурирана сперма на пьстърва. Приготвят се  $^{32}$ P-белязани индикатори чрез киназиране на олигонуклеотидните праймери в белязана АТФ. Филтрите се хибридизират до 0,1 х 10<sup>5</sup> *срт*/ml на белязаните  $^{32}$ P праймери в пет милилитра на литър ДНК хибридационен буфер при 42°C за 8 часа. Филтрите се промиват два пъти при 50°C за 30 минути, всеки в промивен буфер съдържащ 0,1 % SDS и 2 х SSC,

и два пъти при 50°C за 30 минути, всеки с 0,1 % SDS и 0,2 x SSC. Филтрите се изсушават на въздух и се автордиографираат при -70°C за два до три дни.

Тъй като олигонуклеотидните праймери DM28 и DB29 са предназначени да създават един нов DdeI рестрикционен сайт в мутантните клонове (фигура 14), RF-ДНК от известен брой клонове, които хибридизират с всеки от трите киназирани праймери, се смилат с рестрикционния ензим DdeI. Една от мутантните M13-IL 2 плаки, която хибридизира с праймера DM28 и има нов DdeI рестрикционен сайт (M13-LW44), се взима с игла и се инокулира в култура на JM103, като ssДНК се получава от надстоящата течност на културата, dsRF-ДНК се получава от клетъчната маса. По подобен начин една плака, която хибридизира с праймера DM29, се взима с игла (M13-LW46) и от нея се получава ssДНК и RF-ДНК. Олигонуклеотидният праймер DM27 се смилат за създаване на нов PstI рестрикционен сайт вместо DdeI сайта. Поради това плаките, които хибридизират до този праймер, се скринират за наличност на нов PstI сайт. Една такава фагова плака се идентифицира (M13-LW42) и от нея се получават ssДНК и RF-ДНК. ДНК от тези три клона се секвенират за потвърждаване, че мишенният TGT кодон за цистеин е превърнат в TCT кодон за серин.

Пример 17. Реклонирание на мутантен IL-2 ген за експресия на *E. coli*

RF-ДНК от M13-LW42, M13-LW44 и M13-LW46 се смилат, всяка с рестрикционните ензими Hind III и Ban II и инсерционните фрагменти се пречистват от 1 % агарозен гел. По подобен начин плазмидът pTrp3 (фигура 7) се смилат с HindIII и BanII, като големият плазмиден фрагмент, съдържащ trp промотора, се пречиства върху агарозен гел и тогава се лигира с всеки от инсерционните фрагменти, изолирани от M13-LW42, M13-LW44 и M13-LW46. Лигираните плаزمиди се трансформират в компетентни *E. coli* щам K<sub>12</sub> MM294. Плазмидните ДНК от тези трансформанти се анализират чрез изготвяне на карти с рестрикционен ензим за потвърждаване наличността на плазмидите pLW42, pLW44 и pLW46. Фигура 14 е рестрикционна карта на pLW46. Когато всеки от тези отделни клонове се култивира в отсъствие на триптофан за индуциране на trp

промотора, и клетки свободни от екстракт, се анализират върху SDS-полиакриламидни гелове, се установява, че и трите клона pLW42, pLW44 и pLW46 синтезират 14,5 kd протеин, сходен с този, установяван в позитивната контрола, pLW21, за която е установено, че продуцира един 14,4 kd IL-2 протеин. Когато същите екстракти се подложат на изследване за IL-2 активност върху миши HT-2 клетки, само клоновете pLW21 (положителна контрола) и pLW46 проявяват значителна IL-2 активност (таблица II), което показва, че cys 58 и cys 105 са съществени за биологичната активност и промяната им в серини (pLW42 и pLW44 съответно) води до загуба на биологичната активност. Cys 125, от друга страна, не е съществен за биологичната активност, защото промяната му в ser 125 (pLW46) не оказва влияние върху биологичната активност.

Таблица 2

Клонове	ИЛ-2 активност (μ/ml)
pIL2-7 (отрицателна контрола)	1
pLW21 (положителна контрола)	113 000
pLW42	660
pLW44	1 990
pLW46	123 000

Фигура 15а показва нуклеотидната последователност на кодираща верига на клон pLW46. В сравнение с кодиращата верига на естествения човешки IL-2 ген клон pLW46 има единична промяна на база G→C при нуклеотид 374. Фигура 15б показва съответната аминокиселинна последователност на IL-2 мутеин, кодиран от pLW46. Мутеинът е означен des-аланин (ala) IL-2<sub>ser125</sub>. При сравняване с природния IL-2 мутеинът съдържа серин вместо цистеин в позиция 125, начален N-краен метионин (който е променен) и му липсва началния N-краен аланин на естествената молекула.

Един пробен образец *E. coli* K<sub>12</sub> щам MM294, трансформиран с pLW46, е депозиран в Американската колекция типове культу-

ри на 26 септември 1983 и е означен като ATCC номер 39 452.

Примери 18 и 19 описват получаването на един алтернативен и предпочитан вектор за експресия на аланил (ala) IL-2<sub>ser125</sub>.

Пример 18. Получаване на Ala-IL-2 експресионен вектор pLW32

Един кодон (GCG) за аланин се включва (инсерция) непосредствено след началния кодон на IL-2 гена на pLW1 чрез олигонуклеотидно насочената мутагенеза по следния начин. Олигонуклеотидният праймер 5'-GAAGTAGGCGCCATAAG-3' се киназира, хибридизира се до ssM13-IL-2 ДНК и се разширява по общия метод, описан в пример 15, за образуване на мутантен хетеродуплекс. В допълнение към инсерцията на GCG кодона мутагенезата поражда един нов NotI рестрикционен сайт в гена. Хетеродуплексът се преобразува в затворен кръгов хетеродуплекс и кръговите хетеродуплекси се използват за трансформиране на компетентни JM103 клетки, разстилат се върху агарни плочки и се инкубират както в пример 15. Плочките се скринират за идентифициране на мутантните M13-IL 2 по метода от пример 16. Един мутантен фаг, идентифициран като M13-LW32, се подбира за допълнително клониране и от него се получава RF-ДНК. Фигура 16 е диаграма на плазмидата pLW32.

Пример 19. Получаване на Ala-IL-2<sub>ser125</sub> експресионен клон pLW55

RF-ДНК от M13-LW46 (примери 16 и 17) се смила с XbaI и PstI и 530 bp фрагмент, съдържащ карбокси-крайния кодиращ участък на IL-2<sub>ser125</sub> гена, се пречиства от агарозен гел. По подобен начин pLW32 се смила с XbaI и PstI и големият фрагмент, състоящ се от плазмидния вектор и ala-IL-2 N-крайната кодираща последователност, се пречиства. Двата пречистени ДНК фрагмента се събират на едно място и се лигират с T<sub>4</sub> ДНК лигаза. Лигираната ДНК се трансформира в компетентни E. coli K-12 щам MM294. Тетрациклин резистентните трансформанти се анализират чрез изготвяне на картг с рестрикционен ензим за наличност на плазмид, съдържащ ala-IL-2<sub>ser125</sub> ген, идентифициран като pLW55, който има нов DdeI сайт, неустановявано в pLW32. Фигура 17 е диаграма на pLW55. Установява се, че свободни от клетки екстракти от бактериални култури, съдържащи pLW55, проявя-

ват повече от 10<sup>5</sup> единици IL-2 активност на милилитър при изследване на HT-2 клетки, J. Watson (виж по-горе) и S. Gillis (виж по-горе). Ala-IL-2<sub>ser125</sub> протеинът е идентичен с IL-2<sub>ser125</sub> молекулата, показана на фигура 15(б), с изключение на това, че първата включва началния N-краен аланин на естествената молекула.

Пробен образец от E. coli K-12 щам MM294 трансформиран с pLW55 е депозиран в Американската колекция типове култури на 18 ноември 1983 и е означен с ATCC № 39 516.

Пример 20. Получаване и пречистване на Ala-IL-2<sub>ser125</sub>

E. coli, трансформирани с pLW55, се култивират във ферментатор, съдържащ следната среда:

Таблица D

(NK <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	21,6 mM
Na <sub>3</sub> цитрат	155 mM
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30 μM
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	30 μM
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1μM

pH, поддържано 6,50 със стерилен 2,5 N натриев хидроксид.

Стерилни добавки (след автоклавиране)

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3 mM
FeSO <sub>4</sub>	100 μM
Л-триптофан	14 mg/l
Тиаменсолна киселина	20 mg/l
Глюкоза	5 g/l
Тетрациклин	5 mg/l
Етанол	2 %
Казаминокиселини	2 %

Dow Corning пеногасител, 20 % разтвор на полипропилен гликол, 50 % глюкоза и 5 N калиев хидроксид се добавя при нужда.

pH на ферментатора се поддържа на 6,8 с 5-N калиев хидроксид. Остатъчната глюкоза се поддържа между 5-10 g/l, разтвореният кислород на 40 % и температурата на 37±1°C. Казаминокиселините (20 % щок разтвор) до концентрация от 2 % се добавя, когато OD<sub>680</sub> е около 10. Събиране на материал се прави три часа след като OD е достигнало 20.

Събраният материал се концентрира и хомогенизира както в пример 11. След топ-

линно третиране с DTT материалът се центрофугира и получената пастообразна утайка се екстрахира с уреа до крайна концентрация 4M. Суспензията се центрофугира и към твърдата утайка се добавя SDS до концентрация 5 %.

Разтворът се прилага в Sephacryl S-200 колона и се отделят фракциите, съдържащи IL-2 (според SDS-PAGE). Отделените фракции се прилагат в Whatman M-40 колона, запълнена с 18 микронов Vydac C<sub>4</sub> силикагел с големина на порите 300 Å, калибрирана с 0,1 % TFA. IL-2-мутеинът се елуира с градиент от 40 % до 60 % 2-пропанол, съдържащ 0,1 % TFA за 160 минути. Фракциите, проявяващи най-високи IL-2 активности, се събират на едно място и се установява че имат специфични активности, сравними с тези на природния IL-2.

Мутеини на IL-2, в които цистеинът в позиция 125, е заместен с друга аминокиселина, като мутеинът IL-2<sub>ser125</sub> запазват активността си. Те може поради това да се включват в състави и да се използват по същия начин като естествения IL-2. Съответно на това, такива IL-2 мутеини се използват за диагностика и лечение (локално или системно) на бактериални, вирусни, паразитни, протозойни и гъбични инфекции, за усилване на клетъчно-опосредствена цитотоксичност, за стимулиране на лимфокиназно активирани активни килърни клетки, за опосредстване възстановяването на имунната функция на лимфоцити, за повишаване на алоантигенната реактивност, за улесняване възстановяването на имунната функция при състояния на придобита имунна недостатъчност, за възстановяване на нормална имунофункция при възрастни хора и животни, за провеждане на диагностични изследвания като тези, използващи ензимно усилване, радиобелязване, радиография и други методи, известни на специалистите в тази област, за следене на равнището на IL-2 при болестни състояния, за инициране на растеж на Т-клетки *ин vitro* за терапевтични и диагностични цели за блокиране на рецепторни места за лимфокини и при различни други приложения в терапията, диагностиката и изследователската работа. Различните терапевтични и диагностични приложения на човешкия IL-2 са изследвани и описани от Rosenberg et al., Mazumder et al., Grimm et al. IL-2 мутеините

може да се използват самостоятелно или в комбинация с други имунологично подходящи В или Т клетки или други терапевтични средства. Примери за подходящи клетки са В или Т клетки, естествени килърни клетки и други подобни, а примерни терапевтични реагенти, които могат да бъдат използвани в комбинация с полипептидите съгласно изобретението, са различни интерферони, по-специално гама интерферон, растежен фактор за В клетки, IL-1 и други подобни. За терапевтично или диагностично приложение те може да се приготвят с нетоксични, непредизвикващи алергии, физиологично поносими носители като дестилирана вода, Рингеров разтвор, разтвор на Ханк, физиологичен разтвор и други подобни. Прилагането на IL-2 мутеините при хора или животни може да става перорално или интраперитонеално, мускулно или подкожно, както е подходящо според лекаря. Количеството IL-2 мутеин, което се прилага, обикновено е между  $1 \times 10^4$  и  $2 \times 10^8$  единици.

Модификации на описаните начини за приложение на изобретението, които са познати за специалистите в областта на генното инженерство, химията на протеините, медицината и сродни области, също са включени в обхвата на следващите претенции.

### Патентни претенции

1. Човешки рекомбинантен интерлевкин-2 мутеин с изпуснат, в даден случай заместен с неутрална аминокиселина, цистеин в позиция 125, номерирана съгласно природния човешки интерлевкин-2, проявяващ биологичната активност на природния човешки интерлевкин-2.

2. Мутеин съгласно претенция 1, където неутралната аминокиселина е серин.

3. Човешки рекомбинантен аланин-интерлевкин-2-<sub>серин 125</sub> мутеин.

4. Човешки рекомбинантен des-аланин-интерлевкин-2-<sub>серин 125</sub> мутеин.

5. Човешки рекомбинантен интерлевкин-2-<sub>серин 125</sub> мутеин, с биологична активност на естествения човешки интерлевкин-2, който има аминокиселинна последователност, показана на фигура 15 (b) с или без N-краен метионин.

6. Мутеин съгласно претенции 1, 2, 3, 4 или 5, който е негликозилиран.

7. Състав за диагностика или терапевтично лечение (локално или системно) на бактериални, вирусни, паразитни, протозойни и гъбични инфекции, за усилване на клетъчно опосредствана цитотоксичност, за стимулиране на лимфокинно активирана килърна клетъчна активност, за опосредстване възстановяването на имунната функция на лимфоцити, за усилване алоантигенната реактивност, за улесняване възстановяването на имунната функция при състояния на придобита имунна недостатъчност, за възстановяване на нормална имунофункция при възрастни хора и животни, за разработване на диагностични изследвания като тези, използващи ензимно усилване, радиобелязване, радиография за следене на равнищата на интерлевкин-2 при болестни състояния, за инициране растежа на Т-клетки *in vitro* за диагностични и терапевтични цели за блокиране на рецепторни места за лимфокини, характеризиращ се с това, че включва

(а) ефективно количество рекомбинантен човешки интерлевкин-2 мутеин, в който цистеиновият остатък в позиция 125, номерирана съгласно естествения човешки интерлевкин-2, е [отстранен] заместен с неутрална аминокиселина, като споменатият мутеин проявява биологичната активност на природния чо-

вешки интерлевкин-2; и

(б) инертен, непредизвикващ алергии, фармацевтично приемлив носител.

8. Състав съгласно претенция 7, характеризиращ се с това, че мутеинът е аланин-интерлевкин-2-<sub>серин 125</sub> или *des*-аланин-интерлевкин-2-<sub>серин 125</sub>, а носителят е от групата, състояща се от дестилирана вода, Рингеров разтвор, разтвор на Ханк и физиологичен разтвор.

9. Състав характеризиращ се с това, че включва

(а) рекомбинантен човешки интерлевкин-2 мутеин, в който цистеиновият остатък в позиция 125, номерирана съгласно естествения човешки интерлевкин-2, е [отстранен или] заместен с неутрална аминокиселина и който проявява биологичната активност на природния човешки интерлевкин-2 и

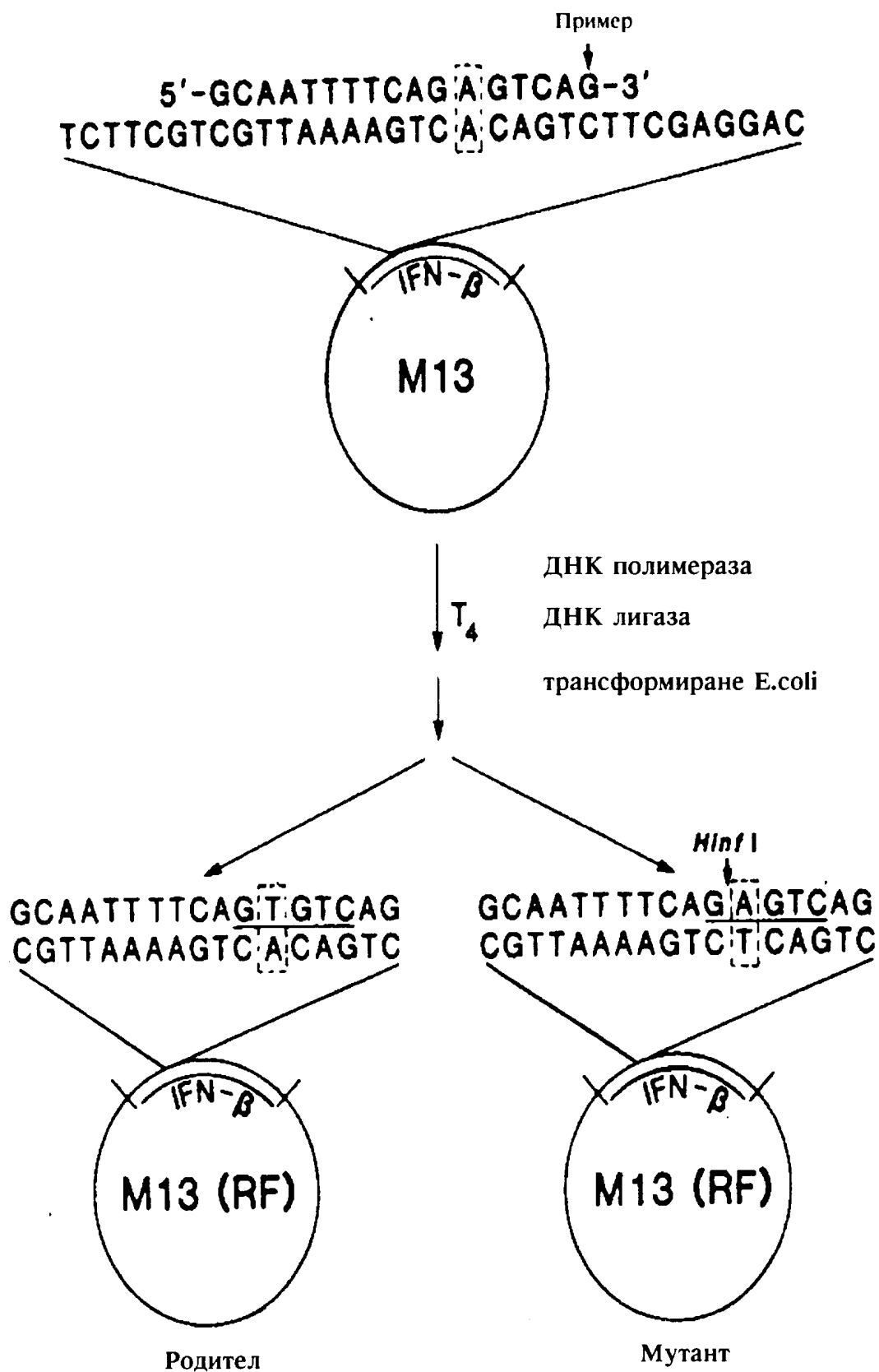
(б) един полипептид избран от групата, състояща се от гама интерферон, растежен фактор за В-клетки и IL-1.

10. Състав съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че мутеинът е аланин-интерлевкин-2-<sub>серин 125</sub> или *des* аланин-интерлевкин-2-<sub>серин 125</sub>.

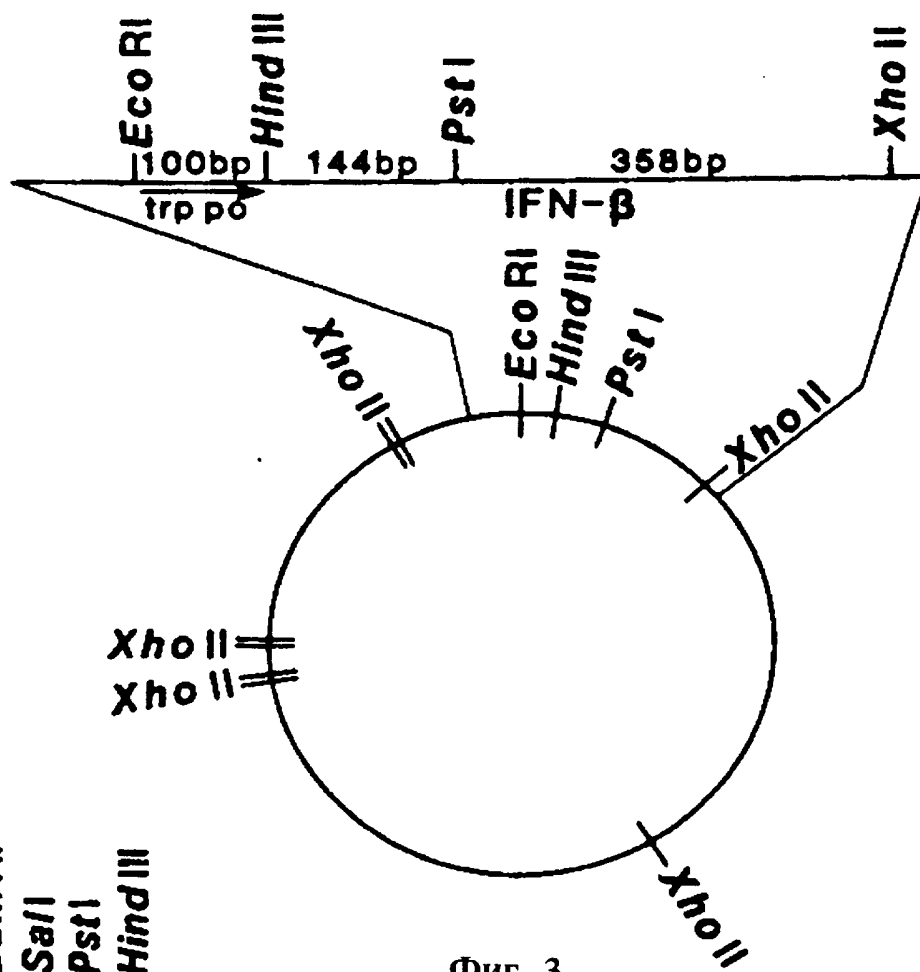
Приложение: 17 фигури.

5	10	15	20
MetSerTyrAsnLeu	LeuGlyPheLeuGln	ArgSerSerAsnPhe	GlnCysGlnLysLeu
25	30	35	40
LeuTrpGlnLeuAsn	GlyArgLeuGluTyr	CysLeuLysAspArg	MetAsnPheAspIle
45	50	55	60
ProGluGluIleLys	GlnLeuGlnGlnPhe	GlnLysGluAspAla	AlaLeuThrIleTyr
65	70	75	80
GluMetLeuGlnAsn	IlePheAlaIlePhe	ArgGlnAspSerSer	SerThrGlyTrpAsn
85	90	95	100
GluThrIleValGlu	AsnLeuLeuAlaAsn	ValTyrHisGlnIle	AsnHisLeuLysThr
105	110	115	120
ValLeuGluGluLys	LeuGluLysGluAsp	PheThrArgGlyLys	LeuMetSerSerLeu
125	130	135	140
HisLeuLysArgTyr	TyrGlyArgIleLeu	HisTyrLeuLysAla	LysGluTyrSerHis
145	150	155	160
CysAlaTrpThrIle	ValArgValGluIle	LeuAgAsnPheTyr	PheIleAsnArgLeu
165	170	175	180
ThrGlyTyrLeuArg	Asn---		

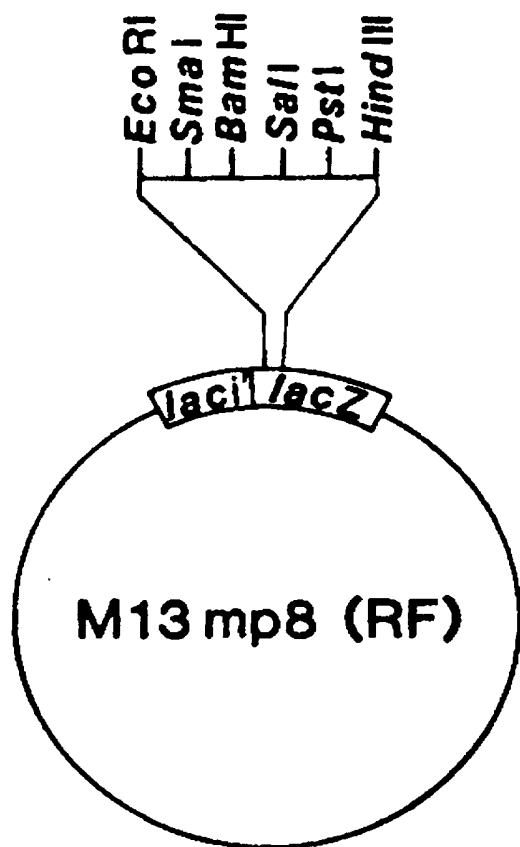
Фиг. 1



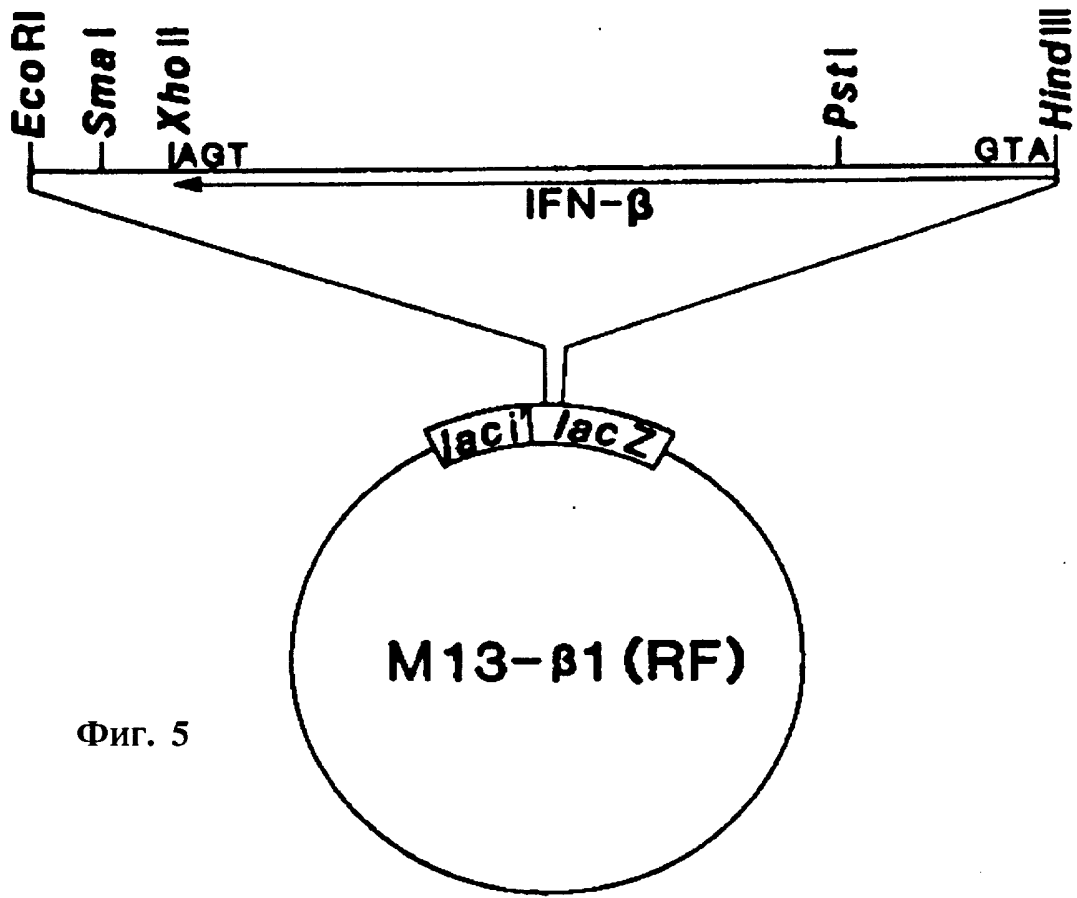
Фиг. 2



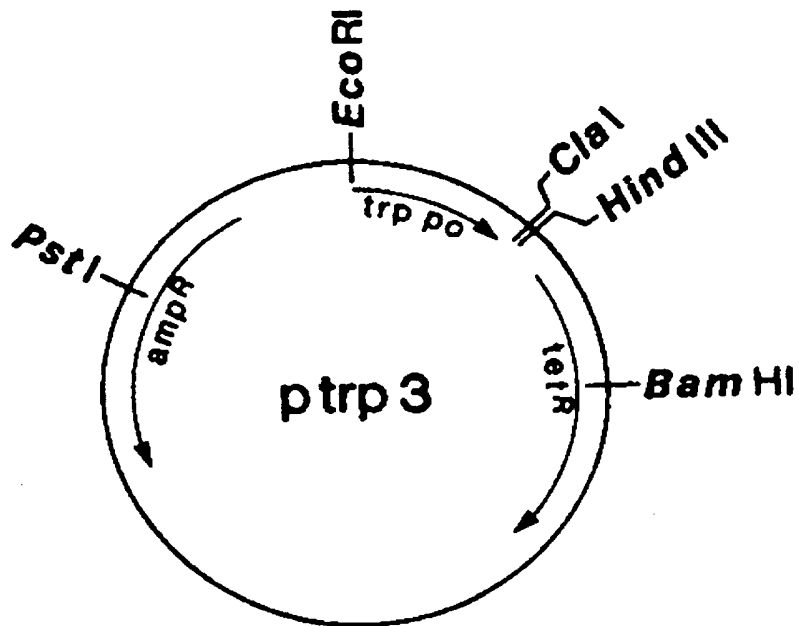
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

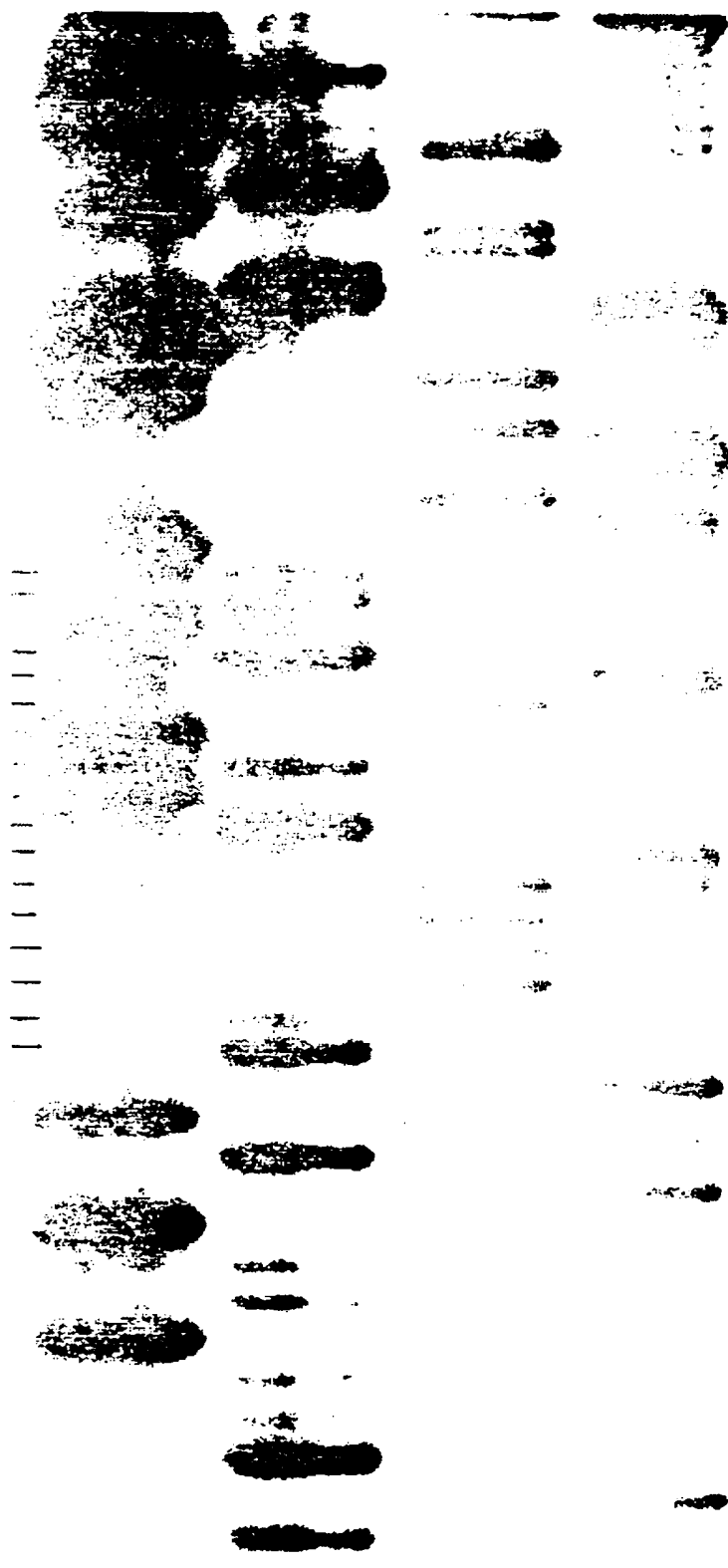


Фиг. 7

G A T C

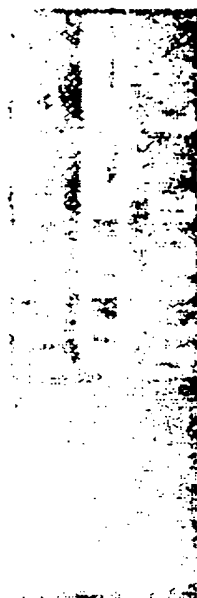
Фиг. 6

A  
A  
G  
A  
C  
T  
G  
A  
G  
A  
C  
T  
T  
T  
A  
A

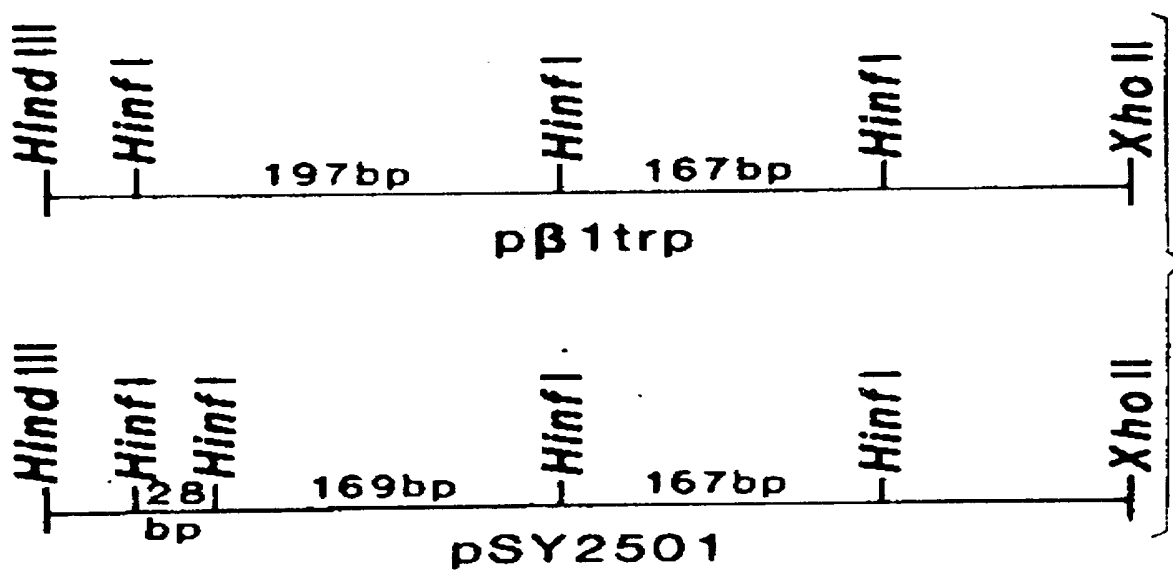


pβ1trp  
 pSY2501  
 pSY2501

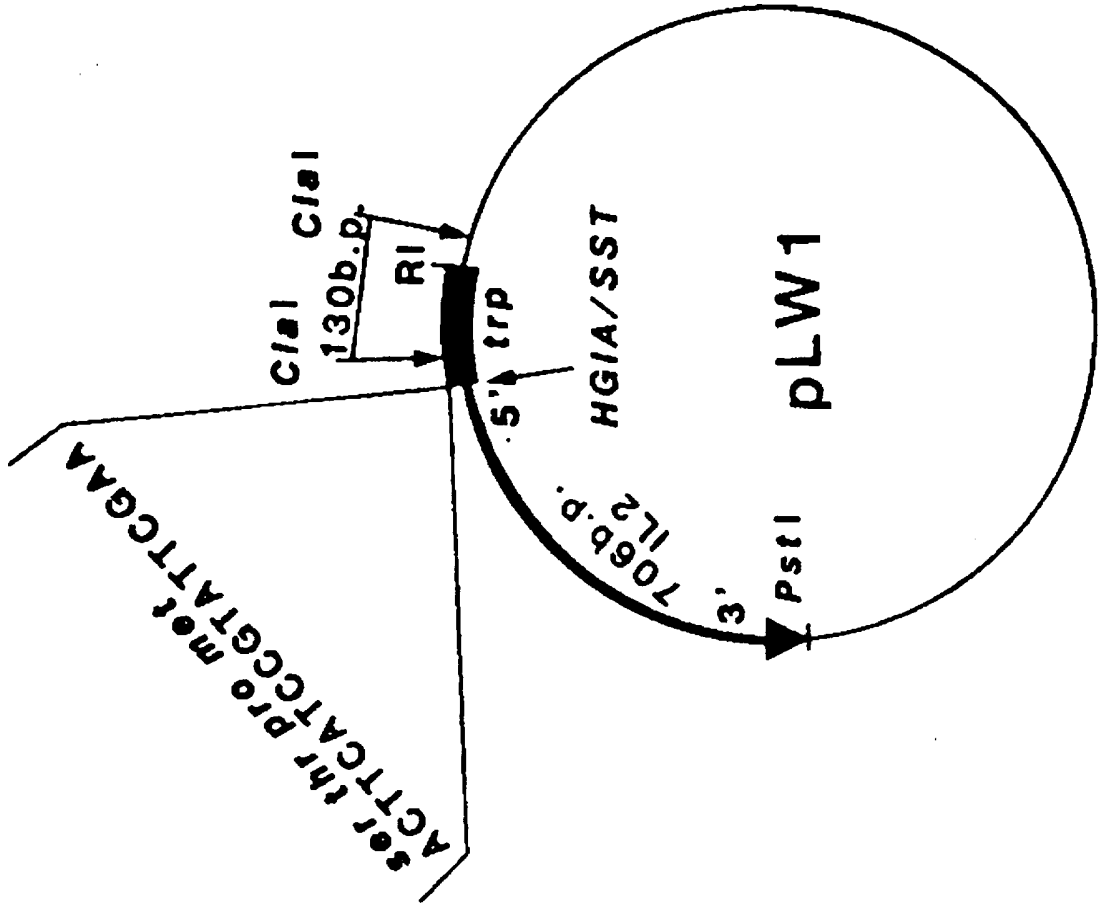
197 220—  
 154 167—  
 75—



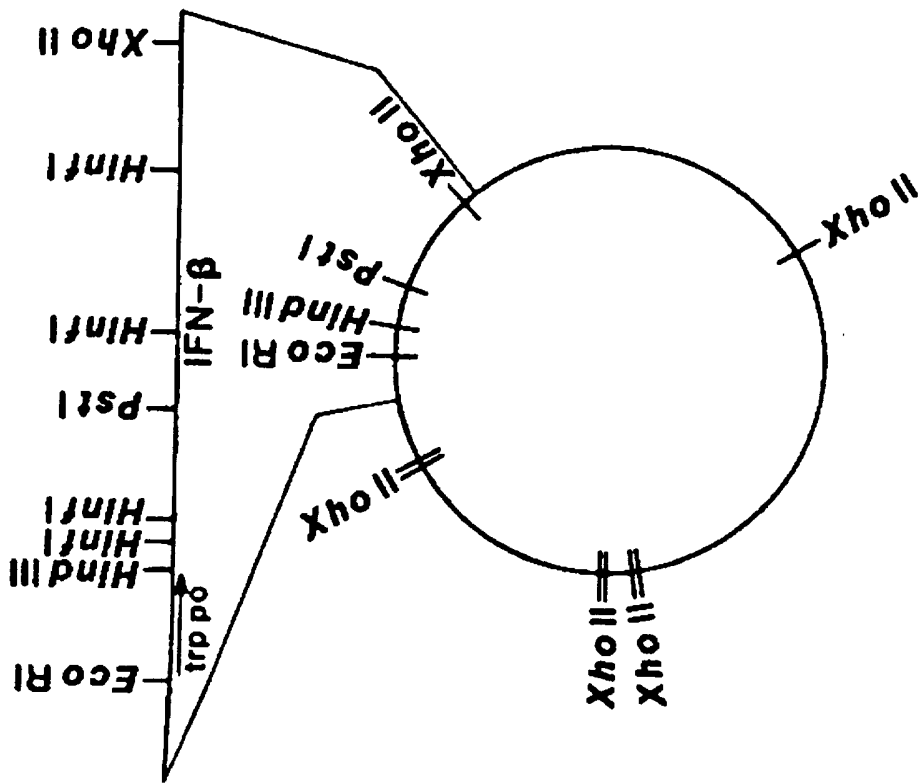
Фиг. 8 а



Фиг. 8 б



Фиг. 12



Фиг. 9

## IFN-B CYS TO SER CHANGE AT AMINO ACID 17

1  
 ATG AGC TAC AAC TTG CTT GGA TTC CTA CAA AGA AGC AGC AAT TTT CAG <sup>17</sup>AGT CAG AAG CTC  
 met ser tyr asn leu leu gly phe leu gln arg ser ser asn phe gln ser gln lys leu

61  
 CTG TGG CAA TTG AAT GGG AGG CTT GAA TAT TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC  
 leu trp gln leu asn gly arg leu glu tyr cys leu lys asp arg met asn phe asp ile

121  
 CCT GAG GAG ATT AAG CAG CTG CAG CAG TTC CAG AAG GAG GAC GCC GCA TTG ACC ATC TAT  
 pro glu glu ile lys gln leu gln gln phe gln lys glu asp ala ala leu thr ile tyr

181  
 GAG ATG CTC CAG AAC ATC TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT AGC ACT GGC TGG AAT  
 glu met leu gln asn ile phe ala ile phe arg gln asp ser ser ser thr gly trp asn

241  
 GAG ACT ATT GTT GAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA  
 glu thr ile val glu asn leu leu ala asn val tyr his gln ile asn his leu lys thr

301  
 GTC CTG GAA GAA AAA CTG GAG AAA GAA GAT TTC ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG  
 val leu glu glu lys leu glu lys glu asp phe thr arg gly lys leu met ser ser leu

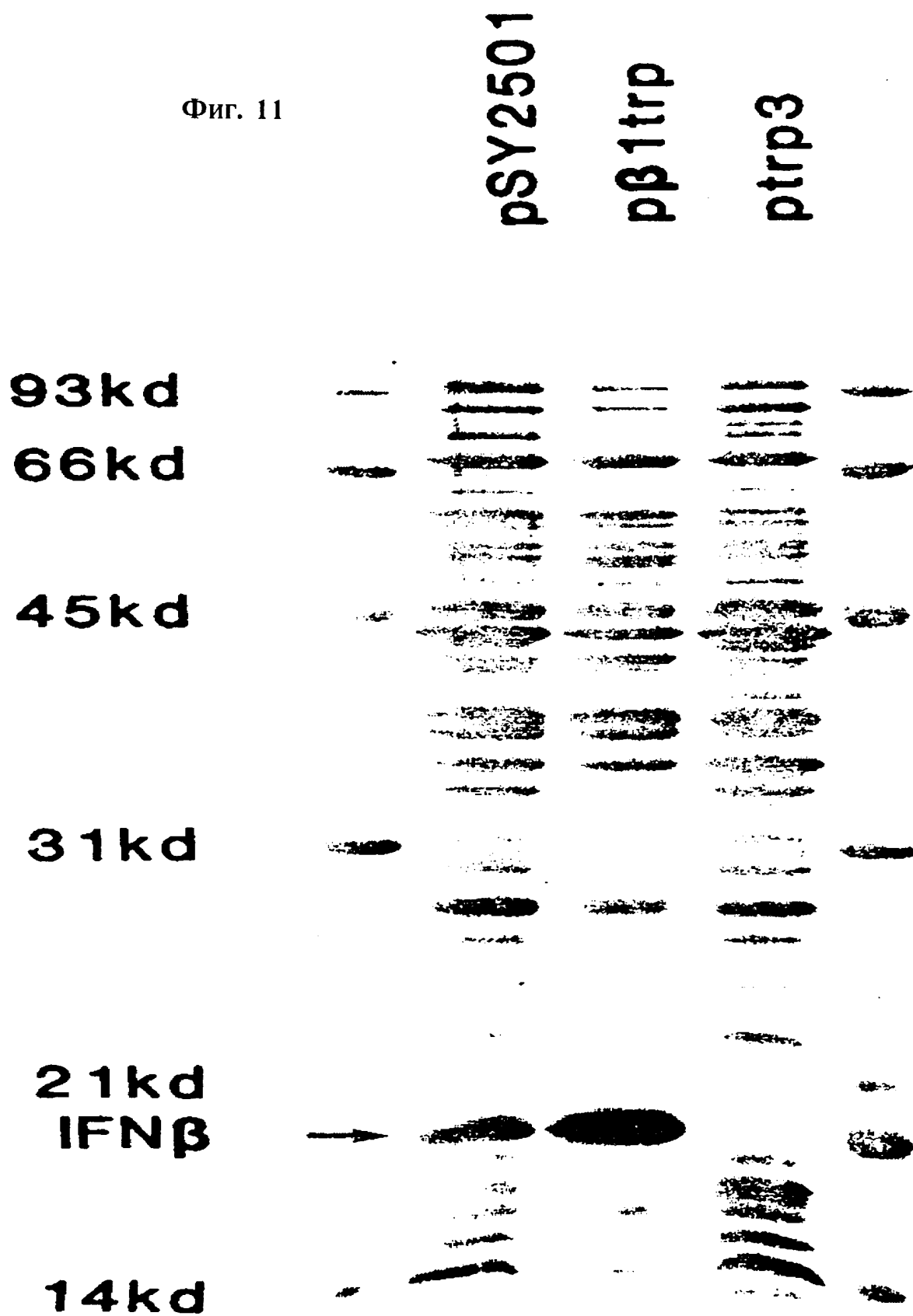
361  
 CAC CTG AAA AGA TAT TAT GGG AGG ATT CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AGT CAC  
 his leu lys arg tyr tyr gly arg ile leu his tyr leu lys ala lys glu tyr ser his

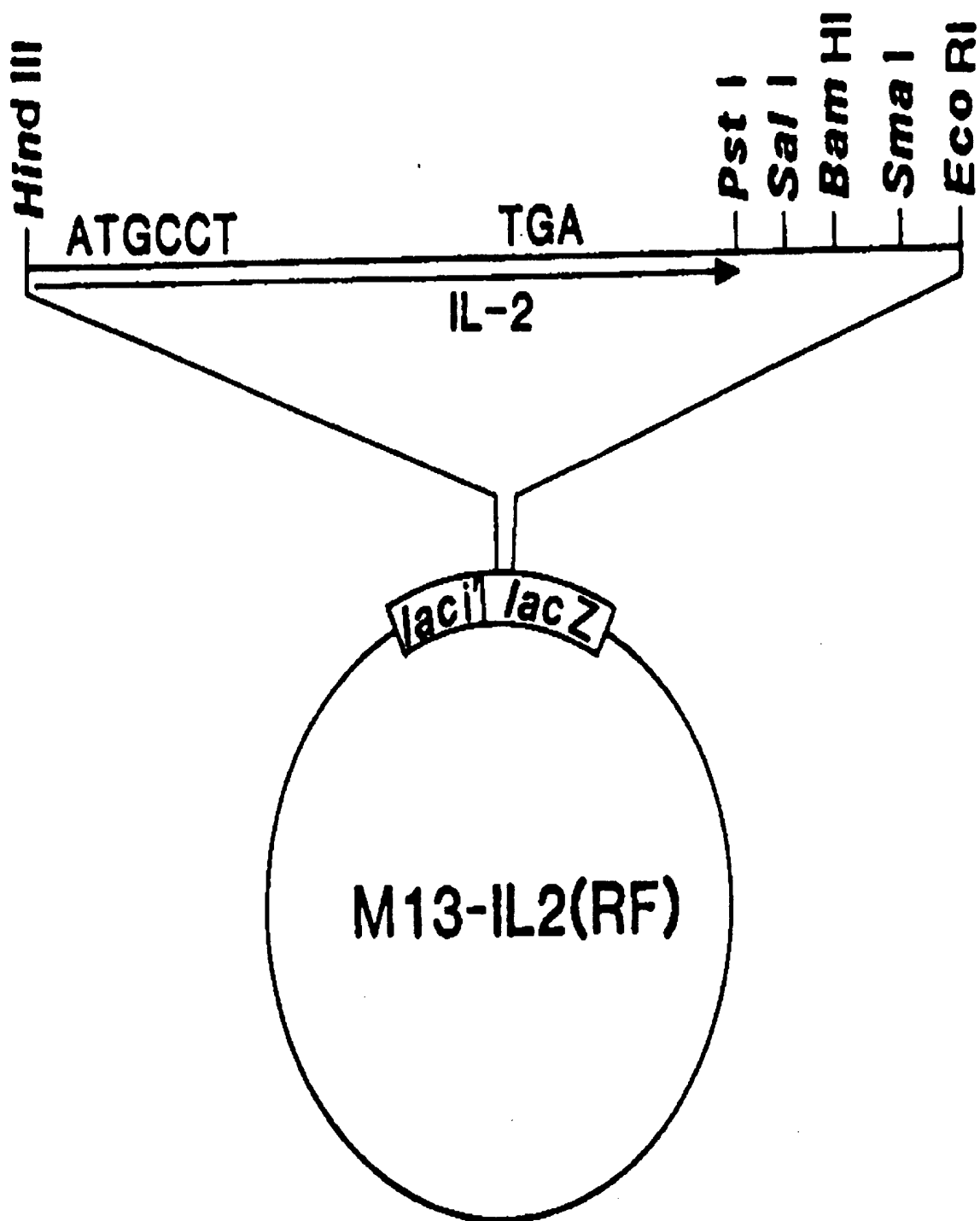
421  
 TGT GCC TGG ACC ATA GTC AGA GTG GAA ATC CTA AGG AAC TTT TAC TTC ATT AAC AGA CTT  
 cys ala trp thr ile val arg val glu ile leu arg asn phe tyr phe ile asn arg leu

481  
 ACA GGT TAC CTC CGA AAC TGA AGA TC  
 thr gly tyr leu arg asn \*\*\*

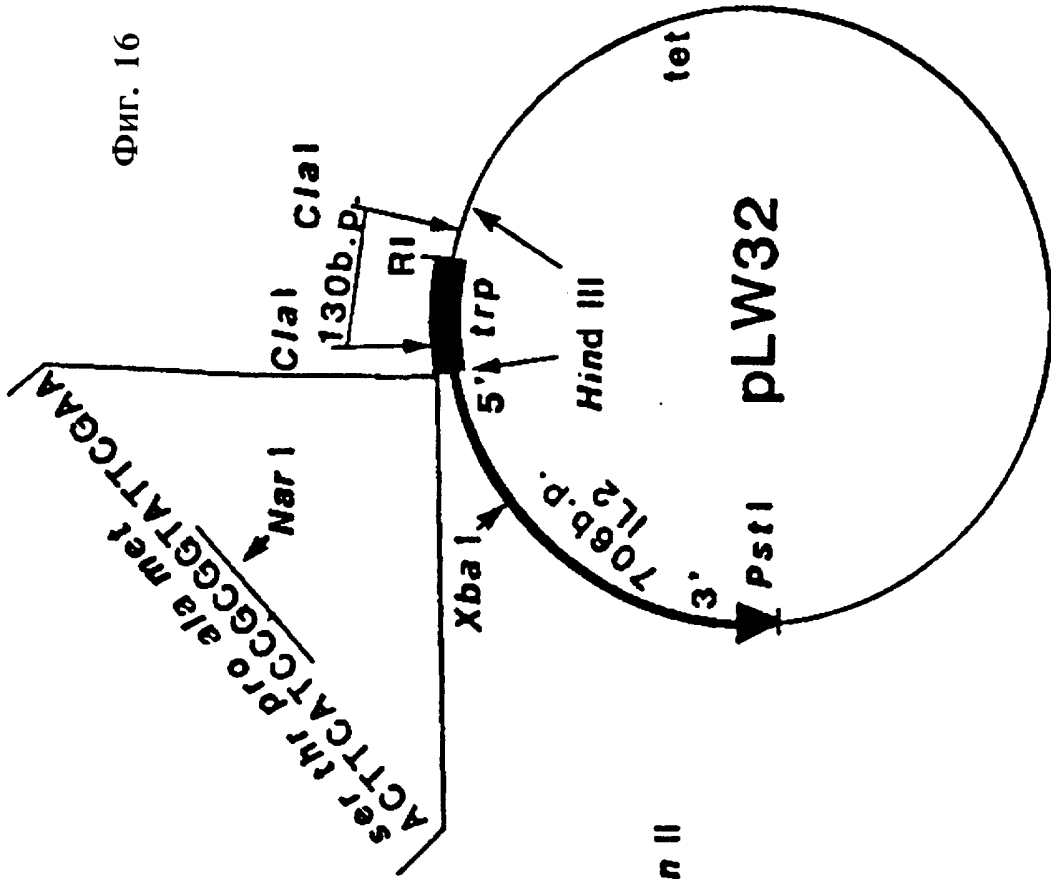
Фиг. 10

Фиг. 11

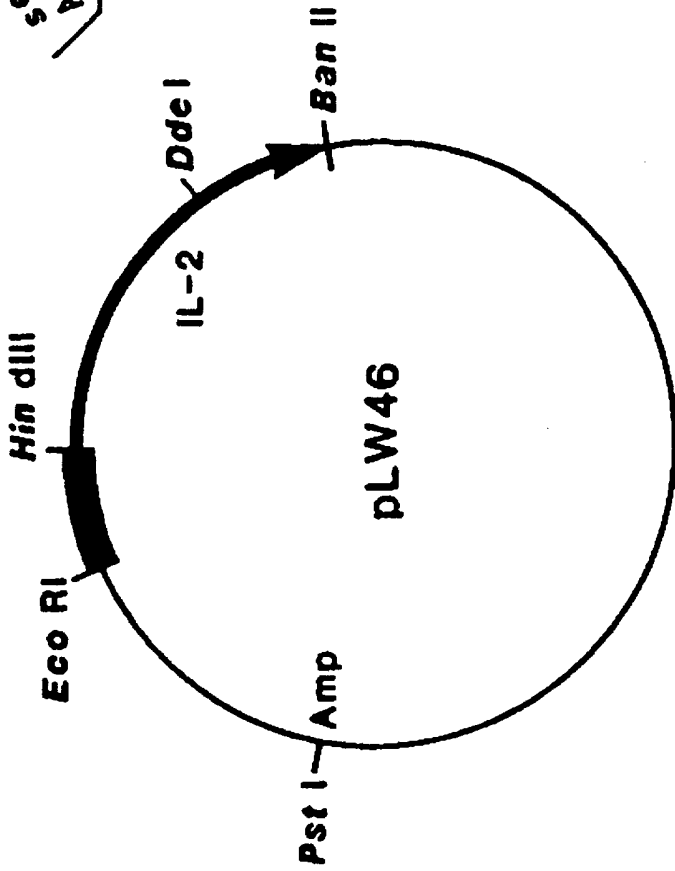




Фиг. 13



Фиг. 16



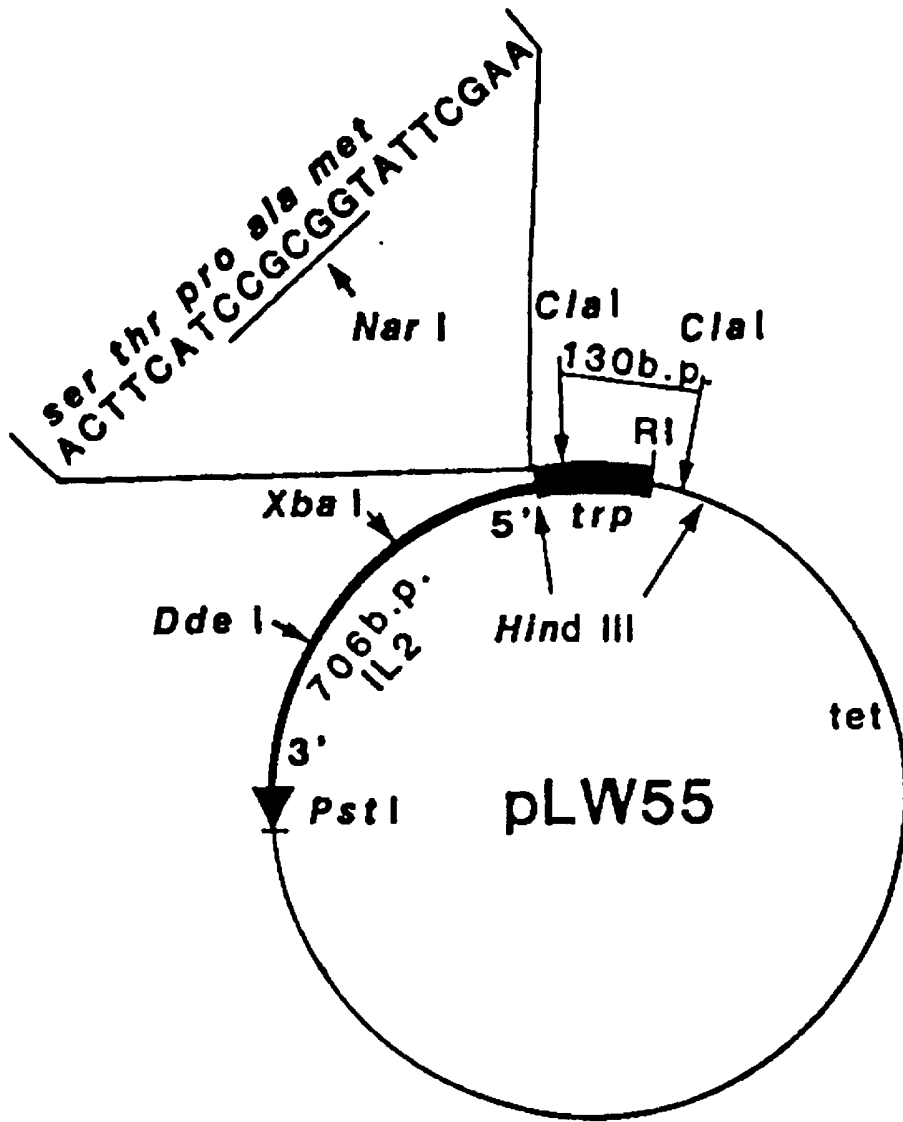
Фиг. 14

10	20	30	40	50	60
ATGCCTACTT	CAAGTTCTAC	AAAGAAAACA	CAGCTACAAC	TGGAGCATTT	ACTGCTGGAT
70	80	90	100	110	120
TTACAGATGA	TTTGAATGG	AATTAATAAT	TACAAGAATC	CCAAACTCAC	CAGGATGCTC
130	140	150	160	170	180
ACATTTAAGT	TTTACATGCC	CAAGAAGGCC	ACAGAACTGA	AACATCTTCA	GTGTCTAGAA
190	200	210	220	230	240
GAAGAACTCA	AACCTCTGGA	GGAAGTGCTA	AATTTAGCTC	AAAGCAAAA	CTTTCACCTA
250	260	270	280	290	300
AGACCCAGGG	ACTTAATCAG	CAATATCAAC	GTAATAGTTC	TGGAACTAAA	GGGATCTGAA
310	320	330	340	350	360
ACAACATTCA	TGTGTGAATA	TGCTGATGAG	ACAGCAACCA	TTGTAGAATT	TCTGAACAGA
370	380	390	400	410	420
TGGATTACCT	TTTCTCAGAG	CATCATCTCA	ACACTGACTT	GA	

Фиг. 15 а

5	10	15	20
MetProThrSerSer	SerThrLysLysThr	GlnLeuGlnLeuGlu	HisLeuLeuLeuAsp
25	30	35	40
LeuGlnMetIleLeu	AsnGlyIleAsnAsn	TyrLysAsnProLys	LeuThrArgMetLeu
45	50	55	60
ThrPheLysPheTyr	MetProLysLysAla	ThrGluLeuLysHis	LeuGlnCysLeuGlu
65	70	75	80
GluGluLeuLysPro	LeuGluGluValLeu	AsnLeuAlaGlnSer	LysAsnPheHisLeu
85	90	95	100
ArgProArgAspLeu	IleSerAsnIleAsn	ValIleValLeuGlu	LeuLysGlySerGlu
105	110	115	120
ThrThrPheMetCys	GluTyrAlaAspGlu	ThrAlaThrIleVal	GluPheLeuAsnArg
125	130	135	140
TrpIleThrPheSer	GlnSerIleIleSer	ThrLeuThr---	

Фиг. 15 б



Фиг. 17

Издание на Патентното ведомство на Република България  
София - 1113, бул. "Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: М. Минева

Редактор: Н. Божинова

Пор. 37479

Тираж: 40 СК