PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
2002 - 1836

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
A 61 K 47/48

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **13.11.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **12.11.1999 18.11.1999 17.03.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/01631 1999/166293 2000/00447**

(33) Země priority: **DK US DK**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.08.2002**
(Věstník č. 8/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/DK00/00631**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/36001**

(71) Přihlašovatel:
MAXYGEN HOLDINGS LTD, Redwood City, CA, US;

(72) Původce:
Jensen Anne Dam, Horsholm, DK;
Andersen Kim Vilbour, Horsholm, DK;
Hansen Christian Karsten, Horsholm, DK;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Konjugáty interferonu gama

(57) Anotace:

Konjugát s aktivitou interferonu gama, který obsahuje alespoň jednu první nepolypeptidovou část kovalentně navázanou na polypeptid IFNG, kde polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci odlišnou od sekvence rodičovského polypeptidu IFNG v alespoň jednom zavedeném a/nebo alespoň jednom odstraněném aminokyselinovém zbytku obsahujícím vazebnou skupinu pro nepolypeptidovou část. Konjugát může být použit pro léčení různých onemocnění.

CZ 2002 - 1836 A3

27.05.02
PV 2002-1836
295547

Konjugáty interferonu gama

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká konjugátů s aktivitou podobnou aktivitě interferonu gama, způsobů jejich výroby, farmaceutických prostředků s obsahem těchto molekul a jejich použití při léčení onemocnění.

Dosavadní stav techniky

Interferon gama (IFNG) je cytokin produkovaný T-lymfocyty a buňkami - přirozenými zabíječi, a existuje jako homodimer dvou polypeptidových podjednotek, které jsou nekovalentně vázány. Zralá forma každého dimeru obsahuje 143 aminokyselinových zbytků (ukázáno v SEQ ID No. 2), a jeho prekurzorová forma zahrnuje signální sekvenci o délce 166 aminokyselinových zbytků (ukázáno v SEQ ID No. 1).

Každá podjednotka má dvě potenciální N-glykosylační místa (Aggarwal a další, Human Cytokines, Blackwell Scientific Publications, 1992) v polohách 25 a 97. V závislosti na stupni glykosylace je molekulová hmotnost IFNG ve formě dimeru 34 až 50 kDa (Farrar a další, Ann. Rev. Immunol., 1993, 11: 571 - 611).

Primární sekvence lidského IFNG standardního typu (huIFNG) byla ukázána v Gray a další (Nature 298: 859 - 863, 1982), Taya a další (EMBO J. 1: 953 - 958, 1982), Devos a další (Nucleic Acids Res. 10: 2487 - 2501, 1982) a Rinderknecht a další (J. Biol. Chem. 259: 6790 - 6797, 1984), a v EP 77670, EP 89676 a EP 110044.

3D struktura huIFNG byla popsána autory Ealick a další (Science 252: 698 - 702, 1991).

27.05.02

Byly popsány různé přirozeně se vyskytující nebo mutované formy polypeptidů podjednotek IFNG, včetně polypeptidu obsahujícího N-koncovou aminokyselinovou sekvenci Cys-Tyr-Cys (polohy (-3)-(-1) vzhledem k SEQ ID No. 2), polypeptidu obsahujícího N-koncový methionin (poloha -1 vzhledem k SEQ ID No. 2), a různé formy zkrácené na C-konci obsahující 127 - 134 aminokyselinových zbytků. Je známo, že z C-konce je možno odstranit 1 - 15 aminokyselin, aniž by došlo ke snížení aktivity molekuly IFNG. Navíc byla popsána heterogenita C-konce huIFNG autory Pan a další (Eur. J. Biochem. 166: 145 - 149, 1987).

Muteiny huIFNG byly popsány v Slodowski a další (Eur. J. Biochem. 202: 1133 - 1140, 1991), Luk a další (J. Biol. Chem. 265: 13314 - 13319, 1990), Seelig a další, (Biochemistry 27: 1981 - 1987, 1988), Trousdale a další (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 26: 1244 - 1251, 1985) a v EP 146354. Přirozená varianta huIFNG byla popsána autory Nishi a další (J. Biochem. 97: 153 - 159, 1985).

US 6,046,034 popisuje termostabilní rekombinantní varianty huIFNG (rhuIFNG), které mají zavedeny až čtyři páry cysteinových zbytků, aby byla umožněna tvorba disulfidického můstku a tím stabilizace varianty IFNG v homodimerní formě.

WO 92/08737 popisuje varianty IFNG obsahující přidaný methionin na N-konci úplné (zbytky 1 - 143) nebo částečné (zbytky 1 - 132) aminokyselinové sekvence lidského IFNG standardního typu. EP 219 781 popisuje částečné sekvence huIFNG obsahující aminokyselinové zbytky 3 - 124 (ze SEQ ID No. 2). US 4,832,959 popisuje částečné sekvence huIFNG obsahující zbytky 1 - 127, 5 - 146 a 5 - 127 aminokyselinové sekvence, která má ve srovnání se SEQ ID No. 2 tři další N-koncové aminokyselinové zbytky (CYC). US 5,004,689 popisuje sekvence DNA kódující huIFNG bez tří N-koncových aminokyselinových zbytků CYC a její expresi v *E. coli*. EP 446582 popisuje bakterii *E. coli* produkovaný rhuIFNG neobsahující N-koncový

27.05.02

methionin. US 6,120,762 popisuje peptidový fragment huIFNG obsahující zbytky 95 - 134 (vzhledem k SEQ ID No. 2).

Vysoká míra exprese rhuIFNG byla popsána autory Wang a další (Sci. Sin. B 24: 1076 - 1084, 1994).

Glykosylovaná varianta rhuIFNG byla popsána autory Curling a další (Biochem. J. 272: 333 - 337, 1990) a Hooker a další, (J. of Interferon and Cytokin Research, 1998, 18: 287 - 295).

Polymerová modifikace rhuIFNG byla popsána autory Kita a další (Drug Des. Deliv. 6: 157 - 167, 1990), a v EP 236987 a US 5,109,120.

WO 92/22310 popisuje konjugované asialoglykoproteinové deriváty interferonů, mj. huIFNG.

Fúzní proteiny IFNG již byly popsány. Například EP 237019 popisuje polypeptid s jedním řetězcem, který má aktivitu interferonu β a jednu oblast s aktivitou IFNG.

EP 158 198 popisuje polypeptid s jedním řetězcem obsahující oblast s aktivitou IFNG a oblast s aktivitou IL-2. Několik odkazů popisovalo jednořetězcové dimerní proteiny IFNG, například Landar a další (J. Mol. Biol., 2000, 299: 169 - 179).

WO 99/02710 popisuje polypeptidy s jedním řetězcem, přičemž jedním z nich je IFNG.

WO 99/03887 popisuje PEGylované varianty polypeptidů z vyšší skupiny růstových hormonů, ve kterých byly zbytky neesenciálních aminokyselin umístěné ve specifikované oblasti polypeptidu nahrazeny cysteinovým zbytkem. IFNG se uvádí jako jeden příklad zástupce vyšší skupiny růstových hormonů, ale jeho modifikace se podrobněji nediskutuje. Použití IFNG bylo navrhováno pro léčení onemocnění intersticiální plicní tkáně (známého pod názvem Interstitial Pulmonary Fibrosis, IPF) (Ziesche a další (N. Engl. J. Med. 341: 1264 - 1269, 1999 a Chest 110: doplněk: 25S, 1996) a EP 795332), přičemž pro

tento účel může být IFNG použit v kombinaci s prednisolonem. Navíc k IPF mohou být léčeny pomocí IFNG granulomatózní onemocnění (Bolinger a další, Clinical Pharmacy, 1992, 11: 834 - 850), některé mykobakteriální infekce (N. Engl. J. Med. 330: 1348 - 1355, 1994), rakovina ledvin (J. Urol. 152: 841 - 845, 1994), osteopetróza (N. Engl. J. Med. 332: 1594 - 1599, 1995), skleroderma (J. Rheumatol. 23: 654 - 658, 1996), hepatitida B (Hepatogastroenterology 45: 2282 - 2294, 1998), hepatitida C (Int. Hepatol. Communic. 6: 264 - 273, 1997), septický šok (Nature Medicin 3: 678 - 681, 1997) a revmatoidní artritida.

Jako farmaceutická sloučenina se rhuIFNG používá s určitými úspěchy, především proti některým virovým infekcím a tumorům. rhuIFNG se obvykle aplikuje parenterální, s výhodou subkutánní injekcí. Maximální koncentrace v séru byly nalezeny po několika hodinách, poločas v plasmě je 30 min po podání i.v. Z tohoto důvodu vyžaduje účinné léčení rhuIFNG četné injekce. Hlavní nepříznivé účinky tvoří horečka, mrazení, pocení, bolest hlavy, bolest svalů a ospalost. Tyto účinky souvisejí s injekcemi rhuIFNG a jsou pozorovány během prvních hodin po injekci. Vzácné vedlejší účinky jsou místní bolest a zarudnutí kůže, zvýšení hladin jaterních enzymů, reverzibilní granulo- a trombopenie a kardiotoxicita.

Je žádoucí poskytnout nové molekuly s aktivitou IFNG, které mají zlepšené vlastnosti z hlediska farmakokinetiky, homogenity, imunogenicity, a jiné nepříznivé vedlejší účinky jsou srovnatelné s huIFNG nebo rhuIFNG.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález popisuje zlepšené molekuly podobné IFNG, které poskytují jednu nebo více z výše uvedených žádoucích vlastností. V prvním provedení se vynález týká konjugátu s aktivitou

27.05.02

IFNG, který obsahuje alespoň jednu první nepolypeptidovou část kovalentně navázanou na polypeptid IFNG, polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci odlišnou od sekvence rodičovského polypeptidu IFNG v alespoň jednom zavedeném a/nebo alespoň jednom odstraněném aminokyselinovém zbytku, která obsahuje vazebnou skupinu pro nepolypeptidovou část. Konjugáty mají prodloužený poločas *in vivo* ve srovnání s huIFNG a rhuIFNG a popřípadě vyvolávají sníženou imunitní odpověď ve srovnání s rhuIFNG. Tato třída molekul má popřípadě také další zlepšené vlastnosti z hlediska možnosti vyrábět homogenní molekuly, zlepšenou stabilitu vůči proteolýze a/nebo zvýšenou biologickou dostupnost.

Konjugát podle vynálezu tedy nabízí řadu výhod ve srovnání se sloučeninami IFNG, které jsou v současnosti dostupné, včetně delších intervalů mezi injekcemi nebo jinými formami podávání, nižšího výskytu vedlejších účinků a/nebo zvýšené účinnosti v důsledku omezení protilátek. Navíc je možno použitím konjugátu podle vynálezu dosáhnout vyšších dávek účinného proteinu a tím účinnější terapeutické odpovědi.

V dalším provedení se vynález týká konjugátu s aktivitou IFNG, který obsahuje alespoň jeden N-koncově PEGylovaný polypeptid IFNG. Polypeptidem IFNG může být huIFNG nebo jakýkoli z polypeptidů IFNG popisovaných v přihlášce.

V ještě dalších provedeních se vynález týká prostředků a způsobů výroby konjugátu podle vynálezu včetně nukleotidových sekvencí a expresních vektorů stejně jako způsobů výroby polypeptidu nebo konjugátu.

V ještě dalších provedeních se vynález týká terapeutického prostředku obsahujícího konjugát podle vynálezu, konjugátu nebo prostředku podle vynálezu pro použití v lékařství, použití konjugátu nebo prostředku v lékařství nebo výroby farmaceutického prostředku pro léčení onemocnění.

27.05.02

Vynález se konečně týká použití specifikovaných konjugátů IFNG pro výrobu farmaceutického prostředku, farmaceutického prostředku nebo částí kitu pro léčení onemocnění intersticiálních plicních tkání, rakoviny, infekcí a/nebo zánětlivých onemocnění, v případě onemocnění intersticiálních plicních tkání navíc popřípadě v kombinaci s glukokortikoidy.

Podrobný popis vynálezu

Definice

V souvislosti s předkládanou přihláškou a vynálezem platí následující definice:

Termín „konjugát" (nebo zaměnitelně „konjugovaný polypeptid") má označovat heterogenní (ve smyslu kompozitní nebo chimérní) molekulu vytvořenou kovalentní vazbou jednoho nebo více polypeptidů na jednu nebo více nepolypeptidových částí. Termín kovalentní vazba znamená, že polypeptid a nepolypeptidová část jsou buď na sebe přímo kovalentně navázány, nebo jsou jinak nepřímo vzájemně kovalentně spojeny prostřednictvím vložené skupiny nebo skupin, jako je můstek, mezerníková skupina nebo propojovací skupina nebo skupiny. Konjugát je s výhodou za relevantních koncentrací a podmínek rozpustný, tj. rozpustný ve fyziologických kapalinách jako je krev. Příklady konjugovaných polypeptidů podle vynálezu zahrnují glykosylované a/nebo PEGylované polypeptidy. Termín „nekonjugovaný polypeptid" může být použit v souvislosti s polypeptidovou částí konjugátu.

Termín „nepolypeptidová část" má označovat molekulu, která je schopná konjugace s vazebnou skupinou polypeptidu IFNG. Mezi výhodné příklady takové molekuly patří polymerní molekuly, lipofilní sloučeniny, cukerné části nebo organická derivatizační činidla. V souvislosti s konjugátem podle vynálezu je zřejmé, že

27.05.02

nepolypeptidová část je na polypeptidovou část konjugátu navázána prostřednictvím vazebné skupiny polypeptidu.

Termín „molekula polymeru" je definován jako molekula vytvořená kovalentní vazbou dvou nebo více monomerů, kde žádným z monomerů není zbytek aminokyseliny, kromě případu, kdy polymerem je lidský albumin nebo jiný protein, který se v hojném množství vyskytuje v plasmě. Termín „polymer" může být používán zaměnitelně s termínem „molekula polymeru". Termín „cukerná část" má označovat uhlohydrátovou molekulu navázanou glykosylací *in vivo* nebo *in vitro*, jako N- nebo O-glykosylací. Kromě případů, kdy je počet nepolypeptidových částí jako je molekula nebo molekuly polymeru, v konjugátu výslovně uveden, každý odkaz na „nepolypeptidovou část" obsaženou v konjugátu nebo jinak používanou v předkládaném vynálezu, bude označovat jednu nebo více nepolypeptidových částí v konjugátu.

Termín „vazebná skupina" má označovat skupinu aminokyselinového zbytku schopnou vazby na příslušnou nepolypeptidovou část jako je molekula polymeru nebo cukerná část. Použití vazebných skupin a jim odpovídajících nepolypeptidových částí je zřejmé z následující tabulky.

Vazebná skupina	Amino-kyselina	Příklady nepoly-peptidové části	Způsob konjugace/-aktivovaný PEG	Odkazy
$-NH_2$	N-koncová, Lys	Polymer, např. PEG	mPGE-SPA, tresylovaný mPEG	Shearwater Inc., Delgado a další, critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9(3,4): 249 - 304 (1992)

27.05.02

-COOH	C-konc., Asp, Glu	Polymer, např. PEG cukerná část	mPEG-Hz vazba *in vitro*	Shearwater Inc.
-SH	Cys	Polymer, např. PEG, cukerná část	PEG- vinylsulfon PEG-maleimid vazba *in vitro*	Shearwater Inc., Delgado a další, critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9(3,4): 249 - 304 (1992)
-OH	Ser, Thr, OH-, Lys	cukerná část	*in vivo* O-glykosylace	
$-CONH_2$	Asn jako část N-glykosylačního místa	cukerná část	*in vivo* glykosylace	
Aromatický zbytek	Phe, Tyr, Trp	cukerná část	vazba *in vitro*	
$-CONH_2$	Gln	cukerná část	vazba *in vitro*	Yan a Wold, Biochemistry, 1984, 31. 7.; 23(16): 3759 - 65
Aldehyd Keton	Oxidovaný uhlohydrát	Polymer, např. PEG, PEG-hydrazid	PEGylace	Andresz a další, 1978, Makromol. Chem. 179: 301; WO 92/16555, WO 00/23114
Guanidino	Arg	cukerná část	vazba *in vitro*	Lundblad a Noyes, Chimical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc., Boca Raton, FI
Imidazolový kruh	His	cukerná část	vazba *in vitro*	Jako pro guanidin

Pro N-glykosylaci *in vivo* se termín „vazebná skupina“ používá neobvyklým způsobem pro označení aminokyselinových zbytků tvořících N-glykosylační místo (se sekvencí N X'-S/T/C-X'', kde X' je aminokyselinový zbytek kromě prolinu, X'' je jakýkoli aminokyselinový zbytek, který může nebo nemusí být identický s X', a který se s výhodou liší od prolinu, N je asparagin a S/T/C je buď serin, threonin

27.05.02

nebo cystein, s výhodou serin nebo threonin, a nejvýhodněji threonin). Ačkoli asparaginový zbytek N-glykosylačního místa je zbytek, na který se při glykosylaci váže cukerná část, této vazby nelze dosáhnout, pokud je v místě N-glykosylace přítomen zbytek jiné aminokyseliny. Jestliže je tedy nepolypeptidovou skupinou cukerná část a konjugace je nutné dosáhout N-glykosylací, termín „aminokyselinový zbytek obsahující vazebnou skupinu pro nepolypeptidovou část", jak se používá v souvislosti se změnami aminokyselinové sekvence rodičovského polypeptidu, má znamenat, že je třeba změnit jeden, dva nebo všechny aminokyselinové zbytky tvořící N-glykosylační místo takovým způsobem, aby se do aminokyselinové sekvence zavedlo nebo se z této sekvence odstranilo funkční N-glykosylační místo.

V předkládané přihlášce se názvy aminokyselin a názvy atomů (například CA, CB, CD, CG, SG, NZ, N, O, C, atd.) používají tak jak je definováno v instituci Protein DataBank (PDB) (www.pdb.org) na základě názvosloví IUPAC (IUPAC Nomenclature a Symbolism for Amino Acids and Peptides (názvy zbytků, atomů, atd.), *Eur. J. Biochem.*, 138, 9 - 37 (1984) společně s opravami uveřejněnými v *Eur. J. Biochem.*, 152, 1(1985). CA se někdy označuje jako Cα, CB jako Cβ. Termín „aminokyselinový zbytek" má označovat aminokyselinový zbytek zvolený ze skupiny alanin (Ala nebo A), cystein (Cys nebo C), kyselina asparagová (Asp nebo D), kyselina glutamová (Glu nebo E), fenylalanin (Phe nebo F), glycin (Gly nebo G), histidin (His nebo H), isoleucin (Ile nebo L), lysin (Lys nebo K), leucin (Leu nebo L), methionin (Met nebo M), asparagin (Asn nebo N), prolin (Pro nebo P), glutamin (Gln nebo Q), arginin (Arg nebo R), serin (Ser nebo S), threonin (Thr nebo T), valin (Val nebo V), tryptofan (Trp nebo W) a tyrosin (Tyr nebo Y). Číslování aminokyselinových zbytků v tomto dokumentu začíná na N-konci huIFNG bez signálního peptidu (tj. SEQ ID No. 2). Terminologie používaná pro identifikaci poloh/substitucí aminokyselin je ukázána následujícím způsobem: N25 (označuje polohu #25, kterou zabírá asparagin v aminokyselinové sekvenci

27.05.02

ukázané v SEQ ID No. 2). N25C (označuje, že zbytek Asp v poloze 25 byl nahrazen Cys). Vícečetné substituce jsou označeny „+“, například Q1N+P3T/S znamená aminokyselinovou sekvenci obsahující substituci zbytku Gln v poloze 1 zbytkem Asn a substituci zbytku Pro v poloze 3 za Thr nebo Ser, s výhodou Thr.

Termín „nukleotidová sekvence“ má označovat za sebou následující řadu dvou nebo více molekul nukleotidů. Nukleotidová sekvence může být genomová, cDNA, RNA, semisyntetická, syntetická, nebo jakákoli jejich kombinace.

Termín „polymerázová řetězová reakce“ nebo „PCR“ obecně označuje způsob amplifikace požadované nukleotidové sekvence *in vitro*, jak se popisuje například v US 4,683,195. Obecně zahrnuje metoda PCR opakované cykly syntézy prodloužení primeru s použitím oligonukleotidových primerů schopných přednostně hybridizovat s templátovou nukleovou kyselinou.

Termíny „buňka“, „hostitelská buňka“, „buněčná linie“ a „buněčná kultura“ se zde používají zaměnitelně a všechny tyto termíny by měly být chápány tak, aby zahrnovaly potomstvo získané růstem nebo kultivací buňky. „Transformace“ a „transfekce“ se používají zaměnitelně pro označení procesu zavedení DNA do buňky.

Termín „operativně spojený“ označuje kovalentní spojení dvou nebo více nukleotidových sekvencí provedené pomocí enzymu nebo jinak v takové vzájemné konfiguraci, že může být uskutečněna normální funkce sekvencí. Například nukleotidová sekvence kódující presekvenci nebo sekreční úvodní sekvenci je operativně spojena s nukleotidovou sekvencí polypeptidu, jestliže se exprimuje jako preprotein, který se účastní sekrece polypeptidu; promotor nebo zesilující sekvence (enhancer) je operativně spojený s kódující sekvencí, jestliže ovlivňuje transkripci sekvence; vazebné místo pro ribosom je operativně spojeno s kódující sekvencí, jestliže je umístěno tak, aby umožňovalo translaci. Obecně znamená termín „operativně

spojený", že spojené nukleotidové sekvence jsou souvislé, a v případě sekreční úvodní sekvence souvislé a ve správné čtecí fázi. Spojení je uskutečněno ligací ve vhodných restrikčních místech. Jestliže taková místa neexistují, použije se syntetických oligonukleotidových adaptorových sekvencí nebo linkerů ve spojení se standardními metodami rekombinantní DNA.

Termín „zavedení" má primárně znamenat substituci existujícího aminokyselinového zbytku, ale může také znamenat vložení dalšího aminokyselinového zbytku.

Termín „odstranění" má primárně znamenat substituci aminokyselinového zbytku za jiný aminokyselinový zbytek, ale může také znamenat deleci (bez substituce) odstraňovaného aminokyselinového zbytku.

Termín „aminokyselinový zbytek obsahující vazebnou skupinu pro nepolypeptidovou část" má znamenat, že aminokyselinový zbytek je zbytkem, na který se váže nepolypeptidová část (v případě zaváděného aminokyselinového zbytku) nebo na který by se navázala (v případě odstraněného aminokyselinového zbytku).

Termín „jeden rozdíl" nebo „odlišuje se", jak se používá v souvislosti s aminokyselinovou sekvencí polypeptidu IFNG popisovaného v předkládané přihlášce, má být chápán tak, aby umožnil přítomnost dalších rozdílů. Navíc k rozdílu ve specifikované aminokyselině mohou být tedy mutovány i jiné aminokyselinové zbytky, než které jsou specifikované.

Termín „funkční poločas *in vivo*" se používá ve svém normálním významu, tj. jako doba, za kterou cirkuluje v plasmě nebo krevním řečišti 50 % molekul konjugátu před tím, než dojde k jeho vyloučení (nazývá se také „poločas v séru"), nebo doba, po kterou se zachová 50 % dané funkčnosti konjugátu. Polypeptid nebo konjugát se normálně vylučuje působením jednoho nebo více retikuloendoteliálních systémů (RES), ledvin, sleziny nebo jater, nebo specifickou nebo

27.05.02

nespecifickou proteolýzou. Za normálních okolností závisí vylučování na velikosti (vzhledem k prahové hodnotě pro glomerulární filtraci), náboji, navázaných uhlohydrátových řetězcích a na přítomnosti buněčných receptorů pro protein. Zachovávaná funkčnost se normálně volí z antivirové aktivity, antiproliferační aktivity, imunomodulační aktivity nebo vazebné aktivity na receptor pro IFNG. Funkční poločas *in vivo* může být stanoven jakoukoli vhodnou metodou známou v oboru, jak bude dále diskutováno v části Metody.

Termín „zvýšený funkční poločas *in vivo*" se používá pro označení, že funkční poločas *in vivo* konjugátu je statisticky významně zvýšený vzhledem k referenční molekule jako je huIFNG, popřípadě v glykosylované formě, například nekonjugovaný huIFNG nebo rhuIFNG při stanovení za srovnatelných podmínek.

Termín „imunogenicita", jak se používá v souvislosti s danou látkou, má označovat schopnost látky indukovat odpověď imunitního systému člověka. Imunitní odpověď může být buněčná odpověď nebo protilátková odpověď (viz např. Roitt: Essential Immunology (8. vyd., Blackwell, kde lze nalézt další definice imunogenicity).

Termín „snížená imunogenicita" má znamenat, že konjugát podle vynálezu poskytuje měřitelně nižší imunitní odpověď než referenční molekula, jako je huIFNG nebo rhuIFNG při stanovení za srovnatelných podmínek.

Termín „vykazuje aktivitu IFNG" znamená, že polypeptid má jednu nebo více funkcí nativního IFNG, zvláště huIFNG nebo rhuIFNG, včetně schopnosti vázat se na receptor IFNG a způsobovat přenos signálu, který se přenáší po vazbě huIFNG nebo jeho receptoru při stanovení *in vitro* nebo *in vivo* (tj. biologická aktivita *in vitro* nebo *in vivo*). Receptor pro IFNG byl popsán autory Aguet a další (Cell 55: 273 - 280, 1988) a Calderon a další (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4837 - 4841, 1988). „Polypeptid IFNG" je polypeptid s aktivitou IFNG a používá se zde podle souvislosti ve spojení s polypeptidem

v monomerní nebo dimerní formě. Například jestliže se uvádějí určité substituce, za normálních okolností jsou uvedeny vzhledem k monomernímu polypeptidu IFNG. Jestliže se odkazuje na část IFNG konjugátu podle vynálezu, jde normálně o dimerní formu (a konjugát tedy například obsahuje dva monomery polypeptidu IFNG modifikované podle popisu). Dimerní forma polypeptidů IFNG může být získána normální asociací dvou monomerů nebo může být ve formě jednořetězcového dimerního polypeptidu IFNG.

Polypeptid IFNG popisovaný v této přihlášce může mít biologickou aktivitu *in vivo* nebo *in vitro* stejné velikosti jako huIFNG nebo rhuIFNG nebo nižší nebo vyšší, například může mít biologickou aktivitu *in vivo* nebo *in vitro* 1 až 100 % aktivity huIFNG nebo rhuIFNG, při měření za stejných podmínek, například může mít 1 až 25 % nebo 1 až 50 % nebo 25 až 100 % nebo 50 až 100 % aktivity huIFNG nebo rhuIFNG.

Termín „rodičovský IFNG" má označovat molekulu, která se má modifikovat podle předkládaného vynálezu. Normálně je rodičovský IFNG kódovaný nukleotidovou sekvencí, která je modifikována podle předkládaného vynálezu tak, aby kódovala polypeptidovou část konjugátu podle vynálezu. Rodičovský IFNG je normálně huIFNG nebo rhuIFNG nebo jeho varianta nebo fragment. „Varianta" je polypeptid, který se od rodičovského polypeptidu liší v jednom nebo více aminokyselinových zbytcích, normálně v 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 nebo 15 aminokyselinových zbytcích. Fragment je část úplné sekvence huIFNG s aktivitou IFNG, například C-koncově nebo N-koncově zkrácená verze.

Termín „funkční místo" má označovat jeden nebo více aminokyselinových zbytků, které jsou nezbytné nebo které se jinak účastní funkce nebo účinnosti IFNG. Tyto aminokyselinové zbytky jsou „umístěny na" funkčním místě. Funkční místo může být určeno metodami známými v oboru a s výhodou se identifikuje analýzou

struktury polypeptidu v komplexu s příslušným receptorem, jako je receptor IFNG.

Konjugát podle vynálezu

Jak je uvedeno výše, v prvním provedení se vynález týká konjugátu s aktivitou IFNG, který obsahuje alespoň jednu první nepolypeptidovou část kovalentně navázanou na polypeptid IFNG, polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci odlišnou od sekvence rodičovského polypeptidu IFNG v alespoň jednom zavedeném a/nebo alespoň jednom odstraněném aminokyselinovém zbytku, který obsahuje vazebnou skupinu pro nepolypeptidovou část.

Odstraněním nebo zavedením aminokyselinového zbytku obsahujícího vazebnou skupinu pro nepolypeptidovou část je možno specificky upravit polypeptid tak, aby byla molekula přístupnější konjugaci s vybranou nepolypeptidovou částí, pro optimalizaci způsobu konjugace (například pro zajištění optimální distribuce nepolypeptidových částí na povrchu polypeptidu IFNG) a tím pro získání nové konjugované molekuly, která má aktivitu IFNG a navíc jednu nebo více zlepšených vlastností ve srovnání s dnes dostupnými molekulami založenými na hulFNG nebo rhulFNG. Například zavedením vazebných skupin se zvýší nebo jinak změní obsah specifických aminokyselinových zbytků v polypeptidu IFNG, na které se váže příslušná nepolypeptidová část, čímž se dosáhne účinnější, specifické a/nebo extenzivní konjugace. Odstraněním jedné nebo více vazebných skupin je možné zabránit konjugaci s nepolypeptidovou částí v částech polypeptidu, ve kterých je tato konjugace neváhodná, například na aminokyselinový zbytek umístěný na nebo v blízkosti funkčního místa polypeptidu (protože konjugace v takovém místě může vést k inaktivaci nebo snížené aktivitě IFNG získaného konjugátu způsobených nesprávným rozpoznáváním receptoru). Navíc může být výhodné odstranit vazebnou skupinu umístěnou v těsné

27.05.02

blízkosti jiné vazebné skupiny, aby se zabránilo heterogenní konjugaci k těmto skupinám. Ve výhodných provedeních se změní více než jeden aminokyselinový zbytek polypeptidu IFNG, například změna zahrnuje odstranění stejně jako zavedení aminokyselinových zbytků obsahujících vazebná místa pro zvolenou nepolypeptidovou část. Toto provedení se považuje za zvláště zajímavé v tom, že je možné specificky navrhnout polypeptid IFNG tak, aby bylo dosaženo optimální konjugace k nepolypeptidové části.

Navíc k odstranění a/nebo zavedení aminokyselinových zbytků může polypeptid obsahovat jiné substituce, které nesouvisí se zavedením a/nebo odstraněním aminokyselinových zbytků obsahujících vazebnou skupinu pro nepolypeptidovou část.

I když může být rodičovským polypeptidem modifikovaným podle předkládaného vynálezu jakýkoli polypeptid s aktivitou IFNG a může být tedy odvozen z jakéhokoli zdroje, například může být jiného než lidského savčího původu, je výhodné, jestliže je rodičovský polypeptid huIFNG s aminokyselinovou sekvencí ukázanou v SEQ ID No. 2 nebo její varianta nebo fragment. Příklady variant hIFNG se popisují v popisné části výše, a zahrnují například huIFNG s N-koncovou adicí CYC, a varianty modifikované cysteinem popisované v US 6,046,034. Specifické příklady fragmentů jsou příklady popisované výše a zahrnují huIFNG zkrácené na C-konci 1 - 15 aminokyselinovými zbytky, například 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, nebo 15 aminokyselinovými zbytky, a/nebo zkrácené na N-konci o 1 - 3 aminokyselinové zbytky.

Bude zřejmé, že pokud je rodičovský polypeptid IFNG varianta nebo fragment huIFNG, modifikovaný polypeptid IFNG připravený z takového rodičovského polypeptidu, obsahuje mutace nebo zkrácení rodičovského polypeptidu.

Rodičovským polypeptidem IFNG může být také hybridní molekula mezi monomerním polypeptidem IFNG a dalším homologním

27.05.02

polypeptidem, který popřípadě obsahuje jednu nebo více dalších substitucí zavedených do hybridní molekuly. Tyto hybridy se popisují v části Dosavadní stav techniky výše. Taková hybridní molekula může obsahovat aminokyselinovou sekvenci, která se liší ve více než 15 aminokyselinových zbytcích, jako je více než 10 aminokyselinových zbytcích, od aminokyselinové sekvence ukázané v SEQ ID No. 2. Aby byla použitelná v rámci předkládaného vynálezu, musí mít hybridní molekula aktivitu IFNG.

Rodičovské IFNG jiného než lidského původu, mohou být modifikovány analogicky jako bylo popsáno, například modifikací odpovídající polohy jiného než lidského rodičovského IFNG (například jak se zjistí z porovnání aminokyselinové sekvence nebo 3D struktury uvedeného IFNG s huIFNG) k poloze popsané výše.

Bude zřejmé, že aminokyselinový zbytek obsahující vazebnou skupinu pro nepolypeptidovou část, ať už se odstraňuje nebo zavádí, se volí na základě povahy zvolené nepolypeptidové části, a ve většině případů na základě použité metody konjugace. Například jestliže je nepolypeptidovou částí polymerní molekula jako je molekula odvozená od polyethylenglykolu nebo polyalkylenoxidu, aminokyselinové zbytky schopné fungovat jako vazebné skupiny mohou být zvoleny ze skupiny cystein, lysin, kyselina asparagová, kyselina glutamová a arginin. Jestliže je nepolypeptidovou částí cukerná část, vazebná skupina je například místo glykosylace *in vivo*, s výhodou N-glykosylační místo.

Jestliže se má do polypeptidu IFNG zavádět nepolypeptidová část nebo jestliže se z něj má podle vynálezu odstranit, poloha modifikovaného polypeptidu se vhodně volí následujícím způsobem:

poloha se s výhodou nalézá na povrchu polypeptidu IFNG, a s výhodou je obsazena aminokyselinovým zbytkem, u kterého je více než 25 % postranního řetězce vystaveno rozpouštědlu, s výhodou je vystaveno rozpouštědlu více než 50 % jeho postranního řetězce, jak je zjištěno na základě 3D struktury nebo modelu IFNG v jeho dimerní

formě, kde struktura nebo model popřípadě dále obsahují jednu nebo dvě molekuly receptoru IFNG. Tyto polohy (například představující více než 25 % nebo více než 50 % exponovaného povrchu v modelu s nebo bez molekul receptoru) se uvádějí v části Materiály a metody dále.

Zajímavá je také modifikace jakéhokoli z 23 C-koncových aminokyselinových zbytků rodičovského IFNG (zavedením a/nebo odstraněním aminokyselinových zbytků obsahujících vazebnou skupinu pro nepolypeptidovou část), protože se předpokládá, že tyto zbytky jsou umístěny na povrchu polypeptidu IFNG.

V části polypeptidu IFNG konjugátu podle vynálezu jsou s výhodou dále odstraněny vazebné skupiny umístěné na místě IFNG pro vazbu receptoru, s výhodou substitucí aminokyselinového zbytku obsahujícího tuto skupinu. Aminokyselinové zbytky vazebného místa receptoru IFNG jsou identifikovány v části Materiály a metody níže. V případě jednořetězcového polypeptidu IFNG může stačit odstranit vazebné skupiny v místě vazby receptoru pouze na jednom z monomerů a tím získat konjugát s jedním řetězcem polypeptidu IFNG s jedním aktivním a jedním neaktivním místem vazby receptoru.

Aby bylo možno zjistit optimální distribuci vazebných skupin, vypočítá se vzdálenost mezi aminokyselinovými zbytky umístěnými na povrchu polypeptidu IFNG na základě 3D struktury dimerního polypeptidu IFNG. Konkrétněji se stanoví vzdálenost mezi atomy CB aminokyselinových zbytků obsahujících tyto vazebné skupiny, nebo vzdálenost mezi funkčními skupinami (NZ pro lysin, CG pro kyselinu asparagovou, CD pro kyselinu glutamovou, SG pro cystein) jednoho a atomem CB druhého aminokyselinového zbytku obsahujícího vazebnou skupinu. V případě glycinu se atom CA užije místo CB. V polypeptidové části IFNG konjugátu podle vynálezu jsou jakékoli z těchto vzdáleností s výhodou více než 8 Å (0,8 nm), zvláště více než

27.05.02

10 Å (1 nm), aby se zabránilo nebo aby se omezila heterogenní konjugace.

Aminokyselinová sekvence polypeptidu IFNG se může také lišit od sekvence rodičovského polypeptidu IFNG v tom, že byl odstraněn jeden nebo více aminokyselinových zbytků tvořících část epitopu, s výhodou substitucí za aminokyselinový zbytek obsahující vazebnou skupinu pro nepolypeptidovou část, takže se zničí nebo inaktivuje epitop. Epitopy huIFNG nebo rhuIFNG mohou být identifikovány použitím způsobů známých v oboru, známých také jako mapování epitopů, viz např. Romagnoli a další, Biol. Chem., 1999, 380 (5): 553 - 9, DeLisser H. M., Methods Mol. Biol., 1999, 96: 11 - 20, Van de Water a další, Clin. Immunol. Immunopathol., 1997, 85 (3): 229 - 35, Saint-Remy J. M., Toxicology, 1997, 119(1): 77 - 81 a Lan D. P. a Stephen C. W., Curr. Opin. Immunol., 1993, 5(2): 268 - 71. Jedna metoda je vytvoření knihovny pomocí fágů exprimujících náhodné oligopeptidy o délce například 9 aminokyselinových zbytků. Protilátky IgG1 ze specifických antisér proti huIFNG nebo rhuIFNG se vyčistí imunoprecipitací a reaktivní fágy se identifikují imunologickým přenosem. Sekvenováním DNA vyčištěných reaktivních fágů je možno zjistit sekvenci oligopeptidu a následně lokalizovat tuto sekvenci na 3D-struktuře IFNG. Takto identifikovaná oblast na struktuře tvoří epitop, který může být vybrán jako cílová oblast pro zavedení vazebné skupiny pro nepolypeptidovou část.

Aby se zabránilo přílišnému narušení struktury a funkce rodičovské molekuly IFNG, celkový počet aminokyselinových zbytků, které se budou měnit podle předkládaného vynálezu (v porovnání s aminokyselinovou sekvencí ukázanou v SEQ ID No. 2) typicky nepřevýší patnáct. Polypeptid IFNG obsahuje s výhodou aminokyselinovou sekvenci, která se odlišuje v 1 až 15 aminokyselinových zbytcích od aminokyselinové sekvence ukázané v SEQ ID No. 2, jako v 1 - 8 nebo 2 - 8 aminokyselinových zbytcích, např. v 1 - 5 nebo 2 - 5 aminokyselinových zbytcích od

27.05.02

aminokyselinové sekvence ukázané v SEQ ID No. 2. Normálně tedy polypeptid IFNG obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která se liší od zralé části aminokyselinové sekvence ukázané v SEQ ID No. 2 v 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 nebo 15 aminokyselinových zbytcích. Výše uvedená čísla s výhodou představují buď celkový počet zavedených nebo celkový počet odstraněných aminokyselinových zbytků obsahujících vazebnou skupinu pro nepolypeptidovou část nebo nepolypeptidové části, nebo celkový počet zavedených a odstraněných aminokyselinových zbytků obsahujících tuto skupinu. Přesný počet vazebných skupin dostupných pro konjugaci a přítomných v polypeptidu IFNG v dimerní formě závisí na účinku, kterého má být dosaženo konjugací. Získaný účinek závisí například na povaze a míře konjugace (například identitě nepolypeptidové části, počtu nepolypeptidových skupin, které je žádoucí nebo které je možné konjugovat s polypeptidem, kde by měly být konjugovány nebo kde by mělo být konjugaci zabráněno atd.).

Část polypeptidu IFNG konjugátu podle vynálezu může být ve zkrácené formě (například zkrácená na 1 - 15 C-koncových aminokyselinových zbytcích jak se popisuje výše v souvislosti s rodičovským polypeptidem IFNG, nebo zkrácená na 1 - 3 N-koncových aminokyselinových zbytcích.

Funkční poločas *in vivo* závisí například na molekulové hmotnosti konjugátu a počet vazebných skupin nezbytných pro poskytnutí zvýšeného poločasu tedy závisí na molekulové hmotnosti příslušné nepolypeptidové části. V jednom provedení má konjugát podle vynálezu molekulovou hmotnost alespoň 67 kDa, zvláště alespoň 70 kDa při měření metodou SDS-PAGE podle Laemmli, U. K., Nature, díl 227 (1970), str. 680 - 85. IFNG má molekulovou hmotnost v rozmezí přibližně 34 až 50 kDa, a proto se pro dosažení požadovaného účinku musí dodat přibližně 20 až 40 kDa. Ty mohou být například poskytnuty 2 až 4 molekulami PRG o molekulové hmotnosti 10 kDa nebo jinak, jak bude popsáno dále.

V konjugátu podle vynálezu je výhodné, jestliže je alespoň přibližně 50 % veškerých konjugovatelných vazebných skupin, jako je alespoň 80 % a s výhodou všechny takové skupiny, obsazeno příslušnou nepolypeptidovou částí. Ve výhodném provedení tedy obsahuje konjugát podle vynálezu například 1 až 10 nepolypeptidových částí, jako například 2 až 8 nebo 3 až 6.

Jak bylo uvedeno výše, za fyziologických podmínek existuje IFNG ve formě dimerního polypeptidu. Podle vynálezu je polypeptidová část IFNG konjugátu podle vynálezu normálně v homodimerní formě (například připravená spojením dvou molekul polypeptidu IFNG připravených podle popisu uvedeného v přihlášce). Je však vhodné, jestliže polypeptidová část IFNG konjugátu podle vynálezu je ve formě jediného řetězce, kde dva monomery polypeptidu IFNG jsou spojeny peptidovou vazbou nebo peptidovou propojovací skupinou. Poskytnutí polypeptidu IFNG ve formě jediného řetězce má výhodu, že dva polypeptidy IFNG, které jsou jeho součástí, mohou být odlišné, což může například umožňovat asymetrickou mutagenezi polypeptidů. Z vazebného místa pro receptor na jednom z monomerů mohou být například odstraněna PEGylační místa, která mohou být zachována na druhém monomeru. Tím má po PEGylaci jeden monomer intaktní vazebné místo pro receptor, zatímco druhý může být úplně PEGylován (a tím poskytnout podsttně vyšší molekulovou hmotnost).

Konjugát podle vynálezu má s výhodou jednu nebo více z následujících zlepšených vlastností:

1) zvýšený funkční poločas *in vivo* ve srovnání s huIFNG nebo rhuIFNG, například zvýšení přibližně alespoň pětkrát, jako je alespoň desetkrát nebo ještě vyšší;

2) sníženou imunogenicitu ve srovnání s huIFNG nebo rhuIFNG, například snížení o alespoň 25 %, jako je alespoň 50 % a výhodněji alespoň 75 %.

27.05.02

Konjugát podle vynálezu, ve kterém nepolypeptidovou částí je cukerná část

Ve výhodném provedení konjugátu podle vynálezu je první nepolypeptidovou částí cukerná skupina, například O- nebo N-navázaná cukerná skupina, a polypeptid IFNG obsahuje alespoň jedno odstraněné a/nebo alespoň jedno zavedené místo glykosylace *in vivo*.

Místo glykosylace *in vivo* se například zavede do polohy rodičovského polypeptidu IFNG obsazené aminokyselinovým zbytkem vystaveným na povrchu polypeptidu, s výhodou s více než 25 % postranního řetězce vystavenými rozpouštědlu, zvláště více než 50 % vystavenými rozpouštědlu (tyto polohy jsou definovány v části Metody, dále. Místo N-glykosylace se zavede takovým způsobem, že v uvedené poloze je umístěn N-zbytek tohoto místa. Analogicky je místo O-glykosylace zavedeno tak, že v uvedené poloze je umístěn zbytek S- nebo T- vytvářející toto místo. Pro zajištění účinné glykosylace je navíc výhodné, aby místo glykosylace *in vivo*, zvláště zbytek N místa N-glykosylace nebo zbytek S nebo T místa O-glykosylace bylo umístěno uvnitř 118 N-koncových aminokyselinových zbytků polypeptidu IFNG, výhodněji v rámci 93 N-koncových aminokyselinových zbytků. Ještě výhodněji je místo glykosylace *in vivo* zavedeno do polohy, kde pro vytvoření tohoto místa je nezbytná pouze jedna mutace (tj. kde jsou již v molekule přítomny jakékoli další aminokyselinové zbytky nezbytné pro vytvoření funkčního glykosylačního místa).

Například substituce, která vedla k zavedení dalšího N-glykosylačního místa v polohách vystavených na povrchu polypeptidu IFNG a obsazených aminokyselinovými zbytky, které mají více než 25 % postranního řetězce vystavených na povrchu (ve struktuře s molekulou receptoru) zahrnují:

27.05.02

Q1N+P3S/T, P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, E9N+L11S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, Y14N+N16S/T, G18S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40T, E39N+D41S/T, S40N+R42S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, K61N+D63S/T, D62N+Q64S/T, D63N, D63N+S65T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, Q67N, Q67N+S69T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, T72N+K74S/T, K74N+D76S/T, E75N+M77S/T, K80S/T, V79N+F81S/T, K80N+F82S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K87S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, D90N+F92S/T, E93N+L95S/T, K94N, K94N+T96S, S99N, S99N+T101S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T, Q106S/T, E119N, E119N+S121T, P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, T126N+K128S/T, G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T, K130N, K130N+S132T, R131N+Q133S/T, S132N+M134S/T, Q133N+L135S/T, M134N+F136S/T, L135N+R137S/T, F136N+G138S/T, R137N+R139S/T, G138N+R140S/T, R139N+A141S/T, R140N a R140N+S142T, přičemž substituce se uvádějí vzhledem k huIFNG s aminokyselinovou sekvencí uvedenou v SEQ ID No. 2. S/T znamená substituci na serin nebo threonin, s výhodou na threonin.

Substituce, které vedou k zavedení dalšího N-glykosylačního místa v částech vystavených na povrchu polypeptidu IFNG, které mají více než 50 % postranního řetězce vystavených na povrchu (ve struktuře s molekulou receptoru) zahrnují:

P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, G18S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40S/T, E39N+D41S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, D62N+Q64S/T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, E75N+M77S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, K94N, K94N+T96S, S99N, S99N+T101S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T,

27.05.02

Q106S/T, P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, T126N+K128S/T, G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T, K130N, K130N+S132T, R131N+Q133S/T, S132N+M134S/T, Q133N+L135S/T, M134N+F136S/T, L135N+R137S/T, F136N+G138S/T, R137N+R139S/T, G138N+R140S/T, R139N+A141S/T, R140N a R140N+S142T, kde substituce se uvádějí vzhledem k huIFNG s aminokyselinovou sekvencí ukázanou v SEQ ID No. 2.

Substituce, kde je pro zavedení N-glykosylačního místa nutná pouze jedna mutace aminokyseliny, zahrnují K12S/T, G18S/T, G18N, K37S/T, E38N, M45N, I49N, K61S/T, D63N, Q67N, V70N, K80S/T, F82N, N85S/T, K87S/T, K94N, S99N, Q106S/T, E119N, A124N, K130N a R140N, zvláště K12S/T, G18N, G18S/T, K37S/T, E38N, K61S/T, D63N, Q67N, K80S/T, N85S/T, K94N, S99N, Q106S/T, A124N, K130N a R140N (polohy s více než 25 % postranního řetězce vystavenými na povrchu (ve struktuře bez molekuly receptoru) nebo výhodněji G18N, E38N, D63N, Q67N, K94N, S99N, A124N, K130N a R140N (s více než 50 % postranního řetězce vystvenými na povrchu ve struktuře bez molekuly receptoru).

Z výše uvedeného seznamu substitucí je výhodné volit substituce umístěné v oblasti 118 N-koncových aminokyselinových zbytků, zvláště v rámci 93 N-koncových aminokyselinových zbytků.

Jak je uvedeno výše, navíc k jednomu nebo více zavedeným glykosylačním místům mohou být z polypeptidu IFNG odstraněna existující glykosylační místa. Například jakákoli z výše uvedených substitucí pro zavedení glykosylačního místa může být kombinována se substitucí pro odstranění jakéhokoli z dvou přírodních N-glykosylačních míst huIFNG. Polypeptid IFNG může například obsahovat substituci N25 a/nebo N97, například jednu ze substitucí N25K/C/D/E a/nebo N97K/C/D/E, jestliže konjugát podle vynálezu

obsahuje nepolypeptidový polypeptid, který jako vazebnou skupinu obsahuje příslušné zbytky K, C, D, E.

Část polypeptidu IFNG konjugátu podle vynálezu může obsahovat jediné glykosylační místo *in vivo* na monomer. Aby se však dosáhlo dostatečné velikosti pro zvýšení funkčního poločasu *in vivo*, je často žádoucí, aby polypeptid obsahovat více než jedno glykosylační místo *in vivo*, zvláště 2 až 7 glykosylačních míst *in vivo*, jako jsou 2, 3, 4, 5, 6 nebo 7 glykosylačních míst *in vivo*. Polypeptid IFNG může obsahovat jedno další glykosylační místo na monomer nebo může obsahovat dvě, tři, čtyři, pět, šest, sedm nebo více zavedených glykosylačních míst *in vivo*, s výhodou zavedených jednou nebo více substitucemi popsanými v jakémkoli z výše uvedených seznamů.

Odstranění a/nebo zavedení glykosylačních míst *in vitro* může být dosaženo podle popisu v následujících částech na modifikaci polypeptidu IFNG pro zavedení a/nebo odstranění vazebných míst polymeru.

Každý z glykosylovaných polypeptidů IFNG popisovaných v této části, který má odstraněné a/nebo zavedené alespoň jedno glykosylační místo, by dále mohl být konjugován ke druhé nepolypeptidové části. Například druhá nepolypeptidová část je molekula polymeru jako je PEG nebo jakákoli jiná další nepolypeptidová část. K tomuto účelu může být konjugace dosaženo použitím vazebných skupin, které jsou již v polypeptidu IFNG přítomny, nebo mohou být vazebné skupiny zavedeny a/nebo odstraněny, zvláště tak, že pro konjugaci je k dispozici celkem 1 až 6, zvláště 3 až 4 nebo 1, 2, 3, 4, 5 nebo 6 vazebných skupin. V konjugátu podle vynálezu, kde polypeptid IFNG obsahuje dvě glykosylační místa, se počet a molekulová hmotnost nepolypeptidové části s výhodou volí tak, že celková molekulová hmotnost přidaná nepolypeptidovou částí je v rozmezí 20 až 40 kDa, zvláště přibližně 20 kDa nebo 30 kDa.

27.05.02

Glykosylovaný polypeptid IFNG může být konjugován zvláště k polymeru, který jako vazebnou skupinu obsahuje cystein. K tomuto účelu se do polypeptidu IFNG vloží jeden nebo více cysteinových zbytků, například jak se popisuje v části nazvané „Konjugát podle vynálezu, kde nepolypeptidová část je molekula obsahující cystein jako vazebnou skupinu".

Alternativně nebo navíc může být glykosylovaný polypeptid IFNG konjugován s polymerem, který má jako vazebnou skupinu lysin. K tomuto účelu může být odstraněn jeden nebo více lysinových zbytků rodičovského polypeptidu, například jakoukoli ze substitucí uvedených v části nazvané „Konjugát podle vynálezu, kde nepolypeptidovou částí je molekula obsahující jako vazebnou skupinu lysin". Alternativně nebo navíc může být zaveden lysinový zbytek, například jakoukoli substitucí uvedenou ve zmíněné části.

Alternativně ke konjugaci polymeru přes skupinu cysteinu nebo lysinu může být konjugace dosaženo přes skupinu kyseliny, jak se popisuje v části nazvané „Konjugace podle vynálezu, kde nepolypeptidová část se váže na skupinu kyseliny", nebo prostřednictvím jakékoli jiné vhodné skupiny.

Konjugát podle vynálezu, kde první nepolypeptidovou částí je polymer

V alternativním provedení je první nepolypeptidovou částí polymer, například kterýkoli z polymerů popsaný v části nazvané „Konjugace na molekulu polymeru", zvláště přímá nebo rozvětvená molekula PEG, která jako vazebnou skupinu obsahuje například cystein, lysin, kyselinu asparagovou a kyselinu glutamovou. Zavedení a/nebo odstranění vazebných skupin pro takový polymer je ukázáno v následujících částech. Část polypeptidu IFNG konjugátu podle tohoto provedení může být glykosylovaný polypeptid, například využívající jedno nebo obě přírodní N-glykosylační místa huIFNG nebo

27.05.02

zavedené glykosylační místo, jak se popisuje v bezprostředně předcházející části.

Konjugát podle vynálezu, kde nepolypeptidovou částí je molekula obsahující jako vazebnou skupinu cystein

Ve výhodném provedení je první nepolypeptidová část polymer, který má cystein jako vazebnou skupinu, a do polohy polypeptidu IFNG, která je u lidského IFNG standardního typu obsazena aminokyselinovým zbytkem vystaveným na povrchu, je zaveden alespoň jeden cysteinový zbytek. Cysteinový zbytek se s výhodou zavádí v souladu s obecnými požadavky na zavádění a/nebo odstraňování vazebných skupin pro nepolypeptidovou část uvedenými v části nazvané „Konjugát podle vynálezu". Polypeptid IFNG může například obsahovat alespoň jednu substituci zvolenou ze skupiny P3C, K6C, N10C, K13C, N16C, D21C, N25C, G26C, G31C, K34C, K37C, E38C, E39C, K55C, K58C, N59C, D62C, Q64C, S65C, K68C, E71C, E75C, N83C, S84C, K86C, K87C, K94C, N97C, S99C, T101C, D102C, L103C a N104C (zavedení cysteinového zbytku v poloze, která je obsazena aminokyselinovým zbytkem, u kterého více než 50 % postranního řetězce je vystaveno na povrchu ve struktuře s receptorem). Substituce N25C a N97C jsou zvláště zajímavé, zejména substituce N25C+N97C, jestliže polypeptid IFNG je exprimován v neglykosylující hostitelské buňce jako je *E. coli*, protože N25 a N97 tvoří část vlastního glykosylačního místa huIFNG.

Také nebo alternativně může polypeptid IFNG podle tohoto provedení obsahovat alespoň jeden cysteinový zbytek zavedený do polohy obsazené kterýmkoli z aminokyselinových zbytků 121 až 143 huIFNG.

Polypeptid IFNG konjugátu podle tohoto provedení obsahuje s výhodou celkem 1 až 8, jako je 2 až 6 zbytků Cys, například 1 až 3 zbytky Cys na monomer.

27.05.02

Konjugace mezi polypeptidem a polymerem může být dosažena jakýmkoli vhodným způsobem, například jak se popisuje v části nazvané „Konjugace s molekulou polymeru", například použitím jednostupňové metody nebo vícestupňovým způsobem, jak bude uvedeno v příslušné části. Jestliže konjugát obsahuje dvě nebo více první nepolypeptidové skupiny, každá z těchto skupin má normálně molekulovou hmotnost 5 nebo 10 kDa. Vhodný polymer je VS-PEG.

Konjugát podle vynálezu, kde nepolypeptidovou částí je molekula obsahující jako vazebnou skupinu lysin

Podle tohoto provedení je nepolypeptidovou částí polymer obsahující jako vazebnou skupinu lysin a polypeptid IFNG je modifikován tak, že je odstraněn alespoň jeden lysinový zbytek, kde lysinový zbytek je zvolen ze skupiny K6, K12, K13, K34, K37, K43, K55, K58, K61, K68, K74, K80, K86, K87, K88, K94, K108, K125, K128 a K130, přičemž číslování se provádí vzhledem k SEQ ID No. 2. Výhodněji je odstraněn alespoň jeden lysinový zbytek zvolený ze skupiny K12, K34, K37, K108, K128 a K130. Tím je možno zabránit konjugaci tohoto nebo těchto zbytků. Lysinový zbytek nebo zbytky mohou být nahrazeny jakýmkoli jiným zbytkem aminokyseliny, ale s výhodou jsou nahrazeny argininem nebo glutaminem.

Polypeptid IFNG může být navíc modifikován tak, aby do něj byl zaveden jeden nebo více lysinových zbytků, zvláště v poloze huIFNG obsazené zbytkem aminokyseliny vystaveným na povrchu. Lysinový zbytek se s výhodou zavádí v souladu s obecnými požadavky pro zavádění a/nebo odstraňování vazebných skupin pro nepolypeptidovou část uvedenými v části nazvané „Konjugát podle vynálezu", zvláště v poloze, která je obsazena aminokyselinovým zbytkem, u kterého je na povrchu vystaveno alespoň 25 %, jako je alespoň 50 % postranního řetězce (tyto polohy jsou identifikovány v části Materiály a metody). Alespoň jeden lysinový zbytek může být také zaveden substitucí

jakéhokoli aminokyselinového zbytku 121 až 143 SEQ ID No. 2. Alternativně může polypeptid IFNG obsahovat lysin v alespoň jedné poloze zvolené ze skupiny D2, E7, E9, H19, D21, D24, N25, E38, E39, D41, R42, D62, D63, E71, E75, D76, R89, D90, D91, E93, N97, R107, H111, E112, E119, R129, R131, R137, R139 a R140 SEQ ID No. 2 (polohy, které jsou u huIFNG obsazeny N, R, D, E nebo H).

Podle tohoto provedení obsahuje polypeptid IFNG substituci v jedné nebo více z výše uvedených poloh, zvláště v 1 až 15, jako 1 až 8 nebo 2 až 8 s výhodou 1 až 5 nebo 2 až 5 polohách (odstranění a/nebo zavedení lysinových zbytků) na monomer. Polypeptid IFNG může být například obsahovat substituci v 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 nebo 15 výše uvedených polohách. Substituce N25K a N97K jsou zvláště zajímavé, zejména N25K+N97K, jestliže je polypeptid IFNG exprimován v neglykosylující hostitelské buňce jako je *E. coli*, protože N25 a N97 tvoří část vlastního glykosylačního místa huIFNG.

Například polypeptid IFNG konjugátu podle tohoto provedení může obsahovat alespoň jednu z výše uvedených substitucí pro zavedení lysinového zbytku v kombinaci s alespoň jednou substitucí odstraňující lysinový zbytek jak je definováno výše (s výhodou substitucí na R nebo Q). Například polypeptid IFNG obsahuje alespoň jednu z následujících substitucí N25K a N97K v kombinaci s alespoň jednou ze substitucí K128R, K128Q, K130R a K130Q. Ještě konkrétněji, polypeptid IFNG obsahuje substituci N25K+K128R, N25K+K130R, N25K+K128R+K130R, N97K+K128R, N97K+K130R, N97K+K128R+K130R, N25K+N97K+K128R+K130R, N25K+N97K+K128R a N25K+N97K+K130R. I když může být nepolypeptidová část konjugátu podle tohoto provedení vynálezu jakákoli molekula, která s použitím daného způsobu konjugace obsahuje jako vazebnou skupinu lysin (jako je cukerná část, lipofilní skupina nebo organické derivatizační činidlo), je výhodné, jestliže je nepolypeptidovou částí molekula polymeru. Molekula polymeru může

být jakákoli z molekul uvedených v části nazvané „konjugace s molekulou polymeru“, ale s výhodou se volí ze skupiny přímého nebo rozvětveného polyethylenglykolu nebo polyalkylenoxidu. Nejvýhodněji je molekulou polymeru SS-PEG, NPC-PEG, aldehyd-PEG, mPEG-SPA, mPEG-SCM nebo mPEG-BTC firmy Shearwater Polymers Inc., SC-PEG firmy Enzon Inc., tresylovaný mPEG popisovaný v US 5,880,255 nebo oxykarbonyl-oxy-N-dikarboxyimid-PEG (US 5,122,614). Pro konjugaci s lysinovým zbytkem má nepolypeptidová část obvykle molekulovou hmotnost přibližně 5 nebo 10 kDa.

Konjugát podle vynálezu, kde se nepolypeptidová část váže na skupinu kyseliny

V ještě dalším provedení je nepolypeptidová část konjugátu podle vynálezu molekula, která má jako vazebnou skupinu skupinu kyseliny, a polypeptid IFNG obsahuje aminokyselinovou sekvenci odlišnou od aminokyselinové sekvence ukázané v SEQ ID No. 2 tím, že alespoň jeden aminokyselinový zbytek vystavený na povrchu byl substituován zbytkem kyseliny asparagové nebo kyseliny glutamové, s výhodou v souladu s obecnými podmínkami uvedenými v části s názvem „Konjugát podle vynálezu“. Alternativně může být zbytek Asp nebo Glu zaveden do polohy rodičovského polypeptidu IFNG obsazené K, R, Q nebo N. Například N25, N97, K125, K128, R129, K130 a/nebo R131, výhodněji N25 a/nebo N97, nejvýhodněji N25+N97 mohou být substituovány zbytkem Asp nebo Glu.

Analogicky s tím, co bylo popsáno v předcházejících částech, může být jeden nebo více zbytků Asp nebo Glu odstraněno, například z vazebného místa pro receptor v případě, že se nepolypeptidová část váže na tyto zbytky.

I když může být nepolypeptidová část konjugátu podle tohoto provedení vynálezu, která jako vazebnou skupinu obsahuje skupinu kyseliny, jakákoli nepolypeptidová část s touto vlastností,

v současnosti je výhodné, jestliže je nepolypeptidovou částí molekula polymeru nebo organického derivatizačního činidla, zvláště molekula polymeru, a konjugát se připravuje například podle popisu v Sakan a Pardridge, Pharmaceutical Research, díl 14, No. 8, 1997, str. 1085 - 1091.

Nepolypeptidová část konjugátu podle vynálezu

Jak již bylo uvedeno výše, nepolypeptidová část konjugátu podle vynálezu se s výhodou volí ze skupiny molekuly polymeru, lipofilní sloučeniny, cukerné části (například pomocí glykosylace *in vivo*) a organického derivatizačního činidla. Všechny tyto látky mohou polypeptidové části konjugátu propůjčovat požadované vlastnosti, zvláště zvýšený funkční poločas *in vivo* a/nebo sníženou imunogenicitu. Polypeptidová část konjugátu se normálně konjuguje pouze k jednomu typu nepolypeptidové části, ale může být také konjugována s dvěma nebo více různými typy nepolypeptidových částí, například s molekulou polymeru a cukernou částí, lipofilní skupinou a cukernou částí, organickým derivatizačním činidlem a cukernou částí, lipofilní skupinou a molekulou polymeru apod. Konjugace dvou nebo více různých nepolypeptidových částí se může provádět současně nebo postupně.

Způsoby přípravy konjugátu podle vynálezu

V následujících částech „Konjugace s lipofilní sloučeninou“, „Konjugace s molekulou polymeru“, „Konjugace s cukernou částí“ a “Konjugace s organickým derivatizačním činidlem“ se popisují konjugace se specifickými typy nepolypeptidových částí.

Konjugace s lipofilní sloučeninou

Polypeptid a lipofilní sloučenina mohou být vzájemně konjugovány buď přímo nebo použitím propojovací skupiny (linkeru). Lipofilní sloučeninou může být sloučenina, která se vyskytuje v přírodě, jako je nasycená nebo nenasycená mastná kyselina, diketon mastné kyseliny, terpen, prostaglandin, vitamin, karotenoid nebo steroid, nebo syntetická sloučenina jako je kyselina uhličitá, alkohol, amin a sulfonová kyselina s jednou nebo více alkylovými, arylovými nebo alkenylovými substituenty, nebo jiné vícenásobně nenasycené sloučeniny. Konjugace mezi polypeptidem a lipofilní sloučeninou, popřípadě přes propojovací skupinu, může být provedena způsoby známými v oboru, například jak se popisuje v Bodanszky v Peptide Synthesis, John Wiley, New York, 1976 a ve WO 96/12505.

Konjugace s molekulou polymeru

Molekula polymeru pro vazbu na polypeptid může být jakákoli vhodná molekula polymeru, jako je přírodní nebo syntetický homopolymer nebo heteropolymer, typicky s molekulovou hmotností v rozmezí 300 až 100 000 Da, jako je 300 až 20 000 Da, výhodněji v rozmezí 500 až 10 000 Da, ještě výhodněji v rozmezí 500 až 5000 Da.

Mezi příklady homopolymerů patří polyol (tj. poly-OH), polyamin (tj. poly-NH_2) a polykarboxylová kyselina (tj. poly-COOH). Heteropolymer je takový polymer, který obsahuje jednu nebo více různých vazebných skupin, jako je například hydroxylová skupina a aminová skupina.

Mezi příklady vhodných molekul polymeru patří molekuly polymeru zvolené ze skupiny zahrnující polyalkylenoxid (PAO), včetně polyalkylenglykolu (PAG), jako je polyethylenglykol (PEG) a polypropylenglykol (PPG), rozvětvené PEG, polyvinylalkohol (PVA),

27.05.02

polykarboxylát, poly(vinylpyrolidon), kopolymer polyethylenu s anhydridem kyseliny maleinové, kopolymer polystyrenu s anhydridem kyseliny maleinové, dextran včetně karboxymethyldextranu nebo jakýkoli jiný biopolymer vhodný pro snížení imunogenicity a/nebo zvýšení funkčního poločasu *in vivo* a/nebo poločasu v séru. Další příklad molekuly polymeru je lidský albumin nebo jiný protein, který se v hojném množství vyskytuje v plasmě. Obecně jsou polymery odvozené od polyalkylenglykolu biologicky kompatibilní, netoxické, neantigenní, neimunogenní, mají různé vlastnosti z hlediska rozpustnosti ve vodě a snadno se z živých organismů vylučují.

PEG je pro použití v předkládaném vynálezu výhodný polymer, protože obsahuje pouze malé množství rektivních skupin schopných zesítění ve srovnání například s polysacharidy jako je dextran apod. Zajímavý je zvláště monofunkční PEG, například monomethoxypolyethylenglykol (mPEG), protože podléhá poměrně jednoduchým vazebným reakcím (pro konjugaci s vazebnými skupinami na polypeptidu je k dispozici pouze jedna reaktivní skupina). V důsledku toho je odstraněno riziko zesítění, získané polypeptidové konjugáty jsou homogennější a reakci molekul polymeru s polypeptidem je možno snadněji řídit.

Pro uskutečnění kovalentní vazby molekuly nebo molekul polymeru na polypeptid musí být hydroxylové koncové skupiny molekuly polymeru v aktivované formě, tj. s reaktivními funkčními skupinami (jejich příklady zahrnují primární aminové skupiny, hydrazid (HZ), thiol, sukcinát (SUC), sukcinimidylsukcinát (SS), sukcinimidylsukcinamid (SSA), sukcinimidylpropionát (SPA), sukcinimidylkarboxymethylát (SCM), benzotriazolkarbonát (BTC), N-hydroxysukcinimid (NHS), aldehyd, nitrofenylkarbonát (NPC) a tresylát (TRES)). Vhodně aktivované molekuly polymeru jsou komerčně dostupné, například u firmy Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL, USA. Alternativně mohou být molekuly polymeru aktivovány běžnými způsoby známými v oboru, například jak se popisuje ve WO 90/13540.

27.05.02

Konkrétní příklady aktivovaných přímých nebo rozvětvených molekul polymeru pro použití v rámci předkládaného vynálezu se popisují v katalozích Shearwater Polymers, Inc., 1997 a 2000 Catalogs (Functionalized Biocompatible Polymers for Research and pharmaceuticals, Polyethylen Glycol and Derivatives, zahrnuty odkazem). Konkrétní příklady aktivovaných polymerů PEG zahrnují následující přímé PEG: NHS-PEG (např. SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG a SCM-PEG), a NOR-PEG), BTC PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO PEG, a MAL-PEG, a rozvětvené PEG jako je PEG2-NHS a sloučeniny popisované v US 5,932,462 a US 5,643,575, kde oba tyto patenty jsou zahrnuty odkazem. Použitelné molekuly polymeru a/nebo PEGylační chemické reakce se dále popisují v následujících publikacích, které jsou všechny zařazeny odkazem: US 5,824,778, US 5,476,653, WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, US 4,902,502, US 5,281,698, US 5,122,614, US 5,219,564, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO 95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, US 5,736,625, WO 98/05363, EP 809 996, US 5,629,384, WO 96/41813, WO 96/07670, US 5,473,034, US 5,516,673, EP 605 963, US 5,382,657, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 a EP 154 316.

Konjugace polypeptidu a aktivovaných molekul polymeru se provádí použitím jakékoli běžné metody, například jak se popisuje v následujících odkazech (které také popisují vhodné metody pro aktivaci molekul polymeru): Harris a Zalipsky, ed., Poly(ethyleneglycol), Chemistry and Biological Applications, AZC, Washington; R. F. Taylor, (1991), „Protein immobilisation. Fundamental and applications“, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong

27.05.02

(1992), „Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson a další, (1993), „Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, N.Y.). Odborníku v oboru bude zřejmé, že použité metody aktivace a/nebo konjugace závisejí na vazebné skupině nebo skupinách polypeptidu IFNG stejně jako na funkčních skupinách polymeru (jako například skupiny amino, hydroxyl, karboxyl, aldehyd nebo sulfhydryl). PEGylace může být zaměřena na konjugaci se všemi dostupnými vazebnými skupinami na polypeptidu (tj. takovými vazebnými skupinami, které jsou vystavené na povrchu polypeptidu) nebo může být zaměřena na specifické vazebné skupiny, například N-koncové vazebné skupiny (US 5,985,265). Konjugace může být navíc uskutečněna jednostupňově nebo ve více krocích (např. jak se popisuje ve WO 99/55377).

Bude zřejmé, že PEGylace se navrhne tak, aby se získala optimální molekula s ohledem na počet navázaných molekul PEG, velikost a formu (například zda jsou přímé nebo rozvětvené) těchto molekul, a zda jsou v polypeptidu tyto molekuly navázány. Molekulová hmotnost použitého polymeru může být například zvolena na základě požadovaného účinku, který se má dosáhnout. Jestliže je například primárním účelem konjugace získání konjugátu s vysokou molekulovou hmotností (např. pro snížení vylučování ledvinami), je obvykle žádoucí konjugovat pro získání požadované molekulové hmotnosti co nejmenší množství molekul polymeru s vysokou molekulovou hmotností. Jestliže je třeba dosáhnout vysoké míry odstínění epitopu, lze toho dosáhnout použitím dostatečně velkého počtu skupin nízkomolekulárního polymeru (například s molekulovou hmotností přibližně 5000 Da) pro účinné stínění všech nebo většiny epitopů polypeptidu. Může být například použito 2 až 8, jako je 3 až 6 takových polymerů.

V souvislosti s konjugací na pouze jedinou vazebnou skupinu na proteinu (jak se popisuje v US 5,985,265) může být výhodné, aby měla molekula polymeru, která může být přímá nebo rozvětvená, vysokou molekulovou hmotnost, například přibližně 20 kDa.

27.05.02

Normálně se konjugace polymeru provádí za podmínek vhodných pro zreagování veškerých dostupných vazebných skupin pro polymer s molekulami polymeru. Typicky je molární poměr aktivovaných molekul polymeru k polypeptidu 1000 - 1, zvláště 200 - 1, s výhodou 100 - 1, jako je 10 - 1 nebo 5 - 1, aby byla umožněna optimální reakce. Mohou být však také použity ekvimolární poměry.

Podle vynálezu se také předpokládá vazba molekul polymeru na polypeptid prostřednictvím propojovací skupiny. Vhodné propojovací skupiny jsou odborníkovi v oboru dobře známé. Výhodným příkladem je kyanurchlorid (Abuchowski a další (1977), J. Biol. Chem., 252, 3578 - 3581; US 4,179,337; Shafer a další (1986), J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed., 24, 375 - 378.

Po konjugaci se zbylé aktivované molekuly polymeru blokují způsoby známými v oboru, například přidáním primárního aminu do reakční směsi, a získané inaktivované molekuly polymeru se vhodným způsobem odstraní.

Vazba na cukernou část

Vazba cukerné části může probíhat *in vivo* nebo *in vitro*. Aby se dosáhlo glykosylace polypeptidu s aktivitou IFNG *in vivo*, kde polypeptid byl modifikován pro zavedení jednoho nebo více glykosylačních míst *in vivo* (viz část „Konjugáty podle vynálezu, kde nepolypeptidovou částí je cukerná část"), nukleotidová sekvence kódující polypeptidovou část konjugátu musí být vložena do glykosylujícího, eukaryotického expresního hostitele. Expresní hostitelská buňka může být zvolena z houbových (vláknité houby nebo kvasinky), hmyzích nebo živočišných buněk, nebo z transgenních rostlinných buněk. Glykosylace se navíc může provádět v lidském těle, jestliže se použije nukleotidová sekvence kódující polypeptidovou část konjugátu podle vynálezu nebo polypeptid podle vynálezu při genové terapii. V jednom provedení je hostitelskou buňkou savčí buňka, jako

je buňka CHO, BHK nebo HEK, například HEK293 nebo hmyzí buňka, jako je buňka SF9, nebo kvasinková buňka, například *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* nebo jakýkoli vhodný glykosylující hostitel, například jak bude popsáno dále. Cukerné části navázané na polypeptid IFNG glykosylací *in vivo* se popřípadě dále modifikují použitím glykosyltransferáz, například s použitím technologie glycoAdvance™technology, uváděné na trh firmou Neose, Horsham, PA, USA. Tak je možné například zvýšit sialyaci glykosylovaného polypeptidu IFNG po expresi a glykosylaci *in vivo* buňkami CHO.

Pro modifikaci nebo zvýšení počtu nebo pro modifikaci profilu uhlohydrátových substituentů může být použita kovalentní vazba *in vitro* glykosidů na aminokyselinové zbytky IFNG. V závislosti na použitém způsobu vazby mohou být cukr nebo cukry navázány na a) arginin a histidin, b) volné karboxylové skupiny, c) volné sulfhydrylové skupiny jako jsou skupiny cysteinu, d) volné hydroxylové skupiny jako jsou hydroxylové skupiny serinu, threoninu, tyrosinu nebo hydroxyprolinu, e) aromatické zbytky jako jsou zbytky fenylalaninu nebo tryptofanu, nebo f) amidové skupiny glutaminu. Tyto aminokyselinové zbytky jsou příklady vazebných skupin pro cukernou část, které mohou být zavedeny a/nebo odstraněny z polypeptidu IFNG konjugátu podle vynálezu. Vhodné metody vazby *in vitro* se popisují například ve WO 87/05330 a v Aplin a další, CRC Crit. Rev. Biochem., str. 259 - 306, 1981. Reakce cukerných částí *in vitro* nebo reakce PEG *in vitro* na zbytky Gln navázané na protein a peptid může být také prováděna použitím transglutaminás (TGázy), například jak se popisuje v Sato a další, 1996, Biochemistry 35, 13072 - 13080 nebo v EP 725145.

Vazba na organické derivatizační činidlo

Kovalentní modifikace polypeptidu IFNG může být prováděna reakcí vazebné skupiny nebo vazebných skupin polypeptidu

27.05.02

s organickým derivatizačním činidlem. Vhodná derivatizační činidla a metody jsou dobře známé v oboru. Například cysteinylové zbytky nejběžněji reagují s α-haloacetáty (a odpovídajícími aminy), jako je kyselina chloroctová nebo chloroacetamid, za poskytnutí karboxymethylových nebo karboxyamidomethylových derivátů. Cysteinylové zbytky se také derivatizují eakcí s bromtrifluoroacetonem, kyselinou α-bromo-β-(4-imidozoyl)propionovou, chloracetylfosfát, N-alkylmaleimidy, 3-nitro-2-pyridyldisulfidem, methyl-2-pyridyldisulfidem, p-chlormerkuribenzoátem, 2-chlormerkuri-4-nitrofenolem nebo chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolem. Histidylové zbytky se derivatizují reakcí s diethylpyrokarbonátem při pH 5,5 až 7,0, protože toto činidlo je relativně specifické pro histidylový postranní řetězec. Užitečný je také para-bromfenacylbromid; reakce se s výhodou provádí v 0,1M kakodylátu sodném při pH 6,0. Lysinylové a aminokoncové zbytky reagují s anhydridy kyseliny jantarové nebo jiných karboxylových kyselin. Derivatizace těmito látkami vede k obrácení náboje lysinylových zbytků. Mezi další vhodná reakční činidla pro derivatizaci zbytků s obsahem α-aminoskupin patří imidoestery jako je methylpikolinimidát; pyridoxalfosfát; pyridoxal; chlorborohydrid; kyselina trinitrobenzensulfonová; O-methylisourea; 2,4-pentandion; a transaminázou katalyzovaná reakce s glyoxylátem. Arginylové zbytky se modifikují reakcí s jedním nebo několika běžnými činidly, mezi která patří fenylglyoxal, 2,3-butandion, 1,2-cyklohexandion a ninhydrin. Derivatizace argininových zbytků vyžaduje, aby reakce byla prováděna za alkalických podmínek v důsledku vysoké konstanty pKa guanidinové funkční skupiny. Navíc mohou tato činidla reagovat se skupinami lysinu stejně jako s guanidinovou skupinou argininu. Karboxylové vedlejší skupiny (aspartyl nebo glutamyl) se selektivně modifikují reakcí s karbodiimidy (R-N=C=N-R'), kde R a R' jsou odlišné alkylové skupiny, jako je 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinyl-4-ethyl)--karbodiimid nebo 1-ethyl-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentyl)karbodiimid.

27.05.02

Navíc se aspartylové a glutamylové zbytky převádějí na asparaginylové a glutaminylové zbytky reakcí s amoniovými ionty.

Blokování funkčního místa

Uvádí se, že nadměrná konjugace polymeru může vést ke ztrátě aktivity polypeptidu, na který je polymer konjugován. Tento problém je možno odstranit například odstraněním vazebných skupin umístěných na funkčním místě nebo blokováním funkčního místa před konjugací. Tyto naposledy uvedené strategie tvoří další provedení vynálezu (první strategie je uvedena jako příklad dále, například odstranění lysinových zbytků, které mohou být umístěny v blízkosti funkčního místa). Podle druhé strategie se konjugace mezi polypeptidovou a nepolypeptidovou částí konkrétně provádí za podmínek, kde je funkční místo polypeptidu IFNG blokováno pomocnou molekulou, schopnou vazby na funkční místo polypeptidu. Pomocnou molekulou je s výhodou molekula, která specificky rozpoznává funkční místo polypeptidu jako je receptor. Alternativně může být pomocnou molekulou protilátka, zvláště monoklonální protilátka rozpoznávající polypeptid s aktivitou IFNG. Pomocnou molekulou může být konkrétně neutralizační monoklonální protilátka.

Polypeptid se před uskutečněním konjugace ponechá interagovat s pomocnou molekulou. To zajistí, že je funkční místo polypeptidu odstíněno nebo chráněno a tedy nedostupné pro derivatizaci nepolypeptidovou skupinou jako je polymer. Po jeho eluci z pomocné molekuly může být konjugát mezi nepolypeptidovou částí a polypeptidem izolován s alespoň částečně zachovaným funkčním místem.

Následná konjugace polypeptidu s blokovaným funkčním místem na polymer, lipofilní sloučeninu, cukernou skupinu, organické derivatizační činidlo nebo jakoukoli jinou sloučeninou se provádí

normálním způsobem, například jak se popisuje v částech výše, nazvaných „Konjugace s ...".

V dalším provedení se pomocná molekula nejprve kovalentně váže na pevnou fázi jako jsou náplně kolon, například Sephadex nebo agarózové kuličky, nebo na povrch, například reakční nádoby. Potom se polypeptid nanese na materiál kolony nesoucí pomocnou molekulu a způsoby známými v oboru se provádí konjugace, například jak se popisuje v částech výše nazvaných „Konjugace s ...". Tento postup umožní oddělení polypeptidového konjugátu od pomocné molekuly elucí. Polypeptidový konjugát se eluuje běžnými způsoby za fyzikálně-chemických podmínek, které nevedou k významnější degradaci polypeptidového konjugátu. Kapalná fáze obsahující polypeptidový konjugát se oddělí od pevné fáze, na kterou zůstává kovalentně navázaná pomocná molekula. Separaci je možno provádět jinými způsoby; například je možno derivatizovat pomocnou molekulu druhou molekulou (např. biotinem), která může být rozpoznávána specifickým vazebným činidlem (např. streptavidin). Specifické vazebné činidlo může být navázáno na pevnou fázi a tím se umožní oddělení polypeptidového konjugátu od komplexu pomocná molekula - druhá molekula převedením přes kolonu s pevnou fází s navázanou druhou pomocnou molekulou, která zachytí po následné eluci komplex pomocná molekula - druhá molekula, ale nikoli polypeptidový konjugát. Polypeptidový konjugát je možno uvolnit z pomocné molekuly jakýmkoli vhodným způsobem. Odstranění ochranné skupiny je možno provést za podmínek, při kterých pomocná molekula disociuje od funkčního místa IFNG, na které je navázána. Komplex mezi protilátkou, na kterou je polymer konjugován, a antiidiotypickou protilátkou, může být například disociován úpravou pH do kyselé nebo alkalické oblasti.

27.05.02

Konjugace se značeným polypeptidem

V alternativním provedení se polypeptid IFNG exprimuje ve formě fúzního proteinu opatřeného značkou (tag), tj. aminokyselinovou sekvencí nebo peptidovým řetězcem vytvořenými z až typicky 1 - 30, jako je 1 - 20 aminokyselinových zbytků. Kromě toho, že značka urychlí a usnadní čištění, je také vhodným nástrojem pro zajištění konjugace mezi značeným polypeptidem IFNG a nepolypeptidovou částí. Značka může být použita zvláště pro zajištění konjugace na mikrotitračních destičkách nebo jiných nosičích, jako jsou paramagnetické kuličky, na které může být značený polypeptid pomocí značky imobilizován. Konjugace se značeným polypeptidem IFNG například v mikrotitračních destičkách má výhodu v tom, že značený polypeptid může být na mikrotitračních destičkách imobilizován přímo z kultivační půdy (v podstatě bez jakéhokoli čištění) a může s ním být provedena konjugace. Tím je možno snížit celkový počet kroků (od exprese ke konjugaci). Navíc může značka fungovat jako mezerníková molekula zajišťující zlepšenou dostupnost konjugovaného imobilizovaného polypeptidu. Konjugace použitím značeného polypeptidu může probíhat s jakýmikoli nepolypeptidovými skupinami popsanými v této přihlášce, například s molekulou polymeru jako je PEG.

Identita použité specifické značky není kritická, pokud je tato značka schopná exprese s polypeptidem a je schopna imobilizace na vhodném povrchu nosného materiálu. Komerčně je dostupná celá řada vhodných značek, například od firmy Unizyme Laboratories, Dánsko. Značka může mít například jakoukoli z následujících sekvencí:

His-His-His-His-His-His

Met-Lys-His-His-His-His-His-His

Met-Lys-His-His-Ala-His-His-Gln-His-His

Met-Lys-His-Gln-His-Gln-His-Gln-His-Gln-His-Gln-His-Gln

(všechny dostupné od firmy Unizyme Laboratories, Dánsko)

nebo jakákoli z následujících:

EQKLI SEEDL (C-koncová značka popsaná v Mol. Cell. Biol. 5: 3610 - 16, 1985)

DYKDDDDK (C- nebo N-koncová značka)

YPYDVPDYA.

Protilátky proti výše uvedeným značkám jsou komerčně dostupné, například od firem ADI, Aves Lab a Research Diagnostics.

Pohodlný způsob pro použití značeného polypeptidu pro PEGylaci se uvádí v části materiály a metody níže.

Následné odštěpení značky od polypeptidu se může provést komerčně dostupnými enzymy.

Polypeptidy podle vynálezu

V dalším provedení se vynález obecně týká nových polypeptidů IFNG, které se zde popisují. Nové polypeptidy jsou důležité meziprodukty pro přípravu konjugátu podle vynálezu. Navíc mohou mít samotné tyto polypeptidy zajímavé vlastnosti.

Například nový polypeptid IFNG obsahuje alespoň jednu substituci na K, R, D, E, C, S, T nebo N aminokyselinových zbytků vystavených na povrchu, jak se podrobněji popisuje v předcházející části přihlášky.

Způsoby přípravy polypeptidu IFNG

Polypeptid IFNG, popřípadě v glykosylované formě, může být vyráběn jakoukoli vhodnou metodou známou v oboru. Mezi tyto metody patří sestavení nukleotidové sekvence kódující polypeptid a exprese této sekvence ve vhodně transformovaném nebo

27.05.02

transfekovaném hostiteli. Polypeptidy podle vynálezu však mohou být vyráběny, i když s nižší účinností, chemickou syntézou nebo kombinací chemické syntézy nebo kombinací chemické syntézy a rekombinantní technologie DNA.

Nukleotidová sekvence podle vynálezu kódující polypeptid IFNG (v monomerní nebo jednořetězcové formě) může být zkonstruována izolací nebo syntézou nukleotidové sekvence kódující rodičovský IFNG, jako je huIFNG, s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID No. 2, a potom změnou nukleotidové sekvence pro uskutečnění zavedení (tj. vložení nebo substituce) nebo delece (tj. odstranění nebo substituce) příslušného zbytku nebo zbytků aminokyselin.

Nukleotidová sekvence se vhodně modifikuje místně specifickou mutagenezí dobře známými postupy, viz např. Mark a další, „Site-specific Mutagenesis of the Human Fibroblast Interferon Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, str. 5662 - 66(1984); a US 4,588,585.

Nukleotidová sekvence se alternativně připravuje chemickou syntézou, například použitím syntezátoru oligonukleotidů, pokud jsou oligonukleotidy navrženy na základě aminokyselinové sekvence požadovaného polypeptidu, a s výhodou se zvolí takové kodony, které jsou výhodné v hostitelské buňce, ve které bude rekombinantní polypeptid produkován. Například několik malých oligonukleotidů kódujících části požadovaného polypeptidu může být syntetizováno a sestaveno pomocí PCR, ligace nebo ligační řetězové reakce (LCR). Jednotlivé oligonukleotidy typicky obsahují pro umožnění komplementárního uspořádání 5' nebo 3' překrývající se oblasti.

Jakmile je sekvence sestavena (syntézou, místně specifickou mutagenezí nebo jiným způsobem), tato sekvence kódující polypeptid se vloží do rekombinantního vektoru a operativně se spojí s řídícími sekvencemi nezbytnými pro expresi IFNG v požadované transformované hostitelské buňce.

27.05.02

Mělo by být ovšem zřejmé, že ne všechny vektory a expresní řídící sekvence fungují stejně dobře při expresi nukleotidové sekvence kódující zde popisovaný polypeptid IFNG. Rovněž všichni hostitelé nefungují stejně se stejným expresním systémem. Odborník v oboru je však schopen vybrat mezi těmito vektory, expresními řídícími sekvencemi a hostiteli bez nadměrného experimentování. Při volbě vektoru musí být například vzat v úvahu hostitel, protože vektor se v něm musí replikovat, nebo musí být schopen se integrovat do chromosomu. Počet kopií vektoru, schopnost řídit počet kopií a exprese jakýchkoli jiných proteinů kódovaných vektorem, jako jsou antibiotické markery, by se měla také brát v úvahu. Při volbě expresní řídící sekvence je třeba zvážit řadu faktorů. Patří sem například relativní síla sekvence, možnost jejího řízení a její kompatibilita s nukleotidovou sekvencí kódující polypeptid, zvláště co se týče potenciálních sekundárních struktur. Hostitelé by měli být voleni na základě jejich kompatibility s vybraným vektorem, toxicitou produktu kódovaného nukleotidovou sekvencí, jejich vlastností z hlediska sekrece, jejich schopnosti správně prostorově uspořádat polypeptid, jejich požadavků na fermentaci nebo kultivaci a snadnosti čištění produktů kódovaných nukleotidovou sekvencí.

Rekombinantním vektorem může být autonomně se replikující vektor, tj. vektor existující jako extrachromosomální jednotka, jehož replikace nezávisí na replikaci chromosomu, například plasmid. Alternativně se použije vektor, který se po zavedení do hostitelské buňky integruje do genomu hostitelské buňky a replikuje se spolu s chromosomem nebo chromosomy, do kterých se integroval.

Vektorem je s výhodou expresní vektor, ve kterém je nukleotidová sekvence kódující polypeptid IFNG operativně navázána na další segmenty nezbytné pro transkripci nukleotidové sekvence. Vektor se typicky odvozuje od plasmidové nebo virové DNA. Velký počet vhodných expresních vektorů pro expresi ve zde uváděných hostitelských buňkách je komerčně dostupný nebo popsaný

v literatuře. Mezi použitelné expresní vektory pro eukaryotické hostitele patří například vektory obsahující sekvence řídící expresi z viru SV40, bovinního papillomaviru, adenoviru a cytomegaloviru. Konkrétní vektory jsou například pCDNA3.1(+)\Hyg (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a pCI-neo (Stratagen, La Jola, CA, USA). Mezi použitelné expresní vektory pro bakteriální hostitele patří známé bakteriální plasmidy, jako jsou plasmidy z *E. coli*, včetně pBR322, pET3a a pET12a (oba od firmy Novagen Inc., WI, USA), plasmidy určené pro široké rozmezí hostitelů jako je RP4, fágové DNA, například početné deriváty fágu lambda, např. NM989, a jiné DNA fágy, jako je M13 a vláknité fágy s jednořetězcovou DNA. Mezi použitelné expresní vektory pro kvasinkové buňky patří plasmid 2 μ a jeho deriváty, vektor POT1 (US 4,931,373), vektor pJSO37 popsaný v Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782, 202 - 207, 1996 a pPICZ A, B nebo C (Invitrogen). Použitelné vektory pro hmyzí buňky zahrnují pVL941, pBG311 (Cate a další, „Isolation of the Bovinne and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene in Animal Cells", Cell, 45, str. 685 - 98 (1986), pBluebac 4.5 a pMelbac (oba dostupné u firmy Invitrogen).

Mezi další vektory pro použití v předkládaném vynálezu patří vektory umožňující amplifikaci počtu kopií nukleotidové sekvence kódující polypeptid IFNG. Tyto amplifikovatelné vektory jsou v oboru dobře známé. Patří sem například vektory schopné amplifikace působením DHFR (viz např. Kaufman, US patent No. 4,470,461, Kaufman a Sharp, „Construction Of A Modular Dihydrafolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression", Mol. Cell. Biol., 2, str. 1304 - 19 (1982)) a amplifikace glutaminsyntetázou („GS") (viz např. US 5,122,464 a EP 338,841). Rekombinantní vektor může dále obsahovat sekvenci DNA, která umožňuje replikaci vektoru v příslušné hostitelské buňce. Příkladem takové sekvence (jestliže je hostitelskou buňkou savčí buňka) je počátek replikace SV40. Jestliže je hostitelskou buňkou kvasinková

buňka, vhodné sekvence umožňující replikaci vektoru jsou replikační geny REP 1 - 3 a počátek replikace kvasinkového plasmidu 2 μ.

Vektor může také obsahovat marker umožňující selekci, například gen, jehož produkt kompenzuje defekt v hostitelské buňce, jako je gen kódující dihydrofolátreduktázu (DHFR) nebo gen TPI Schizosaccharomyces pombe (popsaný v P. R. Russell, Gene 40, 1985, str. 125 - 130), nebo takový marker, který propůjčuje odolnost na léčivo, například ampicillin, kanamycin, tetracyklin, chloramfenikol, neomycin, hygromycin nebo methotrexát. Pro vláknité houby zahrnují markery umožňující selekci amdS, pyrG, arcB, niaD, sC.

Termín „řídící sekvence" je zde definován jako zahrnující všechny složky, které jsou nutné nebo výhodné pro expresi polypeptidu IFNG. Každá řídící sekvence může být nativní nebo cizí vzhledem k sekvenci nukleové kyseliny kódující polypeptid. Mezi tyto řídící sekvence bez omezení patří vedoucí, polyadenylační sekvence, propeptidová sekvence, promotor, zesilující sekvence nebo aktivační sekvence umístěná proti směru transkripce, sekvence signálního peptidu a terminátor transkripce. Jako minimum zahrnují řídící sekvence promotor.

V předkládaném vynálezu může být použita celá řada sekvencí řídících expresi. Tyto použitelné sekvence řídící expresi zahrnují sekvence řídící expresi asociované se strukturními geny výše uvedených expresních vektorů stejně jako jakákoli sekvence, o které je známo, že řídí expresi genů prokaryotických nebo eukaryotických buněk nebo jejich virů a jejich různých kombinací.

Příklady vhodných řídících sekvencí pro směrování transkripce v savčích buňkách zahrnují rané a pozdní promotory viru SV40 a adenoviru, například hlavní pozdní promotor adenoviru 2, promotor MT-1 (metalothioneinový gen), promotor brzkého raného genu cytomegaloviru (CMV), promotor lidského elongačního faktoru 1α (EF-1α), promotor proteinu minimálního tepelného šoku 70 *Drosophila*,

promotor viru Rousova sarkomu (RSV), promotor lidského ubiquitinu C (UbC), terminátor lidského růstového hormonu, polyadenylační signály oblasti Elb viru SV40 nebo adenoviru a Kozakova konvenční sekvence (Kozak, M., J. Mol. Biol., 1987, 20. srpna; 196(4): 947 - 50).

Pro zvýšení exprese v savčích buňkách může být do 5'-nepřekládané oblasti nukleotidové sekvence kódující polypeptid IFNG vložen syntetický intron. Příkladem syntetického intronu je syntetický intron z plasmidu pCI-Neo (dostupný od firmy Promega Corporation, WI, USA).

Příklady vhodných řídících sekvencí pro směrování transkripce v hmyzích buňkách zahrnují polyhedrinový promotor, promotor P10, základní proteinový promotor polyhedrózového viru *Autographa californica*, promotor brzkého raného genu 1 bakuloviru a promotor genu 39K pozdnější rané fáze bakuloviru a polyadenylační sekvence viru SV40.

Příklady vhodných řídících sekvencí pro použití v hostitelských buňkách kvasinek zahrnují promotory kvasinkového systému α-mating, kvasinkový promotor triózafosfátisomerázy (TPI), promotory z kvasinkových glykolytických genů nebo genů alkoholdehydrogenázy, promotor ADH2 - 4c a indukovatelný promotor GAL.

Příklady vhodných řídících sekvencí pro použití v hostitelských buňkách vláknitých hub zahrnují promotor a terminátor ADH3, promotor odvozený od genů kódujících amylázatriózafosfátisomerázu nebo alkalickou proteázu *Aspergillus oryzae* TAKA, α-amylázu *A. niger* nebo glukoamylázu *A. nidulans*, acetamidázu *A. nidulans*, aspartátproteinázu nebo lipázu *Rhizomucor miehei*, terminátor TPI1 a terminátor ADH3.

Příklady vhodných řídících sekvencí pro použití v bakteriálních hostitelských buňkách zahrnují promotory systému *lac*, systému *trp*, systému *TAC* nebo *TRC* a hlavní promotorové oblasti fága lambda.

27.05.02

Nukleotidové sekvence podle vynálezu, ať už připravené místně specifickou mutagenezí, synteticky nebo jinými metodami, mohou nebo nemusí také zahrnovat nukleotidovou sekvenci kódující signální peptid. Signální peptid je přítomen, jestliže polypeptid má být sekrenován z buněk, ve kterých je exprimován. Tento signální peptid, pokud je přítomen, by měl být peptid rozpoznávaný buňkou vybranou pro expresi polypeptidu. Signální peptid může být homologní (například peptid normálně asociovaný s hulFNG) nebo heterologní (například pocházející z jiného zdroje než hulFNG) vzhledem k polypeptidu nebo může být homologní nebo heterologní vzhledem k hostitelské buňce, tj. může jít o signální peptid normálně exprimovaný z hostitelské buňky nebo peptid, který není z hostitelské buňky normálně exprimován. Signální peptid může být tedy prokaryotický, například odvozený z bakterie jako je *E. coli*, nebo eukaryotický, například odvozený ze savčí nebo hmyzí nebo kvasinkové buňky.

Přítomnost nebo nepřítomnost signálního peptidu bude například záviset na expresní hostitelské buňce použité pro produkci polypeptidu, exprimovaném proteinu (intracelulárním nebo extracelulárním), a zda je vhodné dosáhnout sekrece. Pro použití ve vláknitých houbách může být signální peptid vhodně odvozen z genu kódujícího amylázu nebo glukoamylázu Aspergillus sp., genu kódujícího lipázu nebo proteázu Rhizomucor miehei nebo lipázu Humicola lanuginosa. Signální peptid je s výhodou odvozený od genu kódujícího amylázu TAKA A. oryzae, neutrální α-amylázu A. niger, amylázu stabilní v kyselém prostředí A. niger nebo glukoamylázu A. niger. Pro použití ve hmyzích buňkách může být signální peptid vhodně odvozen od hmyzího genu (srovnej WO 90/05783), jako je prekurzor adipokinetického hormonu lepidoptery Manduca sexta (srovnej US 5,023,328), melittin včely medonosné (Invitrogen), ectysteroid UDPglukosyltransferáza (egt) (Murphy a další, Protein Expression and Purification 4, 349 - 357 (1993) nebo lidská

27.05.02

pankreatická lipáza (hpl) (Methods in Enzymology 284, str. 262 - 272, 1997).

Výhodným signálním peptidem pro použití v savčích buňkách je signální peptid hulFNG nebo signální peptid lehkého řetězce myšího Ig kappa (Coloma, M. (1992) J. Imm. Methods 152: 89 - 104). Pro použití v kvasinkových buňkách jsou vhodné signální peptidy α-faktor z *S. cerevisiae* (srovnej US 4,870,008), signální peptid myší slinné amylázy (srovnej O. Hagenbuchle a další, Nature 289, 1981, str. 643 - 646), signální peptid modifikované karboxypeptidázy (srovnej L. A. Valls a další, Cell 48, 1987, str. 887 - 897), signální peptid kvasinkového BAR1 (srovnej WO 87/02670) a signální peptid kvasinkové aspartátproteázy 3 (YAP3) (srovnej M. Egel-Mitani a další, Yeast 6, 1990, str. 127 - 137).

Pro produkci polypeptidu IFNG může být použit jakýkoli vhodný hostitel včetně bakterií, hub (včetně kvasinek), rostlinných, hmyzích, savčích nebo jiných vhodných živočišných buněk nebo buněčných linií stejně jako transgenní zvířata nebo rostliny. Mezi příklady bakteriálních hostitelských buněk patří grampozitivní bakterie jako jsou kmeny *Bacillus*, např. *B. brevis* nebo *B. subtilis*, *Pseudomonas* nebo *Streptomyces*, nebo gramnegativní bakterie, jako jsou kmeny *E. coli*. Zavedení vektoru do bakteriální hostitelské buňky se může například uskutečnit transformací protoplastů (viz např. Chang a Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111 - 115), s použitím kompetentních buněk (viz např. Young a Spizizen, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823 - 829, nebo Dubnau a Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209 - 221), elektroporace (viz např. Shigekawa a Dower, 1988, Biotechniques 6: 742 - 751), nebo konjugace (viz např. Koehler a Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5771 - 5278).

Mezi příklady vhodných vláknitých houbových hostitelských buněk patří kmeny *Aspergillus*, např. *A. oryzae*, *A. niger* nebo *A. nidulans*, *Fusarium* nebo *Trichoderma*. Buňky hub mohou být

27.05.02

transformovány procesem zahrnujícím vytvoření protoplastu, transformace protoplastů a regeneraci buněčné stěny způsobem známým v oboru. Vhodné postupy pro transformaci hostitelských buněk *Aspergillus* se popisují v EP 238 023 a US 5,679,543. Vhodné metody pro transformaci *Fusarium* species se popisují v Malardier a další, 1989, Gene 78: 147 - 156 a WO 96/00787. Kvasinky mohou být transformovány použitím postupů popsaných v Becker a Guarente, v Abelson, J. N. a Simon, M. I, ed., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, díl 194, str. 182 - 187, Academic Press, Inc., New York; Ito a další, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; a Hinnen a další, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Mezi příklady vhodných kvasinkových hostitelských buněk patří kmeny *Saccharomyces*, např. *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, jako je *P. pastoris* nebo *P. methanolica*, *Hansenula*, jako je *H. Polymorpha* nebo *Yarrowia*. Způsoby transformace kvasinkových buněk heterologní DNA a produkce heterologních peptidů z kvasinek se popisují v protokolu Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA (u produktu Yeastmaker™Yeast Tranformation System Kit), a v Reeves a další, FEMS Microbiology Letters 99 (1992) 193 - 198, Manivasakam a Schiestl, Nucleic Acids Research, 1993, díl 21, No. 18, str. 4414 - 4415 a Ganeva a další, FEMS Microbiology Letters 121 (1994) 159 - 164.

Mezi příklady vhodných hmyzích hostitelských buněk patří buněčná linie *Lepidoptora*, jako je *Spodoptera frugiperda* (Sf9 nebo Sf21) nebo buňky *Trichoplusia ni* (High Five) (US 5,077,214). Transformace hmyzích buněk a produkce heterologních polypeptidů z nich může být provedena podle popisu firmy Invitrogen.

Příklady vhodných savčích hostitelských buněk jsou buňky vaječníků čínského křečka (CHO), (např. CHO-K1; ATCC CCL-61), buněčné linie kočkodanů zelených (Aethiops sabeus) (COS) (např.

COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); myší buňky (např. NS/O), buněčné linie ledvin mláďat křečků (BHK) (např. ATCC CRL-1632 nebo ATCC CCL-10), a lidské buňky (např. HEK 293 (ATCC CRL-1573)), stejně jako rostlinné buňky ve tkáňové kultuře. Další vhodné buněčné linie jsou známé v oboru a dostupné z veřejných sbírek, jako je American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Pro expresi sialyltransferázy, například 1,6-sialyltransferázy, mohou být modifikovány také savčí buňky jako jsou buňky CHO, jak se popisuje v US 5,047,335, aby se dosáhlo zlepšené glykosylace polypeptidu IFNG.

Mezi způsoby zavádění exogenní DNA do savčích hostitelských buněk patří transfekce pomocí fosforečnanu vápenatého, elektroporace, transfekce pomocí DEAE-dextranu, transfekce pomocí liposomů, virových vektorů a transfekční metoda popsaná v Life Technologies Ltd., Paisley, UK s použitím látky Lipofectamin 2000. Tyto metody jsou v oboru dobře známé a popisují se například v Ausbel a další (ed.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA. Kultivace savčích buněk se provádějí zavedenými metodami, např. jak se popisuje v (Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, ed. Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc., Totowa, New Jersey, USA a Harrison M. A. a Rae I. F., General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997).

Pro získání glykosylovaného polypeptidu se s výhodou používá eukaryotická hostitelská buňka, například výše uvedeného typu.

Při způsobech výroby podle předkládaného vynálezu se buňky kultivují v živném médiu vhodném pro produkci polypeptidu způsoby známými v oboru. Buňka může být například kultivována na třepačkách, ferementací v malém nebo velkém měřítku (včetně kontinuálních, vsádkových, doplňovaných vsádkových fermentací nebo fermentací na pevné fázi) v laboratorních nebo průmyslových

27.05.02

fermentorech, ve vhodném médiu a za podmínek umožňujících expresi a/nebo izolaci polypeptidu. Kultivace probíhá ve vhodném živném médiu obsahujícím zdroje uhlíku a dusíku a anorganické soli s použitím způsobů známých v oboru. Vhodná média jsou dostupná od komerčních dodavatelů nebo mohou být připravena podle publikovaných předpisů (například v katalozích sbírky American Type Culture Collection). Jestliže se polypeptid vylučuje do živného média, může být izolován přímo z média. Jestliže se polypeptid nevylučuje, může být izolován z buněčných lyzátů.

Získaný polypeptid může být izolován způsoby známými v oboru. Polypeptid může být například izolován z živného média běžnými postupy včetně bez omezení centrifugace, filtrace, extrakce, rozprašovacího sušení, odpařování nebo srážení.

Polypeptidy mohou být čištěny řadou způsobů známých v oboru, včetně bez omezení chromatografie (například iontoměničová chromatografie, afinitní chromatografie, hydrofobní chromatografie, chromatografická fokusace a chromatografie typu size exclusion), elektroforetických postupů (například preparativní isoelektrická fokusace), na základě rozdílné rozpustnosti (například srážení síranem amonným), SDS PAGE, nebo extrakce (viz např. *Protein Purification*, J.-C. Janson a Lars Ryden, ed., VCH Publishers, New York, 1989). Konkrétní metody čištění polypeptidů s aktivitou IFNG se popisují v EP 110044 a japonské patentové přihlášce No. 186995/84.

Biologická účinnost polypeptidu IFNG může být tetována jakýmkoli vhodným způsobem známým v oboru. Mezi tyto testy patří neutralizace antivirové aktivity protilátkami, indukce proteinkinázy, aktivity oligoadenylát-2,5-A-syntetázy nebo fosfodiesterázy, jak se popisuje v EP 41313 B1. K těmto testům také patří imunomodulační testy (viz např. US 4,753,795), testy inhibice růstu a měření vazby na buňky exprimující receptory pro interferon. Specifické testy se popisují v části Materiály a metody, dále.

27.05.02

Vynález se navíc týká zlepšených způsobů léčení, zvláště onemocnění intersticiální plicní tkáně, ale také granulomatózních onemocnění, rakoviny, infekcí, onemocnění kostí (například poruchy metabolismu kostí jako je maligní osteopetróza) a autoimunitních onemocnění jako je revmatoidní artritida, přičemž klíčovými výhodami jsou méně časté a/nebo méně obtěžující podávání a účinnější terapie a popřípadě nižší riziko imunitních reakcí s terapeuticky účinnými sloučeninami.

Konjugát podle vynálezu se s výhodou podává ve formě prostředku obsahujícího farmaceuticky přijatelný nosič nebo pomocnou látku. „Farmaceuticky přijatelný" znamená nosič nebo pomocnou látku, který nezpůsobí žádné nežádoucí účinky u pacienta, kterému se podá. Tyto farmaceuticky přijatelné nosiče a pomocné látky jsou v oboru dobře známé (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. vydání, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer a L. Hovgaard, ed., Taylor & Francis [2000]; a Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3. vydání, A. Kibbe, ed., Pharmaceutical Press [2000]).

Konjugát podle vynálezu může být použit „jako takový" a/nebo ve formě své soli. Mezi vhodné soli patří bez omezení soli s alkalickými kovy nebo kovy alkalických zemin jako je sodík, draslík, vápník a hořčík, stejně jako například soli zinku. Tyto soli nebo komplexy mohou být přítomny jako krystalické a/nebo amorfní struktury.

Konjugát podle vynálezu se podává v dávce, která je přibližně stejná jako dávka používaná při léčení známými komerčními preparáty IFNG, jako je Actimmune nebo jak je specifikováno v EP 795332. Přesná podávaná dávka závisí na okolnostech. Normálně by měla být tato dávka schopna zabránit nebo snížit vážnost nebo šíření stavu nebo léčeného onemocnění. Odborníkům v oboru bude zřejmé, že

účinné množství konjugátu nebo prostředku podle vynálezu závisí mj. na onemocnění, dávce, schématu podávání, zda je polypeptid nebo konjugát nebo prostředek podáván samostatně nebo společně s jinými terapeutickými prostředky, poločasu v séru prostředků a celkovém zdravotním stavu pacienta.

Vynález se také týká použití a) konjugátu obsahujícího alespoň jednu nepolypeptidovou skupinu kovalentně navázanou na polypeptid IFNG, kde polypeptid IFNG je zvolen ze skupiny huIFNG, rhuIFNG nebo polypeptidu IFNG popsaného v předkládané přihlášce (tj. konjugátem je konjugát podle vynálezu), nebo b) farmaceutického prostředku podle vynálezu, pro výrobu léčiva, farmaceutického prostředku nebo částí kitu pro léčení onemocnění intersticiální plicní tkáně, rakoviny, infekcí, onemocnění kostí (například metabolické poruchy kostí jako je maligní osteopetróza) a/nebo zánětlivých onemocnění, zvláště onemocnění intersticiální plicní tkáně, zejména idiopatické plicní fibrózy. Může být také zahrnut glukokortikoid jako je prednisolon. Výhodné dávkování je 1 až 4, výhodněji 2 až 3 μg/kg hmotnosti pacienta polypeptidové složky na dávku. Výhodné dávkování je 100 až 350, výhodněji 100 až 150 μg glukokortikoidu/kg hmotnosti pacienta na dávku.

Poskytují se také zlepšené způsoby dodávání molekul nebo preparátů, popřípadě navíc obsahujících glukokortikoidy. Vynález se tako týká kitu složeného z částí, vhodného pro léčení onemocnění intersticiální plicní tkáně, který obsahuje první farmaceutický prostředek obsahující účinné složky a) nebo b) uvedené výše a druhý farmaceutický prostředek obsahující alespoň jeden glukokortikoid, každý popřípadě spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem a/nebo pomocnou látkou.

Konjugát podle vynálezu může být formulován do farmaceutických prostředků dobře známými způsoby. Vhodné

27.05.02

formulace se popisují v publikaci Remington's Pharmaceutical Sciences E. W. Martin a US 5,183,746.

Farmaceutický prostředek může být formulován v řadě forem, včetně kapaliny, gelu, lyofilizovaného materiálu, prášku, lisované pevné látky, nebo v jakékoli jiné vhodné formě. Výhodná forma bude záviset na konkrétní léčené indikaci a bude zřejmé odborníkovi v oboru.

Farmaceutický prostředek může být podáván orálně, subkutánně, intravenózně, intracerebrálně, intranazálně, transdermálně, intraperitoneálně, intramuskulárně, intrapulmonárně, vaginálně, rektálně, intraokulárně, nebo jakýmkoli jiným přijatelným způsobem, například technologií PowderJect nebo ProLease. Formulace mohou být podávány kontinuálně infuzí, ačkoli je přijatelná i jednorázová injekce, s použitím technik dobře známých v oboru, jako jsou pumpy nebo implantace. V některých případech mohou být formulace přímo aplikovány ve formě roztoku nebo spreje. Výhodný způsob podávání bude záviset na konkrétní léčené indikaci a bude zřejmý odborníkovi v oboru.

Farmaceutický prostředek podle vynálezu se může podávat spolu s jinými léčebnými látkami. Tyto látky mohou být zahrnuty jako součást stejného farmaceutického prostředku nebo mohou být podávány odděleně od polypeptidu nebo konjugátu podle vynálezu, buď současně nebo pomocí jakéhokoli jiného přijatelného léčebného schématu. Polypeptid, konjugát nebo farmaceutický prostředek podle vynálezu může být navíc použit jako doplněk dalším terapiím. Uvažují se zvláště kombinace s glukokortikoidy, jak se popisuje v EP 795332.

Parenterální prostředky

Příklad farmaceutického prostředku je roztok navržený pro parenterální podávání. I když jsou v mnoha případech farmaceutické

formulace ve formě roztoku poskytovány jako kapalina, tedy vhodné pro bezprostřední použití, tyto parenterální prostředky mohou být také poskytovány ve zmrazené nebo v lyofilizované formě. V tomto minulém případě musí být prostředek před použitím rozmrazen. Lyofilizovaná forma se často používá pro zvýšení stability účinné sloučeniny obsažené v prostředku za nejrůznějších podmínek skladování, protože odborníkům v oboru je zřejmé, že lyofilizované preparáty jsou obecně stabilnější než jejich kapalné protějšky. Tyto lyofilizované preparáty se před použitím rekonstituují přidáním jednoho nebo více vhodných farmaceuticky přijatelných ředidv, jako je sterilní voda pro injekce nebo sterilní fyziologický roztok. V případě parenterálně používaných látek se prostředky připravují pro skladování ve formě lyofilizovaných prostředků nebo vodných roztoků podle potřeby mísením polypeptidu s požadovaným stupněm čistoty s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči, pomocnými látkami nebo stabilizátory typicky používanými v oboru (všechny tyto látky se označují jako „pomocné látky"), například pufry, stabilizačními přísadami, ochrannými látkami, látkami upravujícími osmotický tlak, neiontovými detergenty, antioxidanty a/nebo jinými aditivy různých typů.

Pufrační látky napomáhají udržovat hodnotu pH v rozmezí, které se blíží fyziologickým podmínkám. Typicky jsou přítomny v koncentraci v rozmezí od přibližně 2mM do přibližně 50mM. Mezi vhodné pufrační látky pro použití v rámci předkládaného vynálezu patří jak organické a anorganické kyseliny a jejich soli, tak i citrátové pufry (například směs dihydrogencitran sodný - hydrogencitran sodný, směs kyselina citronová - citran sodný, směs kyselina citronová - dihydrogencitran sodný atd.), sukcinátové pufry (například kyselina jantarová - monosodná sůl kyseliny jantarové, kyselina jantarová - hydroxid sodný, kyselina jantarová - dvojsodná sůl kyseliny jantarové atd.), tartrátové pufry (například směs kyselina vinná - vínan sodný, směs kyselina vinná - vínan draselný, směs kyselina vinná - hydroxid sodný atd.), fumarátové pufry (například směs kyselina fumarová -

27.05.02

monosodná sůl kyseliny fumarové, směs kyselina fumarová - dvojsodná sůl kyseliny fumarové, směs monosodná sůl kyseliny fumarové - dvojsodná sůl kyseliny fumarové atd.), glukonátové pufry (například směs kyselina glukonová - glukonát sodný, směs kyselina glukonová - hydroxid sodný, směs kyselina glukonová - glukonát draselný atd.), oxalátový pufr (například směs kyselina šťavelová - šťavelan sodný, směs kyselina šťavelová - hydroxid sodný, směs kyselina šťavelová - šťavelan draselný), laktátové pufry (například směs kyselina mléčná - mléčnan sodný, směs kyselina mléčná - hydroxid sodný, směs kyselina mléčná - mléčnan draselný) a acetátové pufry (například směs kyselina octová - octan sodný, směs kyselina octová - hydroxid sodný atd.). Další možnosti jsou fosfátové pufry, histidinové pufry a trimethylaminové soli jako je tris.

Ochranné látky se přidávají pro zpomalení mikrobiálního růstu, a typicky se přidávají v množstvích přibližně 0,2 % - 1 % (hmotnost/objem). Mezi vhodné ochranné látky pro použití v rámci předkládaného vynálezu patří fenol, benzylalkohol, meta-kresol, methylparaben, propylparaben, oktadecyldimethylbenzylamonium--chlorid, benzalkoniumhalidy (např. benzalkoniumchlorid, -bromid nebo -jodid), hexamethoniumchlorid, alkylparabeny jako je methyl- nebo propylparaben, katechol, resorcinol, cyklohexanol a 3-pentanol.

Látky upravující osmotický tlak se přidávají pro zajištění isotonicity kapalných prostředků a zahrnují polyhydroxycukerné alkoholy, s výhodou trihydroxy nebo vyšší cukerné alkoholy, jako jsou glycerol, erythritol, arabitol, xylitol, sorbitol a mannitol. Polyhydroxyalkoholy mohou být přítomny v množství mezi 0,1 % a 25 % hmotnostních, typicky 1 % až 5 %, přičemž v úvahu se berou relativní množství jiných složek.

Stabilizátory označují širokou kategorii pomocných látek, které mohou mít funkci od objemotvorné látky až po aditivum, které solubilizuje terapeutický prostředek nebo napomáhá zabránit

27.05.02

denaturaci nebo přichycení na stěny nádoby. Typicky mohou být stabilizátory polyhydroxycukerné alkoholy (uvedené výše); aminokyseliny jako je arginin, lysin, glycin, glutamin, asparagin, histidin, alanin, omithin, L-leucin, 2-fenylalanin, kyselina glutamová, threonin atd., organické cukry nebo cukerné alkoholy jako je laktóza, trehalóza, stachyóza, mannitol, sorbitol, xylitol, ribitol, myoinisitol, galaktitol, glycerol apod., včetně cyklitolů jako je inositol; polyethylenglykol; polymerní aminokyseliny; redukční činidla s obsahem síry jako je thiomočovina, glutathion, kyselina thioktová, thioglykolát sodný, thioglycerol, α-monothioglycerol a thiosíran sodný; polypeptidy s nízkou molekulovou hmotností (tj. <10 zbytků); proteiny jako je lidský sérový albumin, bovinní sérový albumin, želatina nebo imunoglobuliny; hydrofilní polymery jako je polyvinylpyrrolidon; monosacharidy jako je xylóza, mannóza, fruktóza a glukóza; disacharidy jako je laktóza, maltóza a sacharóza; trisacharidy jako je rafinóza, a polysacharidy jako je dextran. Stabilizátory jsou typicky přítomny v rozmezí od 0,1 až 10 000 hmotnostních dílů, vztaženo na hmotnost účinného proteinu.

Neiontové povrchově aktivní látky nebo detergenty (známé také jako „smáčedla“) mohou být přítomny pro usnadnění solubilizace terapeutického prostředku stejně jako pro ochranu terapeutického polypeptidu proti agregaci indukované mícháním, přičemž zároveň se umožní vystavení prostředku střižnému povrchovému napětí, aniž by došlo k denaturaci polypeptidu. Vhodné neiontové povrchově aktivní látky zahrnují polysorbáty (20, 80, atd.), polyoxamery (184, 188 atd.), polyoly Pluronic®, polyoxyethylensorbitanmonoethery (Tween®-20, Tween®-80, atd.).

Mezi různé další pomocné látky patří objemotvorné látky nebo plniva (např. škrob), chelatační látky (např. EDTA), antioxidanty (např. kyselina askorbová, methionin, vitamin E) a pomocná rozpouštědla. Účinná látka může být také zachycena v mikrokapslích připravených například techniky koacervace nebo polymerací mezi rozhraními,

27.05.02

například mikrokapsle na bázi hydroxymethylcelulózy, želatiny nebo poly(methylmethakrylátu), v koloidních systémech pro dodávání léčiv (například liposomech, albuminových mikrokuličkách, mikroemulzích, nanočásticích a nanokapslích) nebo ve formě makroemulzí. Tyto techniky se popisují v publikaci Remington's Pharmaceutical Sciences, výše.

Parenterální prostředky pro použití *in vivo* musí být sterilní. Toho se snadno dosáhne například filtrací přes sterilní filtrační membrány.

Prostředky s prodlouženým uvolňováním

Vhodné příklady prostředků s prodlouženým uvolňováním zahrnují semipermeabilní matrice z pevných hydrofobních polymerů obsahující konjugát, přičemž tyto matrice mají vhodnou formu jako je film nebo mikrokapsle. Příklady matric s prodlouženým uvolňováním mohou být polyestery, hydrogely (například poly(2-hydroxy--ethylmethakrylát) nebo poly(vinylalkohol)), polylaktidy, kopolymery kyseliny L-glutamové a ethyl-L-glutamát, nedegradovatelný ethylenvinylacetát, degradovatelné kopolymery kyselina mléčná - kyselina glykolová, používané například v technologiích ProLease® nebo Lupron Depot® (injikovatelné mikrokuličky složené z kopolymeru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové a acetátu leuprolidu) a kyselina poly-D-(-)-3-hydroxymáselná. Zatímco polymery jako je ethylenvinylacetát a kyselina mléčná - kyselina glykolová umožňují dlouhodobé uvolňování molekul jako je i více než 100 dnů, některé hydrogely uvolňují proteiny po kratší časová údobí. Jestliže zapouzdřené polypeptidy zůstávají v těle dlouhodobě, mohou v důsledku vystavení vlhkosti při 37 °C denaturovat nebo agregovat, což vede ke ztrátě biologické aktivity a možným změnám imunogenních vlastností. Pro stabilizaci mohou být použity různé strategie v závislosti na zúčastněném mechanismu. Například jestliže se zjistí, že mechanismem agregace je tvorba intermolekulární vazby

S-S prostřednictvím thiodisulfidové záměny, stabilizace může být dosaženo modifikací sulfhydrylových zbytků, lyofilizací z kyselých roztoků, řízením obsahu vlhkosti, použitím vhodných aditiv a vyvinutím specifických prostředků pro polymerní matrici.

Orální podávání

Pro orální podávání může být farmaceutický prostředek v pevné nebo kapalné formě, například ve formě kapsle, tablety, suspenze, emulze nebo roztoku. Farmaceutický prostředek se s výhodou vyrábí ve formě dávkové jednotky obsahující dané množství účinné složky. Vhodná denní dávka pro člověka nebo jiného savce bude v širokých mezích záviset na stavu pacienta a jiných faktorech, ale odborník v oboru ji může určit pomocí rutinních metod.

Mezi pevné dávkové formy pro orální podávání mohou patřit kapsle, tablety, čípky, prášky a granule. V takových pevných dávkových formách může být účinná složka smíchána s alespoň jedním inertním ředivem jako je sacharóza, laktóza nebo škrob. Tyto dávkové formy mohou v normální praxi také obsahovat další látky, například kluzné látky jako je stearan hořečnatý. V případě kapslí, tablet a pilulek mohou také dávové formy obsahovat pufrační látky. Tablety a pilulky mohou být navíc připraveny s enterosolventními povlaky.

Konjugáty mohou být smíchány s pomocnými látkami jako je laktóza, sacharóza, škrobová moučka, estery celulózy s alkanovými kyselinami, kyselina stearová, talek, stearan hořečnatý, oxid hořečnatý, sodné a vápenaté soli kyseliny fosforečné a sírové, akácie, želatina, alginát sodný, polyvinylpyrrolidin, a/nebo polyvinylalkohol, a tabletovány nebo vkládány do kapslí pro běžné podávání. Alternativně mohou být rozpuštěny ve fyziologickém roztoku, vodě, polyethylenglykolu, propylenglykolu, ethanolu, olejích (jako je kukuřičný olej, podzemnicový olej, bavlníkový olej nebo sezamový

27.05.02

olej), tragakantová guma, a/nebo různé pufry. Další pomocné látky a způsoby podávání jsou v oboru farmacie dobře známy. Nosič nebo ředivo může obsahovat materiál poskytující časové zpoždění, jako je glycerylmonostearát nebo glyceryldistearát, samostatně nebo ve směsi s voskem nebo jinými materiály dobře známými v oboru.

Farmaceutické prostředky mohou být zprcovávány běžnými farmaceutickými operacemi jako je sterilizace a/nebo mohou obsahovat běžná adjuvans jako jsou ochranné látky, stabilizátory, smáčedla, emulgátory, pufry, plniva atd., například jak je popsáno v této přihlášce na jiných místech.

Kapalné dávkové formy pro orální podávání mohou zahrnovat farmaceuticky přijatelné emulze, roztoky, suspenze, sirupy a elixíry obsahující inertní řediva běžně používaná v oboru, jako je voda. Tyto prostředky mohou také obsahovat adjuvans jako jsou smáčedla, sladidla, ochucovací látky a parfemační látky.

Prostředky pro místní podávání

Prostředky vhodné pro místní podávání zahrnují kapalné nebo polokapalné prostředky vhodné pro penetraci přes kůži (například pleťová mléka, masti, krémy nebo pasty) a kapky vhodné pro podávání do oka, ucha nebo nosu.

Plicní dodávání

Formulace vhodné pro použití v nebulizéru, ať už tryskovém nebo ultrazvukovém, budou typicky obsahovat polypeptid nebo konjugát rozpuštěné ve vodě při koncentraci například přibližně 0,01 až 25 mg konjugátu na ml roztoku, s výhodou přibližně 0,1 až 10 mg/ml. formulace také může obsahovat pufr a jednoduchý cukr (například pro stabilizaci proteinu a regulaci osmotického tlaku) a/nebo lidský sérový albumin) v rozmezí koncentrací od 0,1 do 10 mg/ml.

27.05.02

Příklady použitelných pufrů jsou octan sodný, citrát a glycin. Pufr bude mít s výhodou složení a molární koncentraci vhodné pro nastavení pH roztoku v rozmezí od 3 do 9. K tomuto účelu jsou obecně vhodné molární koncentraci od 1mM do 50mM. Příklady použitelných cukrů jsou laktóza, maltóza, mannitol, sorbitol, trehalóza a xylóza, obvykle v množstvích od 1 % do 10 % hmotnostních z prostředku.

Formulace pro nebulizér může také obsahovat povrchově aktivní látku pro snížení nebo zabránění agregaci proteinu indukované povrchem, která je způsobena atomizací roztoku při tvorbě aerosolu. Mohou být použity různé běžné povrchově aktivní látky, jako jsou polyoxyethylenové estery mastných kyselin a alkoholy a polyoxyethylensorbitanové estery mastných kyselin. Množství budou typicky v rozmezí mezi 0,001 % a 4 % hmotnostními prostředku. Zvláště výhodnou povrchově aktivní látkou pro účely tohoto vynálezu je polyoxyethylensorbitanmonooleát.

Specifické formulace a způsoby tvorby vhodných disperzí kapalných částic podle vynálezu se popisují ve WO 94/20069, US 5,915,378, US 5,960,792, US 5,957,124, US 5,934,272, US 5,915,378, US 5,855,564, US 5,826,570 a US 5,522,385, které jsou tímto zařazeny odkazem.

Formulace pro použití v inhalačním zařízení s odměřovanou dávkou budou obecně obsahovat jemnozrnný prášek. Tento prášek se může vyrobit lyofilizací a potom mletím prostředku s konjugátem ve formě kapaliny a může také obsahovat stabilizátor jako je lidský sérový albumin (HSA). Typicky se přidává více než 0,5 % hmotnostních HSA. Navíc může být do prostředku v případě nutnosti přidán jeden nebo více cukrů nebo cukerných alkoholů. Příklady zahrnují laktózu, maltózu, mannitol, sorbitol, sorbitózu, trehalózu, xylitol a xylózu. Množství přidané k formulaci může být v rozmezí od přibližně 0,01 do 200 % hmotnostních, s výhodou od přibližně 1 až 50 % hmotnostních

27.05.02

přítomného konjugátu. Tyto formulace se potom lyofilizují a melou na požadovanou velikost částic.

Částice se správnou velikostí se potom suspendují v hnacím prostředku pomocí povrchově aktivní látky. Hnacím prostředkem může být jakýkoli běžný materiál používaný k tomuto účelu, jako je úplně chlorovaný a fluorovaný uhlovodík, chlorovaný a fluorovaný uhlovodík, fluorovaný uhlovodík nebo uhlovodík, včetně trichlorfluormethanu, dichlordifluormethanu, dichlortetrafluorethanolu a 1,1,1,2-tetra--fluorethanu, nebo jejich kombinací. Mezi vhodné povrchově aktivní látky patří sorbitantrioleát a sojový lecithin. Jako povrchově aktivní látka může být také použita kyselina olejová. Tato směs se potom vloží do dodávacího zařízení. Příkladem komerčně dostupného inhalátoru s odměřovanou dávkou vhodného pro použití při předkládaném vynálezu je zařízení Ventolin metered dose inhaler, vyráběný firmou Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.

Formulace pro inhalátory prášku budou obsahovat jemnozrnný suchý prášek s obsahem konjugátu a mohou také obsahovat objemotvornou látku jako je laktóza, sorbitol, sacharóza nebo mannitol v množstvích, která umožní dispergaci prášku ze zařízení, např. 50 až 90 % hmotnostních z prostředku. Částice prášku budou mít aerodynamické vlastnosti v plicích odpovídající částicím s hustotou přibližně 1 g/cm^2 se středním průměrem méně než 10 μm, s výhodou mezi 0,5 a 5 μm, nejvýhodněji mezi 1,5 a 3,5 μm. Příkladem inhalátoru prášku vhodného pro použití podle vynálezu je zařízení Spinhaler powder inhaler, vyráběný firmou Fisons Corp., Bedford, Mass.

Prášky pro tato zařízení je možno vytvářet a/nebo dodávat metodami popsanými v patentech US 5,997,848, US 5,993,783, US 5,985,248, US 5,976574, US 5,922,354, US 5,785,049 a US 5,654,007.

Mechanická zařízení navržená pro dodávání terapeutických produktů do plic, zahrnují bez omezení nebulizéry, inhalátory

27.05.02

s odměřovanou dávkou a inhalátory prášku, které jsou všechny známé odborníkům v oboru. Konkrétní příklady komerčně dostupných zařízení vhodných pro provádění tohoto vynálezu jsou Ultravent nebulizer, vyráběný firmou Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; Acorn II nebulizer, vyráběný firmou Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; Ventolin metered dose inhaler, vyráběný firmou Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; Spinhaler powder inhaler, vyráběný firmou Fisons Corp., Bedford, Massachusetts; zařízení „standing cloud" firmy Inhale Therapeutic Systems, Inc., San Carlos, California; zařízení AIR inhaler vyráběné firmou Alkermes, Cambridge, Massachusetts; a zařízení AERx pulmonary drug delivery system, vyráběné firmou Aradigm Corporation, Hayward, California.

Vynález poskytuje prostředky a působy pro léčení bakteriálních a virových infekcí, rakovin nebo tumorů, onemocnění intersticiální plicní tkáně jako je idiopatická plicní fibróza, granulomatózních onemocnění, onemocnění kostí (například metabolických poruch kostí jako je maligní osteopetróza) a autoimunitních onemocnění jako je revmatoidní artritida.

V dalším provedení se vynález týká způsobu léčení savce, u kterého se vyskytují cirkulující protilátky proti huIFNG nebo rhuIFNG, kde tento způsob zahrnuje podávání sloučeniny s biologickou aktivitou IFNG, která nereaguje s uvedenými protilátkami. Tato sloučenina je s výhodou konjugát popisovaný v této přihlášce a savcem je s výhodou člověk. Léčený savec může trpět jakýmkoli onemocněním uvedeným výše, na které IFNG účinkuje. Vynález se navíc týká způsobu výroby farmaceutického produktu pro použití při léčení savců, u kterých se vyskytují cirkulující protilátky proti huIFNG nebo rhuIFNG, kde sloučenina, která má biologickou aktivitu IFNG a která nereaguje s uvedenými protilátkami, se formuluje do injekčního nebo jiného vhodného prostředku. Termín „cirkulující protilátky" má označovat vlastní protilátky vytvořené u savce jako reakce na léčení kterýmkoli komerčně dostupným preparátem IFNG.

Zahrnuto je také použití nukleotidové sekvence kódující polypeptid IFNG podle vynálezu při genové terapii. Zajímavé může být zvláště použití nukleotidové sekvence kódující polypeptid IFNG popsaný v části uvedené výše, nazvané „Glykosylované polypeptidy podle vynálezu modifikované tak, aby obsahovaly další glykosylační místa". Glykosylace polypeptidu se tedy dosahuje v průběhu genové terapie, tj. po expresi nukleotidové sekvence v lidském těle.

Aplikace s využitím genové terapie uvažované v rámci předkládané přihlášky zahrnují léčení těch onemocnění, u kterých polypeptid poskytne podle očekávání účinné léčení.

Místní dodávání IFNG použitím genové terapie může poskytnout terapeutický prostředek do cílové oblasti s vyloučením potenciálních problémů s toxicitou v souvislosti s nespecifickým podáváním.

Jsou uvažovány metody genové terapie jak *in vitro*, tak *in vivo*.

Je známo několik metod pro přenesení potenciálně terapeutických genů do definovaných populací buněk, další informace viz např. Mulligan, „The Basic Science Of Gene Therapy", Science, 260, str. 926 - 31 (1993). K těmto metodám patří:

přímý přenos genu, například jak se popisuje v Wolff a další, „Direct Gene transfer Into Mouse Muscle *in vivo*", Science 247, str. 1465 - 68 (1990);

přenos DNA prostřednictvím liposomů (liposome-mediated DNA transfer), například jak se popisuje v Caplen a další, „Liposome-mediated CFTR Gene Transfer to the Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis" Nature Med., 3, str. 39 - 46 (1995); Crystal, „The Gene As A Drug", Nature Med., 1, str. 15 - 17 (1995); Gao a Huang, „A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection of Mammalian Cells", Biochem. Biophys. Res. Comm., 179, str. 280 - 85 (1991);

27.05.02

přenos DNA pomocí retrovirů (retrovirus-mediated DNA transfer), např. jak se popisuje v Kay a další, „*In vivo* Gene Therapy of Hemophilia B: Sustained Partial Correction in Factor IX-Deficient Dogs", Science, 262, str. 117 - 19 (1993); Anderson, „Human Gene Therapy", Science, 256, str. 808 - 13 (1992);

přenos DNA pomocí DNA viru (DNA virus-mediated DNA transfer). Mezi takové DNA viry patří adenoviry (s výhodou vektory založené na Ad-2 nebo Ad-5), herpetické viry (s výhodou vektory založené na viru herpes simplex), a parvoviry (s výhodou vektory založené na „defektním" nebo neautonomním parvoviru, výhodněji vektory založené na viru asociovaném s adenovirem, nejvýhodněji vektory založené na AAV-2), viz např. Ali a další, „The Use Of DNA Viruses as Vectors for Gene Therapy", Gene Therapy, 1, str. 367 - 84 (1994); US 4,797,368, a US 5,139,941.

Vynález se dále popisuje na následujících příkladech. Příklady by v žádném případě neměly být chápány jako omezující obecný předmět předkládané přihlášky a nároků.

Materiály a metody

Testy

Test na interferon

Již dříve bylo publikováno, že IFNG interaguje s a aktivuje receptory IFNG na buňkách HeLa. Důsledkem je, že je aktivována transkripce na promotorech obsahujících Interferon Stimulated Response Element (ISRE). Je tedy možné provádět screening na látky s agonistickým účinkem na receptory pro interferon použitím luciferázového reporterového genu navázaného na ISRE (tj. ISRE-luc) umístěného v buňkách HeLa.

27.05.02

Primární test

Buňky HeLa se kotransfekují ISRE-Luc a pCDNA 3.1/hygro a ohniska (buněčné klony) se vytvoří selekcí v médiu DMEM s obsahem hygromycinu B. Provede se screening buněčných klonů na aktivitu luciferázy v přítomnosti nebo nepřítomnosti IFNG. Klony vykazující nejvyšší poměr stimulované a nestimulované luciferázové aktivity se použití pro další testy.

Pro screening muteinů se zaočkuje 15 000 buněk/jamku do 96-jamkových kultivačních destiček, které se inkubují přes noc v médiu DMEM. Další den se k buňkám přidávají v různých koncentracích muteiny stejně jako známé standardy. Destičky se inkubují 6 hod při 37 °C v atmosféře vzduchu s 5 % CO_2. Potom se do každé jamky přidá substrát LucLite (Packard Bioscience, Groningen, Nizozemí). Destičky se uzavřou a luminiscence se měří na přístroji TopCount luminometer (Packard) v modu SPC (single photon counting). Každá jednotlivá destička obsahuje jamky inkubované s IFNG jako stimulovanou kontrolu a další jamky obsahující normální média jako nestimulovanou kontrolu. Poměr mezi stimulovanou a nestimulovanou luciferázovou aktivitou slouží jako vnitřní standard jak pro aktivitu muteinu, tak i pro výpočet variace mezi jednotlivými experimenty.

Funkční poločas *in vivo* konjugátu IFNG

Měření biologického poločasu se může provádět řadou způsobů popsaných v literatuře. Jeden způsob je popsán v Rutenfranz a další (J. Interferon Res. 1990, díl 10, str. 337 - 341), který používá intravenózní a intramuskulární injekce IFNG myším C57BL/6 starým osm týdnů. Biologický poločas byl měřen zjištěním titru IFNG v myším séru biologickým testem s použitím buněk Hep-2 a viru vezikulární stomatitidy (VVS). Jako alternativa se pro detekci hladiny IFNG v séru používá také metoda ELISA.

27.05.02

Pro studium subkutánní absorpce a lokální distribuce IFNG může být také alternativně použit radioaktivně značený IFNG. Croos a Roberts (J. Pharm., 1993, díl 45, str. 606 - 609) prováděli studie ^{125}IFNG u anestetizovaných samic krys Spraque-Dawley. Po subkutánním podání byly odebírány vzorky krve a tkáně a množství IFNG bylo zjišťováno na gama-čítači.

PEGylace IFNG

PEGylace rhuIFNG může být připravena jak je popsáno v příkladu 2 US 5,109,120. Analogicky mohou být PEGylovány zde popisované modifikované polypeptidy IFNG, které například nesou mutaci N25K. Získaný konjugát PEG-IFNG-N25K má v porovnání s konjugátem rhuIFNG navázánu další molekulu PEG.

Příprava farmaceutického prostředku

Farmaceutický prostředek, například pro léčení onemocnění intersticiální plicní tkáně, může být připraven formulací příslušného purifikovaného konjugátu podle vynálezu v injikovatelných prostředcích způsoby dobře známými odborníkům v oboru tak, aby každá lahvička obsahovala konjugát v množství 50, 100, 200, 300, 400 nebo 500 µg, např. rhuIFNG nebo IFNG-N25K.

Identifikace aminokyselinových zbytků vystavených na povrchu

Struktury

Experimentální 3D struktury huIFNG zjištěné rentgenovou krystalografií byly uvedeny v Ealick a další, Science 252: 698 - 702 (1991), přičemž označena je poloha C-alfa homodimeru IFNG. Walter a další, Nature 376: 230 - 235 (1995) uvádějí strukturu homodimeru IFNG v komplexu se dvěma molekulami rozpustné formy receptoru

IFNG. Souřadnice této struktury nebyly nikdy zveřejněny. Thiel a další, Structure 8: 927 - 936 (2000) uvádějí strukturu homodimeru IFNG v komplexu se dvěma molekulami rozpustné formy receptoru IFNG, kde třetí molekula receptoru ve struktuře neinteraguje s homodimerem IFNG.

Metody

Plocha přístupná na povrchu (Accessible Surface Area, ASA)

Pro výpočet plochy přístupné na povrchu (ASA) jednotlivých atomů ve struktuře byl použit počítačový program Access (B. Lee a F. M. Richards, J. Mol. Biol. 55: 379 - 400 (1971)) verze 2 (copyright (c) 1983 Yale University). Tato metoda typicky používá velikosti sondy 1,4 Å a definuje plochu přístupnou na povrchu (ASA) jako plochu tvořenou středem sondy. Před výpočtem se ze soustavy souřadnic odstraní všechny molekuly vody, atomy vodíku a jiné atomy, které přímo nesouvisejí s proteinem.

Poměrná ASA postranního řetězce

Poměrná ASA atomů postranního řetězce se vypočte vydělením součtu ASA atomů v postranním řetězci hodnotou reprezentující ASA atomů postranního řetězce tohoto typu zbytku v prodlouženém tripeptidu ALA-x-ALA, viz Hubbard, Campbell & Thornton (1991), J. Mol. Biol.: 220, 507 - 530. V tomto příkladu je atom CA považován za součást postranního řetězce glycinových zbytků, ale ne v případě ostatních zbytků. Následující tabulka se používá jako standardní 100% ASA pro postranní řetězec:

Ala	69,23 $Å^2$
Arg	200,35 $Å^2$
Asn	106,25 $Å^2$

Asp	102,06 Å^2
Cys	96,69 Å^2
Gln	140,58 Å^2
Glu	134,61 Å^2
Gly	32,28 Å^2
His	147,00 Å^2
Ile	137,91 Å^2
Leu	140,76 Å^2
Lys	162,50 Å^2
Met	156,08 Å^2
Phe	163,90 Å^2
Pro	119,65 Å^2
Ser	78,16 Å^2
Thr	101,67 Å^2
Trp	210,89 Å^2
Tyr	176,61 Å^2
Val	114,14 Å^2

Zbytky které nejsou ve struktuře detekovány, jsou definovány jako 100% exponované, protože se předpokládá, že se vyskytují v ohebných oblastech.

5 Zjištění vzdáleností mezi atomy

Vzdálenost mezi atomy byla zjišťována použitím softwaru pro molekulární grafiku, například InsightII v. 98.0, MSI INC.

Určení vazebného místa receptoru

Místo vazby receptoru je podle definice složeno ze všech zbytků, jejichž plocha přístupná na povrchu se změnila po vazbě receptoru. To se zjistí alespoň dvěma výpočty ASA; jeden na izolovaném ligandu nebo ligandech v komplexu ligand (ligandy)/receptor (receptory) a jeden na úplném komplexu ligand (ligandy)/receptor (receptory).

Výsledky

Použitá rentgenová struktura byla struktura homodimeru IFNG v komplexu se dvěma molekulami rozpustné formy receptoru IFNG se třetí molekulou receptoru IFNG ve struktuře nevytvářející interakce s homodimerem IFNG, jak se popisuje v Thiel a další, Structure 8: 927 - 936 (2000). Tato struktura se skládá z homodimeru IFNG, kde dvě molekuly jsou označeny jako A a B. Pro konstrukční účely je před sekvencí IFNG označené M0 umístěn další methionin a sekvence je na C-konci zkrácená o deset zbytků (poslední zbytek ve zkonstruovaných molekulách je Q133). M0 se při všech výpočtech v tomto příkladu ze struktury odstraní. Struktura dvou monomerů IFNG má za zbytkem 120 velmi slabou hustotu elektronů a model byl vytvářen pouze pro zbytky do T126. Proto byly zbytky S121-T126 před výpočty v tomto příkladu ze struktury odstraněny. Dva fragmenty receptoru značené C a D tvoří přímé interakce s homodimerem IFNG a třetí molekula receptoru označená E nevytváří žádný kontakt s homodimerem IFNG a do výpočtů se nezahrnují.

Povrchová expozice

Provedení výpočtů poměrné ASA pro homodimer molekul A a B s vyloučením M0 a S121-T126 v obou molekulách vedlo ke zjištění následujících zbytků, které mají více než 25 % svého postranního

řetězce exponováno na povrchu v alespoň jednom z monomerů. Q1, D2, P3, K6, E9, N10, K12, K13, Y14, N16, G18, H19, S20, D21, A23, D24, N25, G26, T27, G31, K34, N35, K37, E38, E39, S40, K55, K58, N59, K61, D62, D63, Q64, S65, Q67, K68, E71, T72, K74, E75, N78, V79, K80, N83, S84, N85, K86, K87, D90, E93, K94, N97, S99, T101, D102, L103, N104, H111, Q115, A118 a E119.

Následující zbytky mají v alespoň jednom z monomerů exponováno na povrchu více než 50 % svého postranního řetězce: Q1, D2, P3, K6, E9, N10, K13, N16, G18, H19, S20, D21, A23, D24, N25, G26, T27, G31, K34, K37, E38, E39, K55, K58, N59, D62, Q64, S65, K68, E71, E75, N83, S84, K86, K87, K94, N97, S99, T101, D102, L103, N104, Q115, A118, E119.

Provedením výpočtů poměrné ASA na homodimeru molekul A a B s vyloučením M0 a S121-T126 u obou molekul se zahrnutím receptorových molekul C a D byly určeny následující zbytky, které mají více než 25 % svého postranního řetězce exponovaného na povrchu v alespoň jednom z monomerů: Q1, D2, P3, K6, E9, N10, K13, Y14, N16, G18, H19, D21, N25, G26, G31, K34, N35, K37, E38, E39, S40, K55, K58, N59, K61, D62, D63, Q64, S65, Q67, K68, E71, T72, K74, E75, N78, V79, K80, N83, S84, N85, K86, K87, D90, E93, K94, N97, S99, T101, D102, L103, N104, E119. Následující zbytky měly více než 50 % svého postranního řetězce v alespoň jednom z monomerů exponovaného na povrchu: P3, K6, N10, K13, N16, D21, N25, G26, G31, K34, K37, E38, E39, K55, K58, N59, D62, Q64, S65, K68, E71, E75, N83, S84, K86, K87, K94, N97, S99, T101, D102, L103 a N104.

Všechny výše uvedené polohy jsou cíle pro modifikaci podle předkládaného vynálezu.

Porovnáním těchto dvou seznamů se ukazuje, že po vazbě receptoru se ze seznamu pro více než 25% expozici postranního řetězce metodou ASA odstraní polohy K12, S20, A23, D24, T27, H111, Q115 a A118, a ze seznamu pro více než 50% expozici postranního

řetězce metodou ASA se odstraní polohy Q1, D2, E9, G18, H19, S20, A23, D24, T27, Q115, A118 a E119.

Zbytky, které nejsou ve struktuře určeny, se považují za plně exponované na povrchu, a jsou to zbytky S121, P122, A123, A124, K125, T126, G127, K128, R129, K130, R131, S132, Q133, M134, L135, F136, R137, G138, R139, R140, A141, S142, Q143. Tyto zbytky také tvoří oddělené cíle pro zavedení vazebných skupin podle předkládaného vynálezu (nebo mohou být považovány za členy skupiny aminokyselinových zbytků exponovaných na povrchu, tj. které mají více než 25 % nebo více než 50 % exponovaných postranních řetězců).

Vazebné místo receptoru

Provedením výpočtů ASA jak bylo popsáno výše, byly určeny následující zbytky molekuly IFNG, které měly snížené hodnoty ASA v alespoň jednom z monomerů v komplexu při porovnání s výpočtem na izolovaném dimeru: Q1, D2, Y4, V5, E9, K12, G18, H19, S20, D21, V22, A23, D24, N25, G26, T27, L30, K34, K37, K108, H111, E112, I114, Q115, A118, E119.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Návrh expresní kazety pro expresi IFNG v kvasinkových buňkách a buňkách CHO

Sekvence DNA, depozitní číslo GenBank X13274, obsahující úplnou cDNA kódující zralý huIFNG bez jeho nativního signálního peptidu, byla modifikována pro dosažení vysoké exprese v kvasinkových buňkách. Nejprve byl zaveden signální peptid MATa namísto signálního peptidu IFNG s cílem umožnit sekreci do růstového

média kvasinek. Potom byly modifikovány kodony nukleotidové sekvence huIFNG, aby bylo změněno používání kodonů směrem ke kodonům, které často využívají kvasinky. Potom byly některé nukleotidy v sekvenci substituovány jinými pro zavedení rozpoznávacích míst pro restrikční endonukleázy DNA. Primery byly navrženy tak, aby mohl být gen syntetizován.

Primery byly sestaveny do syntetického genu jednostupňovou PCR použitím soupravy Platinum *Pfx*-polymerase kit (Life Technologies) a standardních parametrů cyklování třístupňové PCR. Sestavený gen byl amplifikován PCR za stejných podmínek a má sekvenci ukázanou v SEQ ID No. 3.

Syntetizovaný gen byl klonován do pJS037-lip Okkels, J. S. (1996), Rec. DNA Biotech. III, díl 782, 202 - 207) mezi místo *Hind*III a 5'-konec a místo *Xba*I na 3'-konci za získání pIGY-1.

Pro vytvoření jednořetězcového konstruktu obsahujícího kovalentně navázané monomerní polypeptidy IFNG byly vytvořeny následující tři konstrukty:

I) Konstrukt obsahující dva zralé úplné polypeptidy huIFNG navázané 19merním propojovacím peptidem vymodelovaným podle lidských pantových oblastí IgA1 (Lunn C. A. a další, J. Biol. Chem., 267, 17920 - 17924, 1992). To bylo provedeno PCR s použitím následujících primerů.

ADJ002 5'-GGTTTGATATCGATGGCCAA-3' (SEQ ID No. 4)

ADJ003 5'-GCGGCCCTCTAGATTACT-3' (SEQ ID No. 5)

ADJ004 5'-CATCTCCGTCCACTCCGACTCCATAGCATGCAAG -ATCCATATGTGA AAGAA-3' (SEQ ID No. 6)

ADJ007 5'-ATCTTGCATGCTATGGAGTCGGAGTGGACGGAG -ATGGAGTTGGC GGAGTAGAAGGAACCGCTGTTTTAGCAGC -TGGAGACAATT-3' (SEQ ID No. 7)

Fragmenty PCR byly klonovány do pIGY-1 mezi místo ClaI na 5'-konci a XbaI na 3'-konci za uspořádání těchto dvou monomerů v SphI (zavedený v oblasti linkeru). Tento konstrukt byl nazván pIGY-2.

II) Konstrukt obsahující dva monomerní zralé úplné polypeptidy hulFNG bez linkeru. K tomuto účelu byly pro PCR použity následující primery:

ADJ002 5'-GGTTTGATATCGATGGCCAA-3' (SEQ ID No. 8)

ADJ003 5'-GCGGCCCTCTAGATTACT-3' (SEQ ID No. 9)

ADJ006 5'-
TTTAGAGGTAGAAGAGCTTCTCAGCAAGATCCATA
-TGTGAAAGAAGCT-3' (SEQ ID No. 10)

ADJ009 5'-AGCTTCTTTCACATATGGATCTTGCTGAGAAGCTC
-TTCTACGTCTAAA-3' (SEQ ID No. 11)

Fragment PCR byl sestaven metodou dvoustupňové PCR a klonován mezi místa ClaI na 5'-konci a XbaI na 3'-konci pIGY-1 a nazván pIGY-3.

III) Konstrukt obsahující dva C-koncově zkrácené (alespoň o 11 aminokyselin) monomerní polypeptidy IFNG kovalentně spojené pomocí 19-merní peptidové propojovací skupiny uvedené výše. Bylo použito následujících primerů:

ADJ001 5'-TGCTCTAGACATCTGAGATCGWTTCTCTTTCC-3' (SEQ ID No. 12)

ADJ002 5'-GGTTTGATATCGATGGCCAA-3' (SEQ ID No. 13)

ADJ004 5'-CATCTCCGTCCACTCCGACTCCATAGCATGCAA
-GATCCATATGTGAAAGAA-3' (SEQ ID No. 14)

ADJ005 5'-ATCTTGCATGCTATGGAGTCGGAGTGGACGGAGA
-TGGAGTTGGCGGAGTAGAAGGAACCGGCATCTGAGATC
-TTTTTCTCC-3' (SEQ ID No. 15)

Fragmenty PCR byly klonovány do pIGY-1 mezi místo ClaI na 5'-konci a XbaI na 3'-konci za sestavení dvou monomerů v SphI (zavedeno v oblasti linkeru). Tento konstrukt byl nazván pIGY-4.

Konstrukty pro expresi v buňkách CHO

Pro expresi IFNG v buňkách CHO se syntetizuje následující oligonukleotid, aby bylo umožněno klonování IFNG včetně jeho signálního peptidu do pcDNA3.1/hygro (Invitrogen).

ADJ012 5'-CGCGGATCCATGAAATATACAAGTTATATCTTGGC
-TTTTCAGCTCTGCATCGTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTG
-CCAAGATCCATATGTGAAAGAAGCT-3' (SEQ ID No. 16)

Pro klonování IFNG do tohoto expresního vektoru poskytne amplifikace PCR použitím ADJ012 a ADJ003 a pIGY-1 jako templátu fragment 450 bp, který může být klonován mezi BamHI na 5'-konci a XbaI na 3'-konci pcDNA3.1/hygro, za poskytnutí pIGY-5.

Pro zavedení glykosylačních míst do IFNG byly navrženy oligonukleotidy takovým způsobem, že změny vytvořené PCR mohly být zavedeny do expresního plasmide (pIGY-5) klasickou dvoustupňovou PCR po klonování fragmentu PCR mezi BamHI na 5'-konci a XbaI na 3'-konci.

Proto byly navrženy dva vektorové primery pro použití se specifickými mutačními primery:

ADJ013 5'-GATGGCTGGCAACTAGAAG-3' (SEQ ID No. 17) (pozitivní vektorový primer po směru transkripce)

ADJ014 5'-TGTACGGTGGGAGGTCTAT-3' (SEQ ID No. 18) (negativní vektorový primer proti směru transkripce)

Pro různé muteiny byly navrženy následující primery:

K12T.

27.05.02

ADJ015 5'-AGCATTAAAATACTTCGTCAAGTTTTCAGC-3' (SEQ ID No. 19)

ADJ016 5'-GCTGAAAACTTGACGAAGTATTTTAATGCT-3' (SEQ ID No. 20)

G18T

ADJ017 5'-CACATCAGAATGAGTAGCATTAAAATA-3' (SEQ ID No. 21)

ADJ018 5'-TATTTTAATGCTACTCATTCTGATGTG-3' (SEQ ID No. 22)

E38N

ADJ019 5'-CATAATTTTTCGATCGGATTCGTTTTTCCAATTCTT-3' (SEQ ID No. 23)

ADJ020 5'-AAGAATTGGAAAAACGAATCCGATCGAAAAATTATG-3' (SEQ ID No. 24)

K61T

ADJ021 5'-AATAGACTGATCGTCTGTAAAGTTTTTAAA-3' (SEQ ID No. 25)

ADJ022 5'-TTTAAAAACTTTACAGACGATCAGTCTATT-3' (SEQ ID No. 26)

N85T

ADJ023 5'-TCTTTTCTTTTTAGTACTATTGAAAAACTT-3' (SEQ ID No. 27)

ADJ024 5'-AAGTTTTTCAATAGTACTAAAAAGAAAAGA-3' (SEQ ID No. 28)

K94N

ADJ025 5'-ATAATTAGTCAAATTTTCGAAGTCATG-3' (SEQ ID No. 29)

ADJ026 5'-GATGACTTCGAAAATTTGACTAATTAT-3' (SEQ ID No. 30)

S99N

27.05.02

ADJ027 5'-AATCAAGTCAGTAACGTTATAATTAGTCAA-3' (SEQ ID No. 31)

ADJ028 5'-TTGACTAATTATAACGTTACTGACTTGAAT-3' (SEQ ID No. 32)

Q106T

ADJ029 5'-ATGAATAGCTTTACTAGTCACATTCAAGTC-3' (SEQ ID No. 33)

ADJ030 5'-GACTTGAATGTGACTAGTAAAGCTATTCAT-3' (SEQ ID No. 34)

Po dvou stupních PCR a štěpení BamHI a XbaI se očekává, že každý z těchto párů primerů poskytne fragment o délce 447 bp, který může být klonován do pIGY-5.

Exprese interferonu γ v buňkách CHO

Výše uvedený konstrukt se převede do buněčné linie CHO K1 (ATCC#CCL-61) použitím materiálu Lipofectamine 2000 (Life Technologies, USA) jako transfekčního činidla. O 24 hod později se kultivační médium sklidí a provede se test na aktivitu interferonu γ a zakoncentrování.

Zastupuje:

27.05.02
PV 2002-1836
39547

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Konjugát s aktivitou IFNG, který obsahuje alespoň jednu cukernou část navázanou přes atom dusíku, kovalentně navázanou na zavedené N-glykosylační místo polypeptidu IFNG, kde polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která se liší od sekvence rodičovského polypeptidu IFNG v alespoň jednom zavedeném N-glykosylačním místě.

2. Konjugát podle nároku 1, kde rodičovským polypeptidem je lidský IFNG standardního typu neboli huIFNG nebo jeho varianta nebo fragment.

3. Konjugát podle nároku 1 nebo 2, kde zavedené N-glykosylační místo je zavedeno do polohy, která je v huIFNG obsazena aminokyselinovým zbytkem, který má na povrchu exponovaných alespoň 25 % svého postranního řetězce.

4. Konjugát podle nároku 3, kde zavedené N-glykosylační místo je zavedeno do polohy, která je v huIFNG obsazena aminokyselinovým zbytkem, který má na povrchu exponovaných alespoň 50 % svého postranního řetězce.

5. Konjugát podle nároku 3, kde zavedené N-glykosylační místo je zavedeno substitucí zvolenou ze skupiny

   Q1N+P3S/T, P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, E9N+L11S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, Y14N+N16S/T, G18S/T, G18N, G18N+S20T,

27.05.02

H19N+D21S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40T, E39N+D41S/T, S40N+R42S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, K61N+D63S/T, D62N+Q64S/T, D63N, D63N+S65T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, Q67N, Q67N+S69T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, T72N+K74S/T, K74N+D76S/T, E75N+M77S/T, K80S/T, V79N+F81S/T, K80N+F82S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K87S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, D90N+F92S/T, E93N+L95S/T, K94N, K94N+T96S, S99N, S99N+T101S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T, Q106S/T, E119N, E119N+S121T, P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, T126N+K128S/T, G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T, K130N, K130N+S132T, R131N+Q133S/T, S132N+M134S/T, Q133N+L135S/T, M134N+F136S/T, L135N+R137S/T, F136N+G138S/T, R137N+R139S/T, G138N+R140S/T, R139N+A141S/T, R140N a R140N+S142T, přičemž substituce se uvádějí vzhledem k huIFNG, jehož aminokyselinová sekvence je ukázána v SEQ ID No. 2.

6. Konjugát podle nároku 4, kde zavedené N-glykosylační místo je zavedeno substitucí zvolenou ze skupiny

P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, G18S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40S/T, E39N+D41S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, D62N+Q64S/T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, E75N+M77S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, K94N, K94N+T96S, S99N, S99N+T101S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T, Q106S/T,

P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, T126N+K128S/T, G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T, K130N, K130N+S132T, R131N+Q133S/T, S132N+M134S/T, Q133N+L135S/T, M134N+F136S/T, L135N+R137S/T, F136N+G138S/T, R137N+R139S/T, G138N+R140S/T, R139N+A141S/T, R140N a R140N+S142T, přičemž substituce se uvádějí vzhledem k huIFNG, jehož aminokyselinová sekvence je ukázána v SEQ ID No. 2.

7. Konjugát podle některého z nároků 3 až 6, kde zavedené N-glykosylační místo je zavedeno substitucí zvolenou ze skupiny K12S/T, G18S/T, E38N, E38N+S40T, K61S/T, N85S/T, K94N a Q106S/T.

8. Konjugát podle některého z nároků 1 až 7, který dále obsahuje alespoň jednu další nepolypeptidovou část.

9. Konjugát podle nároku 8, kde další nepolypeptidovou částí je molekula polymeru.

10. Konjugát s aktivitou IFNG obsahující alespoň jednu nepolypeptidovou část kovalentně navázanou na polypeptid IFNG, kde polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci odlišnou od sekvence rodičovského polypeptidu IFNG v alespoň jednom zavedeném cysteinovém zbytku.

11. Konjugát podle nároku 10, kde rodičovským polypeptidem je lidský IFNG standardního typu, neboli hulFNG, nebo jeho varianta nebo fragment.

12. Konjugát podle nároku 11, kde cysteinový zbytek je zaveden do polohy, která je v hulFNG obsazena aminokyselinovým zbytkem, který má na povrchu exponovaných alespoň 25 % svého postranního řetězce.

13. Konjugát podle nároku 12, kde cysteinový zbytek je zaveden do polohy, která je v hulFNG obsazena aminokyselinovým zbytkem, který má na povrchu exponovaných alespoň 50 % svého postranního řetězce.

14. Konjugát podle nároku 13, kde zavedený cysteinový zbytek je zaveden substitucí zvolenou ze skupiny N10C, N16C, E38C, N59C, N83C, K94C a N104C.

15. Konjugát podle nároku 13, kde zavedený cysteinový zbytek je zaveden do polohy obsazené kterýmkoli z aminokyselinových zbytků 121 až 143 hulFNG.

16. Konjugát podle některého z nároků 10 až 15, kde polypeptidovou skupinou je molekula polymeru.

17. Konjugát podle nároku 9 nebo 16, kde molekulou polymeru je přímý nebo rozvětvený polyethylenglykol.

18. Konjugát podle některého z nároků 1 až 17, kde polypeptid IFNG je zkrácený na C-konci.

19. Nukleotidová sekvence kódující polypeptidovou část konjugátu podle některého z nároků 1 až 18.

20. Expresní vektor nesoucí nukleotidovou sekvenci podle nároku 19.

21. Hostitelská buňka obsahující nukleotidovou sekvenci podle nároku 19, nebo expresní vektor podle nároku 20.

22. Farmaceutický prostředek vyznačující se tím, že obsahuje konjugát podle některého z nároků 1 až 18 a farmaceuticky přijatelné ředivo, nosič nebo adjuvans.

23. Konjugát podle některého z nároků 1 až 18 nebo farmaceutický prostředek podle nároku 22 pro použití jako léčivo.

24. Použití konjugátu podle některého z nároků 1 až 18, nebo farmaceutický prostředek podle nároku 22, pro výrobu léčiva pro léčení onemocnění intersticiální plicní tkáně.

25. Použití podle nároku 24, kde onemocněním intersticiální plicní tkáně je idiopatická plicní fibróza.

26. Použití podle nároku 24 nebo 25, kde farmaceutický prostředek se podává subkutánně.

27. Způsob léčení onemocnění intersticiální plicní tkáně, který zahrnuje podávání konjugátu podle některého z nároků 1 až 18 nebo farmaceutického prostředku podle nároku 22 pacientovi v případě potřeby.

28. Způsob podle nároku 27, kde onemocněním intersticiální plicní tkáně je idiopatická plicní fibróza.

29. Způsob podle nároku 27 nebo 28, kde konjugát se podává subkutánně.

Zastupuje:

27.05.02

PV 2002-1836

39547

Výpis sekvencí

<110> Maxygen ApS

<120> Interferon gamma conjugates

<130> 7wo

<160> 34

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 166
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
1 5 10 15

Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
20 25 30

Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
35 40 45

Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp
50 55 60

Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
65 70 75 80

Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile

85 90 95

Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg
100 105 110

Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val
115 120 125

Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
130 135 140

Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
145 150 155 160

Gly Arg Arg Ala Ser Gln
165

<210> 2
<211> 143
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
1 5 10 15

Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
20 25 30

Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
35 40 45

Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
50 55 60

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
65 70 75 80

Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
85 90 95

Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
100 105 110

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
115 120 125

Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
130 135 140

<210> 3
<211> 375
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 3
tctgatgtgg ctgataatgg aactttgttc ttaggcattt tgaagaattg gaaagaag
aa 60

tctgatagaa aaattatgca gtctcaaatt gtgtcttttt acttcaaatt gtttaaaa
ac 120

tttaaagatg atcagtctat tcaaaagtct gtggaaacta ttaaggaaga tatgaatg
tg 180

aagtttttca attctaacaa aaagaaaaga gatgacttcg aaaagttgac taattatt

ct 240

gtgactgact tgaatgtgca aagaaaagct attcatgaat tgatccaagt gatggctg
aa 300

ttgtctccag ctgctaaaac aggaaagaga aaaagatctc agatgttgtt tagaggta
ga 360

agagcttctc agtaa
375

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 4
ggtttgatat cgatggccaa
20

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 5
gcggccctct agattact
18

<210> 6
<211> 51
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 6
catctccgtc cactccgact ccatagcatg caagatccat atgtgaaaga a
51

<210> 7
<211> 84
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 7
atcttgcatg ctatggagtc ggagtggacg gagatggagt tggcggagta gaaggaac
cg 60

ctgttttagc agctggagac aatt
84

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 8
ggtttgatat cgatggccaa
20

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 9
gcggccctct agattact
18

<210> 10
<211> 48
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 10
tttagaggta gaagagcttc tcagcaagat ccatatgtga aagaagct
48

<210> 11
<211> 48
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 11
agcttctttc acatatggat cttgctgaga agctcttcta cgtctaaa

48

<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 12
tgctctagac atctgagatc gttttctctt tcc
33

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 13
ggtttgatat cgatggccaa
20

<210> 14
<211> 51
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 14
catctccgtc cactccgact ccatagcatg caagatccat atgtgaaaga a
51

<210> 15
<211> 81
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 15
atcttgcatg ctatggagtc ggagtggacg gagatggagt tggcggagta gaaggaac
cg 60

gcatctgaga tctttttctc c
81

<210> 16
<211> 102
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 16
cgcggatcca tgaaatatac aagttatatc ttggcttttc agctctgcat cgttttgg
gt 60

tctcttggct gttactgcca agatccatat gtgaaagaag ct
102

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 17
gatggctggc aactagaag
19

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 18
tgtacggtgg gaggtctat
19

<210> 19
<211> 30
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 19
agcattaaaa tacttcgtca agttttcagc
30

<210> 20
<211> 30
<212> DNA

<213> synthetic construct

<400> 20
gctgaaaact tgacgaagta ttttaatgct
30

<210> 21
<211> 27
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 21
cacatcagaa tgagtagcat taaaata
27

<210> 22
<211> 27
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 22
tattttaatg ctactcattc tgatgtg
27

<210> 23
<211> 36
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 23
cataattttt cgatcggatt cgtttttcca attctt
36

<210> 24
<211> 36
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 24
aagaattgga aaaacgaatc cgatcgaaaa attatg
36

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 25
aatagactga tcgtctgtaa agtttttaaa
30

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 26
tttaaaaact ttacagacga tcagtctatt
30

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 27
tctttttctt ttagtactat tgaaaaactt
30

<210> 28
<211> 30
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 28
aagtttttca atagtactaa aaagaaaaga
30

<210> 29
<211> 27
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 29
ataattagtc aaattttcga agtcatg
27

<210> 30
<211> 27
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 30
gatgacttcg aaaatttgac taattat
27

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 31
aatcaagtca gtaacgttat aattagtcaa
30

<210> 32
<211> 30
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 32
ttgactaatt ataacgttac tgacttgaat
30

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 33
atgaatagct ttactagtca cattcaagtc
30

<210> 34

<211> 30
<212> DNA
<213> synthetic construct

<400> 34
gacttgaatg tgactagtaa agctattcat
30