



(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 03 692 T2 2006.03.02



(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 349 944 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 03 692.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB02/00068**

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 729 440.4

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 02/055098**

(86) PCT-Anmeldetag: 09.01.2002

(87) Veröffentlichungstag

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 18.07.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 08.10.2003

(97) Erstveröffentlichung
(97) Veröffentlichungstag

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 13.04.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 02.03.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 02.03.2006

(30) Unionspriorität:

(35) Chlorsphenolat: 0100551 09.01.2001 GB

(30) Unionspriorität: 0100551 09.01.2001 GB	(84) Benannte Vertragsstaaten: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR
(73) Patentinhaber: Queen Mary and Westfield College, London, GB	(72) Erfinder: CHERNAJOVSKY, Yuti, London EC1M 6BQ, GB; DREJA, Hanna Stina, London EC1M 6BQ, GB; ADAMS, Gillian, London EC1M 6BQ, GB
(74) Vertreter: v. Bezold & Sozien, 80799 München	

(54) Bezeichnung: LATENCY ASSOCIATED PEPTIDE VON TGF-BETA UM PHARMAZEUTISCH AKTIVE PROTEINE LATENT ZU MACHEN

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Proteinen, Proteinderivaten und DNA-Konstrukten, die pharmazeutisch aktiven Proteinen Latenz verleihen. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren, um pharmazeutisch aktive Proteine mit Latenz zu versehen, sowie Verfahren, um latenten pharmazeutisch aktiven Proteinen eine ortsspezifische Aktivierung zu verschaffen.

[0002] Die meisten der Cytokine und Wachstumsfaktoren werden unter streng kontrollierten Bedingungen exprimiert. Ihre Genexpression wird durch Reize aus der Umgebung wie etwa Infektion, Zell-Zell-Interaktionen, Veränderungen der extrazellulären Matrixzusammensetzung und Interaktionen mit Adhäsions-Molekülen oder durch Stimulation mit anderen Cytokinen reguliert.

[0003] Es erfolgt nicht nur eine Regulation auf transkriptionalem und posttranskriptionalem Niveau, sondern einige Cytokine werden nur dann in das Medium freigesetzt, wenn ein zweites Signal die Zelle aktiviert. Ein drittes Regulationsniveau der Cytokinaktivität ist bei Molekülen festgestellt worden, die in einer latenten Form sekretiert und durch das Freisetzen der Cytokin-Komponente dort "aktiviert" werden, wo Prozesse der Entzündung, Wundheilung und Gewebereparatur stattfinden (Khalil N, Microbes and Infection, 1, 1255-1263 (1999)). Unter diesem letzteren Gesichtspunkt ist dem transformierenden Wachstumsfaktor Beta (TGF β) die größte Aufmerksamkeit zuteil geworden (siehe beispielsweise WO 0 020 449).

[0004] TGF β wird als ein dimeres latentes Cytokin synthetisiert, das aus einem amino-terminalen, mit Latenz assoziierten Protein (LAP) und dem aktiven TGF β -Cytokin an seinem COOH-Terminus besteht (Roberts und Sporn: Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, MB and Roberts, AB, Springer-Verlag, 419-472 (1996); Roth-Eicchorn et. al.: Hepatology, 28, 1588-1596 (1998)). Das Vorläuferpeptid enthält ein Signalpeptid (Reste 1-29), das für die Proteinsekretion und um das Molekül durch den Golgi-Apparat zu führen, damit es durch proteolytische Spaltung und Glycosylierung bearbeitet wird, erforderlich ist. Die LAP-Domäne wird durch proteolytische Spaltung bei Argininen (277-278) vom TGF β getrennt. Das reife TGF β beginnt bei Alanin 279. Das LAP schützt nicht nur das TGF β , sondern enthält wichtige Reste, die für die Interaktion mit anderen Molekülen erforderlich sind. Mutationen im LAP-Bereich sind vor kurzem mit dem autosomal dominanten Camurati-Engelmann-Syndrom in Zusammenhang gebracht worden (Janssens u.a.: Nature Genetics, 26, 273-275 (2000)). Die Cysteine 224 und 226 sind für die intermolekulare Disulfid-Bindung zwischen zwei LAPs wichtig.

[0005] Ihre Mutation zu Serin lässt das Molekül "aktiv" werden (Sanderson et.al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 2572-2576 (1995); Brunner et. al.: Mol. Endocrinol 6, 1691-1700 (1992); Brunner et. al.: J. Biol. Chem, 264, 13660-13664 (1989)). Das RGD-Motiv (245-247) fördert die Interaktion mit Integrinen ((Munger et. al.: Mol. Biol. of the Cell, 9, 2627-2638 (1998); Deryck R.: TIBS, 19, 548-553 (1994)). Nukleinsäure, die TGF β codiert, ist in US 5 801 231 beschrieben.

[0006] In den meisten der untersuchten Zelltypen, einschließlich jener mesenchymalen, epithelialen und endothelialen Ursprungs, wird TGF β in einer latenten Form sekretiert, die aus TGF β und seinen LAP- (mit Latenz assoziierten Peptid) Propeptid-Dimeren besteht, die kovalent an latente TGF β -bindende Proteine (LTBPs) gebunden sind. LTBPs werden außerdem für die Sekretion und Faltung von TGF β benötigt ((Miyazano et.al.: EMBO J. 10, 1091-1101 (1991); Miyazano et.al.: J. Biol. Chem. 267, 5668-5675 (1992); Eklov et.al.: Cancer Res. 53, 3193-3197 (1993)). Das Cystein 33 ist für die Disulfid-Brücke mit der dritten 8-Cystein-reichen Wiederholung des latenten TGF β -bindenden Proteins (LTBP) wichtig (Saharinen et.al.: The EMBO Journal, 15, 245-253 (1996)). Eine Modifikation des LTBP durch Enzyme, wie etwa Thrombospondin (Schultz et.al.: The Journal of Biological Chemistry, 269, 26783-26788 (1994); Crawford et.al.: Cell, 93, 1159-1170 (1998)), Transglutaminase (Nunes et.al.: J. Cell. Biol. 136, 1151-1163 (1997); Kojima et.al.: The Journal of Cell Biology, 121, 439-448 (1993)) und MMP9, MMP2 (Yu und Stamenkovic, Genes and Dev, 14, 163-176 (2000)) könnte den aktiven Abschnitt des TGF β von dem latenten Komplex lösen.

[0007] Cytokine sind Naturprodukte, die als lösliche, lokale Vermittler von Zell-Zell-Interaktion dienen. Sie zeigen eine Vielfalt von pleiotropen Aktionen, wovon einige für therapeutische Zwecke nutzbar gemacht werden können. Das Targeting von Cytokinen auf spezifische Zelltypen unter Verwendung von scFv (Lode et.al., Pharmacol. Ther, 80, 277-292 (1998)) und vWF (Gordon et.al.: Human Gene Therapy, 8, 1385-1394 (1997)) hat sich ausschließlich auf die aktive Cytokinkomponente des Cytokinkomplexes konzentriert.

[0008] Pharmakologisch wirksame Proteine oder andere Arzneistoffe auf der Grundlage solcher Agenzien, die in sehr hohen Konzentrationen systemisch verabreicht werden müssen, damit biologisch wirksame Konzentrationen in dem Gewebe, auf das abgezielt wird, erreicht werden, neigen dazu, unerwünschte systemische

Wirkungen zu verursachen beispielsweise Toxizität, wodurch ihr Nutzen und ihre Wirksamkeit beschränkt sind.

[0009] Die betreffenden Erfinder haben eine Methode entwickelt, um die toxische Wirkung einer systemischen Verabreichung wirksamer biologischer Agenzien zu überwinden.

[0010] Gemäß einem ersten Aspekt der Erfindung wird ein Fusionsprotein geschaffen, das ein mit Latenz assoziiertes Peptid (LAP) von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 und eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle aufweist, um einem pharmakologisch-aktiven Protein Latenz zu verleihen.

[0011] Außerdem schafft der erste Aspekt der Erfindung ein Fusionsprotein, das ein LAP von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 und eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle aufweist, um ein latentes pharmazeutisch aktives Protein ortsspezifisch zu aktivieren. So, wie der Ausdruck "ortsspezifisch aktivieren" hier gebraucht wird, hat er eine allgemeine Bedeutung und ist nicht auf das Beseitigen oder Reduktion der Latenz, die einem pharmazeutisch aktiven Protein verliehen worden ist, durch ortsspezifische Spaltung an der proteolytischen Spaltstelle beschränkt.

[0012] Es wird erwartet, dass ein ortsspezifisches Spalten an der proteolytischen Spaltstelle mit der wiederhergestellten Aktivierung des pharmazeutisch aktiven Proteins einhergeht.

[0013] So, wie der Ausdruck "latent pharmazeutisch aktives Protein" hier gebraucht wird, schließt er pharmazeutisch aktive Proteine ein, die auf Grund ihrer Assoziation mit LAP von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 und einer Matrix-Metallproteinase (MMP)₃-proteolytischen Spaltstelle, latent sind. Insbesondere kann das pharmazeutisch aktive Protein kraft seiner Fusion an eine LAP-assozierte proteolytische Spaltstelle latent sein, so dass ein latentes Fusionsprotein gebildet wird.

[0014] Gemäß einem zweiten Aspekt der Erfindung wird ein in vitro-Verfahren geschaffen, um einem pharmazeutisch aktiven Protein Latenz zu verleihen, wobei das Verfahren das Assoziieren eines Fusionsproteins, das ein mit Latenz assoziiertes Peptid (LAP) von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 und eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle aufweist, mit dem pharmazeutisch aktiven Agens beinhaltet.

[0015] Der Ausdruck "Protein" hat in diesem Text allgemein die Bedeutung von mehreren Aminosäureresten, die durch Peptidbindungen zusammengefügt sind. Er wird austauschbar und in der gleichen Bedeutung wie Peptid, Oligopeptid, Oligomer oder Polypeptid gebraucht und schließt Glykoproteine sowie Derivate davon ein. Außerdem soll der Ausdruck "Protein" Fragmente, Analoge und Derivate eines Proteins einschließen, wobei das Fragment, Analogon oder Derivat im Wesentlichen die gleiche biologische Wirksamkeit oder Funktion wie ein Referenzprotein beibehält.

[0016] Das Fragment, Analogon oder Derivat des Proteins, wie in diesem Text definiert, sind mindestens 6, vorzugsweise 10 oder 20 oder bis zu 50 oder 100 Aminosäuren lang sein.

[0017] Das Fragment, Derivat oder Analogon des Proteins kann (i) ein solches sein, bei dem einer oder mehrere der Aminosäurereste durch einen konservierten oder nicht konservierten Aminosäurerest (vorzugsweise einen konservierten Aminosäurerest) substituiert sind, wobei ein solcher substituierter Aminosäurerest durch den genetischen Code codiert sein könnte, dies jedoch nicht sein muss, oder (ii) ein solches sein, bei dem einer oder mehrere der Aminosäurereste eine substituierte Gruppe enthalten, oder (iii) ein solches sein, bei dem das reife Peptid mit einer weiteren Verbindung fusioniert ist, wie etwa einer Verbindung, die die Halbwertszeit des Polypeptids erhöht (beispielsweise Polyethylenglykol), oder (iv) ein solches sein, bei dem die zusätzlichen Aminosäuren mit dem reifen Polypeptid fusioniert sind, wie etwa eine Führungs- oder sekretorische Sequenz, die für die Reinigung des Polypeptids gebraucht wird. Derartige Fragmente, Derivate und Analoge werden ausgehend von den hier gegebenen Ansätzen als im Kompetenzbereich des Fachmanns erachtet.

[0018] Besonders bevorzugt werden Varianten, Analoge, Derivate und Fragmente mit der Aminosäuresequenz des Proteins, wobei mehrere z.B. 5 bis 10, 1 bis 5, 1 bis 3, 2, 1 oder keine Aminosäurereste in beliebiger Kombination substituiert, deletiert oder addiert sind. Besonders bevorzugt darunter sind stille Substitutionen, Additionen und Deletionen, die die Eigenschaften und Aktivitäten des Proteins der vorliegenden Erfindung nicht verändern. Außerdem werden in diesem Zusammenhang konservative Substitutionen besonders bevorzugt.

[0019] Ein Beispiel für eine Variante der vorliegenden Erfindung ist ein Fusionsprotein wie oben definiert, abgesehen von der Substitution einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere andere Aminosäuren.

ren. Dem Fachmann ist klar, dass verschiedene Aminosäuren ähnliche Eigenschaften aufweisen. Eine oder mehrere solche Aminosäuren einer Substanz können oftmals durch eine oder mehrere andere Aminosäuren ersetzt werden, ohne eine gewünschte Aktivität der Substanz auszuschalten.

[0020] So können oft die Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin (Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten) gegeneinander ausgetauscht sein. Von diesen möglichen Substitutionen wird bevorzugt, dass Glycin und Alanin gegeneinander austauschbar verwendet werden (da sie verhältnismäßig kurze Seitenketten aufweisen) und dass Valin, Leucin und Isoleucin gegeneinander austauschbar verwendet werden (da sie längere aliphatische Seitenketten aufweisen, die hydrophob sind). Weitere Aminosäuren, die oftmals gegeneinander ausgetauscht sein können, umfassen Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (Aminosäuren, die aromatische Seitenketten aufweisen); Lysin, Arginin und Histidin (Aminosäuren, die basische Seitenketten aufweisen), Aspartat und Glutamat (Aminosäuren, die saure Seitenketten aufweisen), Asparagin und Glutamin (Aminosäuren die Amid-Seitenketten aufweisen) und Cystein und Methionin (Aminosäuren, die schwefelhaltige Seitenketten aufweisen). Substitutionen dieser Art werden oftmals als "konservative" oder "semikonservative" Aminosäuresubstitutionen bezeichnet.

[0021] Was die Aminosäuresequenz für das Fusionsprotein wie oben angegeben betrifft, so können außerdem Deletionen oder Insertionen von Aminosäuren vorgenommen werden. So könnten beispielsweise Aminosäuren, die keine wesentliche Wirkung auf die Aktivität des Polypeptids haben oder die zumindest eine solche Aktivität nicht ausschalten, deletiert werden. Derartige Deletionen können vorteilhaft sein, da sich die Gesamt-länge und die relative Molekülmasse eines Polypeptids verringert, wohingegen es seine Aktivität beibehält. Dies kann ermöglichen, das Ausmaß des Polypeptids, das für einen bestimmten Zweck erforderlich ist, zu verringern, wodurch sich beispielsweise Einsatzmengen reduzieren lassen.

[0022] Was die Sequenz des oben angegebenen Fusionsproteins betrifft, so können auch Insertionen von Aminosäure vorgenommen werden. Diese können erfolgen, um die Eigenschaften einer Substanz der vorliegenden Erfindung zu verändern (z.B. um die Identifizierung, Reinigung oder Expression zu unterstützen, wie weiter oben im Zusammenhang mit Fusionsproteinen erläutert worden ist).

[0023] In Bezug auf die oben unter a) angegebene Sequenz können Aminosäureänderungen mit jedem geeigneten Verfahren vorgenommen werden, z.B. mit einer ortsgerichteten Mutagenese.

[0024] Es ist darauf zu achten, dass im Rahmen der vorliegenden Erfindung Aminosäuresubstitutionen oder -insertionen mit natürlich vorkommenden oder nicht natürlich vorkommenden Aminosäuren vorgenommen werden können. Ganz gleich, ob natürliche oder synthetische Aminosäuren verwendet werden, es liegen vorzugsweise nur L-Aminosäuren vor.

[0025] Ein Protein gemäß der Erfindung kann zusätzliche N-terminale und/oder C-terminale Aminosäuresequenzen aufweisen. Derartige Sequenzen können aus verschiedenen Gründen vorgesehen sein, beispielsweise für eine Glycosylierung.

[0026] Der Ausdruck "Fusionsprotein" hat in diesem Text im Allgemeinen die Bedeutung, dass ein oder mehrere Proteine durch chemische Mittel und/oder mittels Peptidbindungen durch Proteinsynthese miteinander verbunden worden sind.

[0027] Das mit Latenz assoziierte Peptid (LAP) der vorliegenden Erfindung enthält die Codierungssequenz für die Vorläuferdomäne von TGF β oder eine Sequenz, die im Wesentlichen mit dieser identisch ist.

[0028] "Identität" ist, wie dem Fachmann bekannt ist, die Beziehung zwischen zwei oder mehr Polypeptidsequenzen oder zwei oder mehr Polynukleotidsequenzen, die durch Vergleichen der Sequenzen bestimmt wird. Außerdem hat Identität im Fach auch die Bedeutung des Grades der Sequenzverwandtschaft zwischen Polypeptid- bzw. Polynukleotidsequenzen, der anhand der Übereinstimmung der geordneten Folgen solcher Sequenzen bestimmt werden kann. Trotzdem es eine Anzahl von Verfahren gibt, um die Identität zwischen zwei Polypeptiden oder zwei Polynukleotidsequenzen zu messen, sind die Verfahren, die gemeinhin benutzt werden, um die Identität zu bestimmen, in Computerprogrammen codifiziert. Bevorzugte Computerprogramme zur Bestimmung der Identität zweier Sequenzen schließen das GCG-Programmpaket (Devereux et. al.: Nucleic acids Research, 12, 387 (1984)), BLASTP, BLASTN und FASTA (Atschul et.al., J. Molec. Biol. 215, 403 (1990)) ein, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein.

[0029] Das LAP der vorliegenden Erfindung weist die Vorläuferdomäne von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 für bei-

spielsweise das Vorläuferpeptid von (menschlichem) TGF β -1, -2, oder -3 (Deryck et.al.: Nature, 316, 701-705 (1985); De Martin et.al.: EMBO J. 6, 3673-3677 (1987); Hanks et.al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 79-82 (1988); Deryck et.al.: EMBO J. 7, 3737-3743 (1988); Ten Dyke et.al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4715-4719 (1988)), TGF β -4 (vom Huhn) (Jakowlew et.al.: Mol. Endocrinol. 2, 1186-1195 (1988)) oder TGF β -5 (vom Kralenfrosch) (Kondaiah et.al.: J. Biol. Chem. 265, 1089-1093 (1990)) auf. Der Ausdruck "Vorläuferdomäne" definiert eine Sequenz, die ein Vorläuferpeptid codiert, das nicht die Sequenz enthält, die das reife Protein codiert. Die Aminosäuresequenzen der Vorläuferdomäne von TGF β -1, -2, -3, -4 und -5 (Roberts und Sporn: Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, MB and Roberts, AB, Springer-Verlag, Kapitel 8, 422 (1996)) sind in [Fig. 3](#) gezeigt.

[0030] Vorzugsweise weist die Aminosäuresequenz des LAP bei Verwendung der voreingestellten Parameter des BLAST-Computerprogramms (Atschul et.al.: J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)), das vom HGMP (Human Genome Mapping Project) zur Verfügung gestellt wird, auf Aminosäureniveau wenigstens eine 50 %-Identität mit der Vorläuferdomäne des TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 (Roberts und Sporn: Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, MB and Roberts, AB, Springer-Verlag, Kapitel 8, 422 (1996)), die in [Fig. 3](#) gezeigt ist, auf. Vorzugsweise kann das LAP eine Identität von wenigstens 60 %, 70 %, 80 %, 90 % und stärker bevorzugt von 95 % (noch stärker bevorzugt von wenigstens 99 %) auf Nukleinsäure- oder Aminosäureniveau mit der Vorläuferdomäne von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5, wie in [Fig. 3](#) gezeigt, aufweisen.

[0031] Das LAP schließt das LAP von TGF β -1, -2, -3, -4 und -5 (Roberts und Sporn: Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, MB and Roberts, AB, Springer-Verlag, Kapitel 8, 422 (1996)), das in [Fig. 3](#) gezeigt ist, ein.

[0032] Das LAP kann wenigstens zwei, beispielsweise wenigstens 4, 6, 8, 10 oder 20 Cystein-Reste enthalten, die Disulfid-Bindungen ausbilden.

[0033] Das LAP kann eine schützende "äußere Hülle" rings um das pharmazeutisch aktive Agens sein. Dadurch wird das pharmazeutisch aktive Agens geschützt, und seine Interaktion mit anderen Molekülen an der Zelloberfläche oder mit Molekülen, die für seine Aktivität wichtig sind, wird aufgehalten oder verhindert.

[0034] Das LAP kann die Aminosäuresequenz, die durch die Nukleotide 1-832 von [Fig. 1](#) oder die Nukleotide 598-1352 von [Fig. 2](#) codiert ist, aufweisen oder eine Sequenz, die bei Verwendung der voreingestellten Parameter des BLAST-Computerprogramms, das vom HGMP zur Verfügung gestellt wird, eine Identität von wenigstens 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % oder 99 % damit hat.

[0035] Die proteolytische Spaltstelle ist eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-Spaltstelle.

[0036] Die MMP-Spaltstelle kann irgendeine Aminosäuresequenz aufweisen, die mittels einer MMP spaltbar ist. Die Aminosäuresequenz der MMP-Spaltstelle kann durch die Nukleotide 844-861 von [Fig. 1](#) oder die Nukleotide 565-585 von [Fig. 2](#) oder eine Sequenz von Nukleotiden, die bei Verwendung der voreingestellten Parameter des BLAST-Computerprogramms, das vom HGMP zur Verfügung gestellt wird, eine Identität von wenigstens 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % oder 99 % damit hat, codiert sein. Vorzugsweise weist die Nukleinsäuresequenz, welche die MMP-Spaltstelle codiert, die kleinstmögliche Anzahl von Aminosäurenresten auf, die für ein Erkennen und Spalten mittels MMP erforderlich ist.

[0037] Eine MMP-Spaltstelle kann eine Anzahl von Aminosäureresten aufweisen, die von der MMP erkannt werden können. Außerdem können die Aminosäuren der MMP-Spaltstelle durch eine oder mehrere Peptidbindungen die mittels MMP proteolytisch spaltbar sind, verkettet sein. MMPs, die die MMP-Spaltstelle spalten können, schließen MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 oder MMP10 (Yu und Stamenkovic, Genes and Dev. 14, 163-176 (2000); Nagase und Fields: Biopolymers, 40, 399-416 (1996); Massova et.al.: J. Mol. Model. 3, 17-30 (1997); zusammengestellt in: Vu und Werb: Genes and Dev. 14, 2123-2133 (2000)) ein, ohne jedoch hierauf beschränkt zu sein. Die Sequenzen der Protein-Spaltstellen von MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 und MMP10 sind in [Fig. 4](#) gezeigt.

[0038] Vorzugsweise wird die proteolytische Spaltstelle der vorliegenden Erfindung an Orten der Entzündung und des Gewebeumbaus gespaltet. Insbesondere ist die proteolytische Spaltstelle der vorliegenden Erfindung eine MMP-Spaltstelle, die z.B. aus der Gruppe aus MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 oder MMP10, wie in [Fig. 4](#) gezeigt, ausgewählt ist.

[0039] Ferner stellt die Erfindung eine Nukleinsäure bereit, die das Fusionsprotein des ersten und zweiten As-

pekts der Erfindung codiert. Die Nukleinsäure, die das Fusionsprotein codiert, kann die Nukleotide 1-861 von [Fig. 1](#) oder die Nukleotide 585-1352 von [Fig. 2](#) oder eine Sequenz von Nukleotiden, die bei Verwendung der voreingestellten Parameter des BLAST-Computerprogramms, das vom HGMP zur Verfügung gestellt wird, eine Identität von mindestens 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % oder 99 % damit hat, aufweisen.

[0040] Die vorliegende Erfindung kann ferner ein "Linker"-Peptid bereitstellen. Vorzugsweise ist das Linker-Peptid an die Aminosäuresequenz der proteolytischen Spaltstelle gekoppelt. Das Linker-Peptid kann am C-Terminus oder am N-Terminus der Aminosäuresequenz, welche die Stelle der proteolytischen Spaltung codiert, vorgesehen sein. Vorzugsweise ist das Linker-Peptid mit der Aminosäuresequenz der proteolytischen Spaltstelle zusammenhängend. Das Linker-Peptid kann die Aminosäuresequenz aufweisen, die durch die Nukleotide 831-843 und/oder 862-873 von [Fig. 1](#) oder die Nukleotide 553-564 und/oder 586-597 von [Fig. 2](#) oder eine Sequenz von Nukleotiden, die bei Verwendung der voreingestellten Parameter des BLAST-Computerprogramms, das vom HGMP zur Verfügung gestellt wird, eine Identität von wenigstens 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % oder 99 % damit hat, codiert ist.

[0041] Der Ausdruck "Linker-Pepid" soll eine Sequenz von Aminosäureresten definieren, die vorzugsweise eine hydrophile Region aufweist, wenn sie in einem exprimierten Protein enthalten ist. Eine solche hydrophile Region kann die Spaltung durch ein Enzym an der proteolytischen Spaltstelle begünstigen.

[0042] So, wie der Ausdruck "Latenz" hier gebraucht wird, kann er mit einer abschirmenden Wirkung im Zusammenhang stehen, die eine Interaktion des Fusionsproteins mit anderen Molekülen an der Zelloberfläche behindern könnte. Alternativ kann der Ausdruck "Latenz" gebraucht sein, um eine Verminderung der Aktivität (bis zu und einschließlich einer Ablation der Aktivität) eines Moleküls/Agens, das mit dem Fusionsprotein assoziiert ist, zu beschreiben. Außerdem könnte der Ausdruck "Latenz" mit einer Stabilisierungswirkung des Fusionsproteins im Zusammenhang stehen. Diese Wirkung kann umfassend oder teilweise sein, wobei eine teilweise Wirkung ausreichend ist, um die Latenz des Wirkstoffs zu erzielen.

[0043] Das pharmazeutisch aktive Protein kann, ohne hierauf beschränkt zu sein, einen Wachstumsfaktor (z.B. TGF β , einen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), einen aus Blutplättchen gewonnenen Wachstumsfaktor (PDGF), einen Nervenwachstumsfaktor (NGF), ein kolonienstimulierender Faktor (CSF), einen Leberzellen-Wachstumsfaktor, einen insulinähnlichen Wachstumsfaktor, einen Plazenta-Wachstumsfaktor); einen Differenzierungsfaktor; ein Cytokin, z.B. Interleukin (beispielsweise IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20 oder IL-21, entweder α oder β), Interferon (z.B. IFN- α , IFN- β und IFN- γ), einen Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), einen IFN- γ induzierender Faktor (IGIF), Knochen-morphogenetische Proteine (BMP); Chemokin (z.B. MIPs (Makrophage inflammatorisches Protein), beispielsweise MIP1 α und MIP1 β ; MCPs (Monozyten chemotaktisches Protein) z.B. MCP-1, -2 oder -3; RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted); trophische Faktoren; Cytokininhibitory; Cytokinrezeptoren; freie Radikale abfangende Enzyme, z.B. Superoxid-Dismutase oder -Katalase, Arzneimittelvorläufer konvertierende Enzyme (z.B. Angiotensin konvertierendes Enzym, Deaminasen, Dehydrogenasen, Reduktasen, Kininasen und Phosphatasen); Peptidmimetika; Proteaseinhibitoren, einen Metallprotease-Gewebsinhibitor und einen Serinproteaseinhibitor einschließen. Vorzugsweise wird das pharmazeutisch aktive Protein von der zu behandelnden Spezies gewonnen, beispielsweise weist es für die Behandlung von Menschen eine menschliche Herkunft auf. Vorzugsweise ist das pharmazeutisch aktive Protein IFN β .

[0044] So wie der Ausdruck "Peptidmimetika" hier gebraucht wird, schließt er Agenzien ein, ohne darauf beschränkt zu sein, die eine gewünschte Peptid-Hauptkette-Konformation aufweisen, die in ein Nichtpeptid-Gerüst eingebettet ist, welches das Peptid in einer bestimmten Konformation hält. Peptidmimetika, die einige der Nachteile von Peptiden nicht aufweisen, sind in den Fällen interessant, in denen Peptide für Anwendungen in der Medizin nicht geeignet sind.

[0045] Peptidmimetika können ein Peptidgerüst mit L- oder D-Konformation aufweisen. Beispiele für Peptidmimetika schließen Melanocortin, Adrenocorticotrophin Hormon (ACTH) und weitere Peptidmimetika, die im Zentralnervensystem bzw. im endokrinen System bei der Signalübertragung sowie bei Infektion und Immunität eine Rolle spielen, ein.

[0046] Der Ausdruck "assoziiert mit" soll im Kontext der vorliegenden Erfindung alle Mittel der Assoziation einschließlich der chemischen Vernetzung oder der Peptidbindung, ohne jedoch hierauf beschränkt zu sein, einschließen.

[0047] In einer alternativen Ausführungsform stellt die Erfindung ferner das Fusionsprotein der vorliegenden

Erfindung, wahlweise mit einem latent TGF β -bindenden Protein (LTBP) assoziiert, bereit. Typisch ist das Fusionsprotein kovalent an das LTBP gebunden, so dass ein Komplex entsteht. Vorzugsweise ist die Assoziation durch Disulfid-Bindungen zwischen Cys Nr. 33 des LAP und dem dritten 8-Cys-Rest des LTBP vermittelt. Das mit dem Fusionsprotein assoziierte LTBP kann, ohne darauf beschränkt zu sein, LTBP-1, -2, -3 oder -4 (Kanzaki et.al.: Cell, 61, 1051-1061 (1990); Tsuji et.al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8835-8839 (1990); Moren et.al.: J. Biol. Chem. 269, 32469-32478 (1994); Yin et.al.: J. Biol. Chem. 270, 10147-10160 (1995); Gibson et.al.: Mol. Cell. Biol. 15, 6932-6942 (1995); Saharinen et.al.: J. Biol. Chem. 273, 18459-18469 (1998)) oder Fragmente von LTBP einschließen, wie etwa jene, die die dritte 8-Cys-Wiederholung aufweisen, oder Homologe mit einer Aminosäure- oder Nukleotidsequenz, die bei Verwendung der voreingestellten Parameter des BLAST-Computerprogramms, das von HGMP zur Verfügung gestellt wird, eine Identität von mindestens 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % oder 99 % mit der von LTBP hat.

[0048] Die LTBP-Spaltung kann das Fusionsprotein von dem LTBP-Komplex freisetzen. Enzyme, die LTBP auf diese Weise spalten können, umfassen, ohne jedoch hierauf beschränkt zu sein, Thrombospondin (Schultz et.al.: The Journal of Biological Chemistry, 269, 26783-26788 (1994); Crawford et.al.: Cell, 93, 1159-1170 (1998)), Transglutaminase (Nunes et.al.: J. Cell. Biol. 136, 1151-1163 (1997); Kojima et.al.: The Journal of Cell Biology, 121, 439-448 (1993)), MMP9 und MMP2 (Yu und Stamenkovic, Genes and Dev, 14, 163-176 (2000)).

[0049] Ein dritter Aspekt der Erfindung stellt ein Nukleinsäurekonstrukt zur Verfügung, das eine erste Nukleinsäuresequenz, welche ein pharmazeutisch aktives Protein codiert und eine zweite Nukleinsäuresequenz enthält, die ein LAP von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 codiert, wobei eine Nukleinsäuresequenz, die eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle codiert, zwischen der ersten und der zweiten Nukleinsäuresequenz vorgesehen ist.

[0050] Der Ausdruck "Nukleinsäurekonstrukt" bezieht sich allgemein auf eine Nukleinsäure beliebiger Länge, die DNA, cDNA oder RNA, wie etwa mRNA, sein kann, die durch Klonieren erhalten oder durch chemische Synthese erzeugt sein kann. Die DNA kann einzel- oder doppelsträngig sein. Eine einzelsträngige DNA kann der Strang codierende gleichsinnige oder kann der nicht codierende oder antisense-Strang sein. Für eine therapeutische Verwendung liegt das Nukleinsäurekonstrukt vorzugsweise in einer Form vor, die in dem zu behandelnden Subjekt exprimiert werden kann.

[0051] Vorzugsweise codiert die erste Nukleinsäuresequenz das Protein IFN β . Die erste Nukleinsäuresequenz kann die Sequenz der Nukleotide von 874-1376 von [Fig. 1](#) oder der Nukleotide 598-1452 von [Fig. 2](#) oder eine Sequenz, die im Wesentlichen homolog dazu ist, aufweisen. In einer Ausführungsform der Erfindung codiert die erste Nukleinsäuresequenz IFN β von Maus oder Mensch.

[0052] Das Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der Erfindung kann in Form eines Vektors, beispielsweise eines Expressionsvektors, vorliegen und kann u.a. aus Chromosomal, Episomal und Viren abgeleitete Vektoren, beispielsweise Vektoren, die aus bakteriellen Plasmiden, Bakteriophagen, Transposonen, Hefe-Episomen, Insertionssequenzen, Hefe-Chromosomenelementen, Viren, wie etwa Baculo-Viren, Papova-Viren wie etwa SV40, Vakziniaviren, Adenoviren, Geflügelpockenviren, Pseudorabies-Viren und Retroviren, gewonnen sind, und Vektoren, die aus Kombinationen davon gewonnen sind, wie etwa jene, die aus Plasmid- und Bakteriophagen-Genen gewonnen sind, wie etwa Cosmide und Phagemide, einschließen. Im allgemeinen, jeder Vektor der fähig ist Nukleinsäure aufrecht zu erhalten, zu vermehren und zu exprimieren, um in einer Wirtszelle ein Polypeptid zu exprimieren, kann in diesem Zusammenhang verwendet werden.

[0053] Vorzugsweise ist das Nukleinsäurekonstrukt LAP-huIFN β oder huIFN β -LAP wie hier im Beispiel 4 definiert. Alternativ kann das Nukleinsäurekonstrukt LAP-mIFN β sein, wie in [Fig. 1](#) und schematisch in [Fig. 5](#) gezeigt ist, oder mIFN β -LAP, wie in [Fig. 2](#) und schematisch in [Fig. 5](#) gezeigt ist.

[0054] Ferner stellt die Erfindung ein Protein bereit, das durch das Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der Erfindung codiert ist, wahlweise mit latent TGF β -bindendem Protein (LTBP) wie hierin beschrieben assoziiert. Typisch ist das durch das Nukleinsäurekonstrukt codierte Protein kovalent an LTBP gebunden, so dass ein Komplex entsteht. Vorzugsweise ist die Assoziation durch Disulfid-Bindungen zwischen Cys Nr. 33 des LAP und dem dritten 8-Cys-Rest des LTBP vermittelt.

[0055] Das Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der Erfindung enthält vorzugsweise eine Promotorsequenz oder eine andere Regulationssequenz, die die Expression der Nukleinsäure steuert. Die Expression einer Nukleinsäure steuernde Promotorsequenzen und andere Regulationssequenzen sind identifiziert worden und im Fach bekannt. Der Fachmann wird bemerken, dass es nicht erforderlich zu sein braucht, die gesamte

Promotorsequenz oder davon verschiedene Regulationssequenzen zu verwenden. Es könnte nur das kleinste, unentbehrliche Regulationselement erforderlich sein, wobei genau genommen derartige Elemente benutzt werden können, um chimäre Sequenzen oder andere Promotoren zu bilden. Selbstverständlich ist es unbedingt erforderlich, die Gewebe- und/oder zeitliche Spezifität zu bewahren. Der Promotor kann irgendein geeigneter bekannter Promotor sein, beispielsweise der menschliche Cytomegalovirus- (CMV-) Promotor, der unmittelbar frühe CMV-Promotor, die HSV-Thymidinkinase, der frühe und späte SV40-Promotor oder die Promotoren retroviraler LTRs, wie etwa jene des Rous Sarcoma Virus (RSV), und Metallothionein-Promotoren wie etwa der Maus-Metallothionein-I-Promotor. Der Promotor kann das Minimum aufweisen, das für eine Promotoraktivität erforderlich ist (wie etwa TATA-Elemente ohne Verstärkerelemente), beispielsweise die Minimalsequenz des CMV-Promotors.

[0056] Vorzugsweise grenzt der Promotor an die erste und/oder zweite Nukleinsäuresequenz an. Wie hier dargelegt ist, kann das Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der Erfindung in Form eines Vektors sein. Vektoren schließen häufig einen oder mehrere Expressionsmarker ein, die eine Selektion der damit transfizierten (oder transformierten) Zellen ermöglichen, um vorzugsweise eine Selektion von Zellen, die Vektoren enthalten, in die heterologe DNA eingebaut ist, zu ermöglichen. Im Allgemeinen werden geeignete Start- und Stoppsignale vorhanden sein.

[0057] Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft eine Zelle, die das Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der Erfindung enthält. Die Zelle kann als eine "Wirtszelle" bezeichnet werden, wobei sie für die Manipulation der Nukleinsäure, das Klonieren eingeschlossen, nützlich ist. Alternativ kann die Zelle eine Zelle sein, in der eine Expression der Nukleinsäure erzielt werden soll. Repräsentative Beispiele für Wirtszellen, die sich für eine Expression des Nukleinsäurekonstrukt der Erfindung eignen, schließen Virus-Hüllzellen, die einen Ein schluss der Nukleinsäure in einen viralen Vektor ermöglichen, Bakterienzellen wie etwa von Streptococci, Staphylococci, E.coli, Streptomyces und Bacillus subtilis, Einzelzellen wie etwa Hefezellen, beispielsweise Zellen von Saccharomyces Cerevisiae und Aspergillus; Insektenzellen wie etwa S2-Zellen von Drosophila und Sf9-Zellen von Spodoptera, tierische Zellen wie etwa CHO, COS, C127, 3T3, PHK.293 und Bowes-Melanom-Zellen sowie weitere geeignete menschliche Zellen und Pflanzenzellen, beispielsweise von Arabidopsis thaliana, ein.

[0058] Die Induktion eines Expressionsvektors in die Wirtszelle kann durch Calcium-Phosphat-Transfektion, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Mikroinjektion, kationische lipidvermittelte Transfektion, Elektroporation, Transduktion, "scrape loading"-Technik, Einbringung unter Verwendung von Mikroprojektilen, Infektion oder weitere Verfahren beeinflusst werden. Derartige Verfahren sind in vielen Standard-Laborhandbüchern, wie etwa Sambrook et.al.: Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Zweite Auflage, Coldspring Harbor Laboratory Press, Coldspring Harbor, New York (1989), beschrieben.

[0059] In Wirtszellen, Säugerzellen wie etwa CHO-Zellen, Hefe, Bakterien oder weiteren Zellen inbegriffen, können unter der Steuerung durch entsprechende Promotoren reife Proteine exprimiert werden. Es können zellfreie Translationssysteme benutzt werden, um solche Proteine unter Verwendung von RNAs, die vom dem Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der vorliegenden Erfindung abgeleitet sind, zu erzeugen. Geeignete Klonierungs- und Expressionsvektoren für die Verwendung mit prokaryotischen und eukaryotischen Wirtszellen sind von Sambrook et.al.: Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Zweite Auflage, Coldspring Harbor Laboratory Press, Coldspring Harbor, New York (1989), beschrieben worden.

[0060] Proteine können mittels wohl bekannter Verfahren, einschließlich der Ammoniumsulfat- oder Ethanol-Präzipitation, Säureextraktion, der Anionen- oder Kationenaustausch-Chromatographie, der Phosphozellulose-Chromatographie, hydrophoben Wechselwirkungschromatographie, der Affinitätschromatographie, der Hydroxylapatit-Chromatographie, der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und der Lectin-Chromatographie, aus rekombinanten Zellkulturen gewonnen und gereinigt werden. Für Therapiezwecke könnte das Nukleinsäurekonstrukt, z.B. in Form eines rekombinanten Vektors, mittels im Fach bekannten Verfahren, etwa mittels Säulenchromatographie, wie in Sambrook et.al.: Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Zweite Auflage, Coldspring Harbor Laboratory Press, Coldspring Harbor, New York (1989), beschrieben, gereinigt werden.

[0061] Unter einem vierten Aspekt stellt die Erfindung ein Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der Erfindung für eine Verwendung in der Medizin bereit. Das Konstrukt kann als Teil eines Expressionskonstrukt, z.B. in Form eines Expressionsvektors wie etwa eines Plasmids oder Virus verwendet werden. Das Konstrukt kann sich für die Verabreichung auf intravenösem, intradermalem, intramuskulärem, oralem oder einem anderen Weg eignen.

[0062] Das Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der Erfindung und die darauf beruhenden Proteine können allein oder zusammen mit weiteren Verbindungen, wie etwa therapeutischen Verbindungen, z.B. entzündungshemmenden Arzneistoffen, zytotoxischen Agenzien, zytostatischen Agenzien oder Antibiotika, verwendet werden. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung nützlichen Nukleinsäurekonstrukte und Proteine werden vorzugsweise in einer isolierten Form bereitgestellt, wobei sie vorzugsweise bis zur Homogenität gereinigt sind. Gemäß dem vierten Aspekt der Erfindung schließt die Verwendung des Konstruktes in der Medizin an, angeschlossen ist jede Behandlungsweise, die einem Menschen oder einem nicht-menschlichen Tier Vorteile bringt. Der Ausdruck „nicht-menschliche Tiere“ erstreckt sich auf Haustiere, darunter Pferde und Gefährten des Menschen (z.B. Katzen und Hunde) sowie Nutztiere, darunter Spezies der Familien der Schafe, Ziegen, Schweine, Rinder und Pferde. Die Verwendung kann hinsichtlich bestehender Beschwerden oder einer bestehenden Krankheit sein oder kann prophylaktisch (Präventivbehandlung) sein. Die Verwendung kann sich auf ein geerbtes oder erworbene Leiden beziehen. Sie kann sich auf akute oder chronische Beschwerden beziehen. Vorzugsweise betrifft die Verwendung Beschwerden/Erkrankungen, die mit einer Entzündung verbunden sind. Die erste Nukleinsäuresequenz des Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der Erfindung kann ein Protein für eine Verwendung bei der Behandlung von Erkrankungen codieren, wobei die Erkrankungen Osteoarthritis, Sklerodermie, Nierenkrankheit, rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmkrankheit, Multiple Sklerose, Atherosklerose oder jede entzündliche Erkrankung oder Krebs einschließen, ohne jedoch hierauf beschränkt zu sein.

[0063] Das Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der Erfindung kann therapeutisch bei einer Gentherapie verwendet werden. Alternativ kann das Protein, das durch das Nukleinsäurekonstrukt codiert ist, für eine direkte Verabreichung geeignet sein, wie hier beschrieben worden ist. Eine Verabreichung des Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts kann mittels physikalischer Verfahren zum Zielort geleitet werden. Beispiele dafür schließen die topische Verabreichung von "nackter" Nukleinsäure in Form eines Vektors in einem geeigneten Transportmittel, beispielsweise in Lösung in einem pharmazeutisch akzeptablen Trägerstoff, wie etwa phosphatgepufferte Kochsalzlösung, oder die Verabreichung eines Vektors mittels physikalischer Verfahren, wie etwa einen Beschuss mit Teilchen entsprechend den im Fach bekannten Verfahren, ein.

[0064] Weitere physikalische Verfahren zur Verabreichung des Nukleinsäurekonstrukt oder der Proteine des dritten Aspekts der Erfindung direkt an den Empfänger schließen Ultraschall, elektrische Stimulation, Elektroporation und Mikroimpfung ein. Weitere Verabreichungsverfahren umfassen die orale Verabreichung oder die Verabreichung durch Inhalation.

[0065] Besonders bevorzugt ist die Zuführung in Form der Mikroimpfung, wobei es sich um eine Methode handelt, um genetisches Material in situ in Zellen eines Patienten zu liefern. Diese Methode ist in dem US-Patent Nr. 5 697 901 beschrieben.

[0066] Außerdem kann das Nukleinsäurekonstrukt gemäß dem dritten Aspekt der Erfindung mit Hilfe von Zuführungsvektoren verabreicht werden. Diese schließen virale Zuführungsvektoren wie etwa die im Fach bekannten Adenovirus- oder Retrovirus-Zuführungsvektoren ein. Weitere nichtvirale Zuführungsvektoren schließen Lipid-Zuführungsvektoren, darunter die im Fach bekannten Liposomen-Zuführungsvektoren, ein.

[0067] Die Verabreichung kann auch mittels transformierter Wirtszellen erfolgen. Derartige Zellen schließen Zellen ein, die von dem Subjekt, in welches das Nukleinsäurekonstrukt durch im Fach bekannte Gentransferverfahren zu übertragen ist, geerbt worden sind, wobei anschließend die transformierten Zellen in einer Kultur herangezogen und dem Subjekt transplantiert werden.

[0068] So wie der Begriff "Gentherapie" hier gebraucht wird, bezeichnet er das Einbringen von Genen durch rekombinante Genmanipulation von Körperzellen (somatische Gentherapie) zum Nutzen des Patienten. Außerdem kann die Gentherapie in ex vivo- und in vivo-Verfahren unterteilt werden. Die ex vivo-Gentherapie ist mit der Entnahme von Körperzellen eines Patienten, der Behandlung der entnommenen Zellen mit einem Vektor, d.h. einem rekombinanten Vektor, und einer anschließenden Rückgabe der behandelten Zellen an den Patienten verknüpft. Die in vivo-Gentherapie ist mit der direkten Verabreichung des rekombinanten Genvektors, beispielsweise durch intravenöse oder intravaskuläre Mittel, verknüpft.

[0069] Vorzugsweise wird für ein Nukleinsäurekonstrukt zur Verwendung in der Gentherapie der Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung in dem zu behandelnden Subjekt exprimiert. Folglich ist für Menschen der Promotor vorzugsweise ein Promotor menschlichen Ursprungs von einem menschlichen Gen oder von einem Gen, das typisch in Menschen exprimiert wird, wie etwa der Promotor des menschlichen Cytomegalovirus (CMV). Die vorliegende Erfindung stellt ein Nukleinsäurekonstrukt wie oben definiert für eine Verwendung bei

der Manipulation von somatischen Zellen von Menschen oder nicht-menschlichen Säugetieren oder der Manipulation von Keimbahnzellen eines nicht-menschlichen Säugetiers bereit.

[0070] Die vorliegende Erfindung stellt folglich ein therapeutisches Protein bereit, das aus menschlichen Zellen gewonnen ist, die in vitro behandelt werden, um ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß dem dritten Aspekt der Erfindung in diese einzufügen.

[0071] Die Manipulation der einem Patienten entnommenen Zellen erfolgt mit dem Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der Erfindung in einem geeigneten Vektor. So, wie er hierin gebraucht wird, deckt der Ausdruck "manipulierte Zellen" mit einem rekombinanten Vektor transfizierte Zellen ab.

[0072] Außerdem wird die Verwendung der transfizierten Zellen bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer mit einer Entzündung einhergehenden Funktionsstörung in Erwägung gezogen.

[0073] Ein fünfter Aspekt der Erfindung stellt ein Nukleinsäurekonstrukt oder ein dadurch codiertes Protein gemäß dem dritten Aspekt der Erfindung für eine Verwendung in der Medizin, vorzugsweise für eine Verwendung bei der Gentherapie, bereit.

[0074] Außerdem kann die vorliegende Erfindung in der Veterinärmedizin bei der Behandlung/Prophylaxe von Haustieren, darunter Pferde und Gefährten des Menschen (z.B. Katzen und Hunde), und von Nutztieren, darunter Spezies der Familien der Schafe, Schweine, Ziegen, Rinder und Pferde, Anwendung finden.

[0075] Ein sechster Aspekt der Erfindung schafft die Verwendung des Nukleinsäurekonstrukturts gemäß dem dritten Aspekt der Erfindung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer mit einer Entzündung einhergehenden Funktionsstörung. Im vorliegenden Kontext kann die mit einer Entzündung einhergehende Funktionsstörung irgendeinen oder mehrere der weiter oben erörterten, mit einer Entzündung verbundenen Zustände einschließen.

[0076] Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen, die das Nukleinsäurekonstrukt oder Proteine des dritten Aspekts der Erfindung aufweisen. Daher kann das Nukleinsäurekonstrukt der vorliegenden Erfindung in Kombination mit dem pharmazeutisch akzeptablen Trägermittel oder pharmazeutisch akzeptablen Trägermitteln verwendet werden. Solche Trägermittel können physiologische Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose, Liposomen, Wasser, Glycerin, Ethanol und Kombinationen davon einschließen, ohne hierauf beschränkt zu sein.

[0077] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können auf jede wirksame und zweckmäßige Weise, die für eine Behandlung einer Krankheit des Patienten effektiv ist, verabreicht werden, wobei beispielsweise eine Verabreichung auf oralem, topischem, intravenösem, intramuskulärem, intranasalem oder intradermalem Wege u.a. eingeschlossen ist. Bei der Therapie oder als ein Prophylaktikum kann das aktive Agens einem Individuum als eine injizierbare Zusammensetzung verabreicht werden, beispielsweise als eine sterile wässrige Dispersion, die vorzugsweise isotonisch ist.

[0078] Es wird erwartet, dass bei einer Verabreichung an Säuger und insbesondere an Menschen die Tagesdosierung des aktiven Agens wenigstens 0,01 mg/kg Körpergewicht, typisch ungefähr 1 mg/kg sein wird. Auf alle Fälle wird der Arzt die tatsächliche Dosierung bestimmen, die für ein Individuum am besten geeignet ist, wobei sie von Faktoren, die das Alter, das Gewicht, das Geschlecht und die Reaktion des Individuums einschließen, abhängig sein wird. Die oben genannten Dosierungen gelten in beispielhafter Weise für einen Durchschnittsfall. Es kann selbstverständlich Fälle geben, in denen höheren oder niedrigeren Dosierungen der Vorzug zu geben ist, wobei diese im Rahmen dieser Erfindung sind.

[0079] Ein siebter Aspekt der Erfindung stellt ein Fusionsprotein zur Verfügung, das ein LAP von TGFβ-1, -2, -3, -4 oder -5 und eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle aufweist, wobei das Fusionsprotein mit einem pharmazeutisch aktiven Protein assoziiert ist. Ferner stellt die Erfindung ein Nukleinsäurekonstrukt bereit, welches das Fusionsprotein des siebten Aspekts der Erfindung codiert. Das Nukleinsäurekonstrukt weist vorzugsweise eine ein LAP von TGFβ-1, -2, -3, -4 oder -5 codierende Nukleinsäuresequenz auf, die an eine Nukleinsäuresequenz angrenzt, die eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle codiert. Vorzugsweise ist die ein LAP von TGFβ-1, -2, -3, -4 oder -5 codierende Nukleinsäuresequenz mit einer Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle codierenden Nukleinsäuresequenz funktional verbunden. Das Nukleinsäurekonstrukt, das das Fusionsprotein codiert, kann die Nukleotide 1-861 von [Fig. 1](#) oder die Nukleotide 585-1352 von [Fig. 2](#) oder eine Sequenz von Nukleotiden, die bei Verwendung der vorein-

gestellten Parameter des BLAST-Computerprogramms, das vom HGMP zur Verfügung gestellt wird, eine Identität von mindestens 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % oder 99 % damit hat, aufweisen.

[0080] Die Erfindung stellt ferner das Fusionsprotein des siebten Aspekts der Erfindung, optional mit dem hier beschriebenen latent TGFβ-bindenden Protein (LTBP) assoziiert, bereit.

[0081] Das Fusionsprotein des siebten Aspekts der Erfindung kann über eine Peptidbindung mit dem pharmazeutisch aktiven Protein assoziiert sein. Alternativ kann das Fusionsprotein mit dem pharmazeutisch aktiven Protein über eine chemische Bindung, z.B. durch Vernetzen des Fusionsproteins mit einer chemischen Verbindung wie etwa einem chemotherapeutischen Agens, einem synthetischen Wirkstoff oder PNA, assoziiert sein.

[0082] Vorzugsweise ist das pharmazeutisch aktive Protein an den C-Terminus der Aminosäuresequenz der Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytischen Spaltstelle in dem Fusionsprotein des siebten Aspekts der Erfindung gebunden. Vorzugsweise ist das pharmazeutisch aktive Protein mit dem C-terminalen Rest der Aminosäuresequenz der Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytischen Spaltstelle kontinuierlich.

[0083] Ein achter Aspekt der Erfindung schafft ein Verfahren zur Aufbereitung des Fusionsproteins und des assoziierten pharmazeutisch aktiven Proteins des siebten Aspekts der Erfindung, das die Herstellung des Fusionsproteins auf rekombinante Weise durch Expression in einer Wirtszelle, Reinigung des exprimierten Fusionsproteins und Verbindung des pharmazeutisch aktiven Proteins mit dem gereinigten Fusionsprotein mittels Peptidbindungen oder chemischer Vernetzung aufweist.

[0084] Ein neunter Aspekt der Erfindung stellt ein Fusionsprotein und assoziiertes pharmazeutisch aktives Protein gemäß dem siebten Aspekt der Erfindung für eine Verwendung in der Medizin bereit.

[0085] Das Fusionsprotein mit assoziiertem pharmazeutisch aktivem Protein des siebten Aspekts der Erfindung kann allein oder zusammen mit weiteren Verbindungen, wie etwa therapeutischen Verbindungen, z.B. entzündungshemmenden Arzneistoffen, zytotoxischen Agenzien, zytostatischen Agenzien oder Antibiotika, verwendet werden.

[0086] Vorzugsweise eignet sich das Fusionsprotein und assoziierte pharmazeutisch aktive Protein des siebten Aspekts der Erfindung für eine direkte Verabreichung an einen Patienten, wie hierin beschrieben wird.

[0087] Ein zehnter Aspekt der Erfindung schafft die Verwendung des Fusionsproteins und assoziierten pharmazeutisch aktiven Proteins gemäß dem siebten Aspekt der Erfindung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer mit einer Entzündung einhergehenden Funktionsstörung. Im vorliegenden Kontext kann die mit einer Entzündung einhergehende Funktionsstörung irgendeine oder mehrere der weiter oben erörterten, mit einer Entzündung verbundenen Krankheiten umfassen.

[0088] Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Zusammensetzungen, die das Fusionsprotein und assoziierte pharmazeutisch aktive Protein des siebten Aspekts der Erfindung aufweisen. Deshalb kann das Fusionsprotein und assoziierte pharmazeutisch aktive Protein in Kombination mit dem pharmazeutisch akzeptablen Trägermittel oder pharmazeutisch akzeptablen Trägermitteln verwendet werden. Solche Trägermittel können physiologische Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose, Liposomen, Wasser, Glycerin, Polyethylenglykol, Ethanol und Kombinationen davon einschließen, ohne jedoch hierauf beschränkt zu sein.

[0089] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können auf jede wirksame und zweckmäßige Weise, die für eine Behandlung einer Krankheit des Patienten effektiv ist, verabreicht werden, wobei beispielsweise eine Verabreichung auf oralem, topischem, intravenösem, intramuskulärem, intranasalem oder intradermalen Wege u.a. eingeschlossen ist. Bei einer Therapie oder als ein Prophylaktikum kann das aktive Agens dem Individuum als eine injizierbare Zusammensetzung verabreicht werden, beispielsweise als eine sterile wässrige Dispersion, die vorzugsweise isotonisch ist.

[0090] Außerdem schafft die Erfindung einen Komponentensatz, der ein Nukleinsäurekonstrukt des dritten Aspekts der Erfindung oder ein Fusionsprotein und assoziiertes pharmazeutisch aktives Protein gemäß dem siebten Aspekt der Erfindung sowie ein Verabreichungshilfsmittel, darunter Tabletten für eine orale Verabreichung, Inhalatoren für eine Verabreichung über die Lunge und injizierbare Lösungen für eine intravenöse Verabreichung, ohne hierauf beschränkt zu sein, enthält.

[0091] Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung schafft eine Verwendung, bei der einem pharmazeutisch aktiven Protein Latenz verliehen worden ist, welches ein Cytokin, vorzugsweise Interferon, ist, wobei das Verfahren das Bilden eines Fusionsproteins, das ein mit Latenz assoziiertes Peptid (LAP) von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 aufweist, in Assoziation mit einer Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytischen Spaltstelle und dem pharmazeutisch aktiven Protein einschließt. Vorzugsweise folgen die MMP-proteolytische Spaltstelle und das LAP von TGF β -1, -2, -3, -4 auf das pharmazeutisch aktive Protein, in der Art: aktives Agens – Spaltstelle – LAP.

[0092] Alle bevorzugten Merkmale des zweiten Aspekts sowie der nachfolgenden Aspekte der Erfindung gelten wie für den ersten Aspekt mit den notwendigen Änderungen.

[0093] Die vorliegende Erfindung wird nun lediglich beispielhaft anhand der beigefügten Figuren beschrieben, worin:

[0094] [Fig. 1](#) eine Nukleotidsequenz (A) und die entsprechende Aminosäuresequenz (B) des LAP-mIFN β -Konstrukts zeigt, wobei die eingerahmte Folge der Sequenz der MMP-Spaltstelle einschließlich der Linker-Sequenz entspricht;

[0095] [Fig. 2](#) eine Nukleotidsequenz (A) und die entsprechende Aminosäuresequenz (B) des mIFN β -LAP-Konstrukts zeigt, wobei die eingerahmte Folge der Sequenz der MMP-Spaltstelle einschließlich der Linker-Sequenz entspricht;

[0096] [Fig. 3](#) Aminosäuresequenzen der Vorläuferdomäne von TGF β -1, -2, und -3 (menschlich, Hu), TGF β -4 (Huhn, Ck), TGF β (Frosch, Fg) zeigt, wobei Pfeile die Position der proteolytischen Bearbeitung angeben, die zu einer Abspaltung des Signalpeptids von TGF β -1 und von den reifen TGF β s führt; N-gebundene Glycosylierungsorte sind wie die zelluläre Integrin-Erkennungssequenz unterstrichen (Roberts und Sporn: Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, MB and Roberts, AB, Springer-Verlag, Kapitel 8, 422 (1996));

[0097] [Fig. 4](#) Sequenzen von Proteinspaltstellen von Matrix-Metallproteinasen (MMPs) (Nagase und Fields, Biopolymers, 40, 399-416 (1996)) zeigt;

[0098] [Fig. 5](#) eine schematische Darstellung der in dieser Studie verwendeten Fusions-Proteine und ihre mutmaßliche Faltung zeigt: (A) Primärstruktur rekombinanter, latenter Proteine. Die lineare Sequenzanordnung der LAP-, MMP- und mIFN β -Komponenten in den zwei Konfigurationen, die in dieser Studie verwendet werden, LAP-mIFN β und mIFN β -LAP, sind gezeigt. Das Kästchen am Amino-Terminus des LAP-mIFN β und mIFN β -LAP stellt das natürlich vorkommende Signalsequenzpeptid für eine Sekretion von entweder TGF β oder mIFN β dar. (B) Mutmaßliche Faltung und Wechselwirkungen eines latenten Cytokins mit LTBP. Bei dem LTBP sind die einem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-) ähnlichen Wiederholungen als kleine Rechtecke dargestellt, die cysteinreichen Wiederholungen und die Hybrid-Domäne sind als Kreise und die für eine proteolytische Spaltung empfindliche Hinge Region ist als eine durchgehende schwarze Linie dargestellt. Disulfid-Brücken sind als durchgehende graue Linien dargestellt;

[0099] [Fig. 6](#) den Nachweis rekombinanter Fusionsproteine in Überständen von CHO-Zellen zeigt: Nicht denaturierende SDS-PAGE von Überständen von CHO-Zellen (Spur 1), LAP-mIFN β -transfiziert (Spur 2) und mIFN β -LAP (Spur 3); die Positionen der Doppelbanden der neu exprimierten Fusionsproteine sind mit einem Doppelpfeil markiert; es sind die Positionen der Markierungen der relativen Molekülmasse (M. W.) in kDa dargestellt;

[0100] [Fig. 7](#) eine Immunpräzipitation von CHO-Zellüberständen mit anti-LAP-Antikörpern und – schneiden mit MMP1 und MMP3 zeigt LAP-mIFN β (Spuren 1, 3 und 5) und mIFN β -LAP (Spuren 2, 4 und 6). Unbehandelte Kontrollen (Spuren 1 und 2), mit MMP3 behandelt (Spuren 3 und 4), mit MMP1 behandelt (Spuren 5 und 6). Das SDS-PAGE-Verfahren wurde unter denaturierenden Bedingungen ausgeführt. Die Positionen des LTBP und der Fusionsproteine sind durch Pfeile angegeben. Die mit einem Sternchen (*) markierten Pfeile geben das Vorhandensein von MMP-Spaltprodukten an. Es sind die Positionen der Markierungen der relativen Molekülmasse (M.W.) eines Markers in kDa dargestellt;

[0101] [Fig. 8](#) eine Immunpräzipitation von MTX-selektierten CHO-Zellüberständen mit anti-LAP- und anti-IFN β -Antikörpern sowie eine Spaltung mit MMP1, MMP3 und Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigt: (A) LAP-mIFN β und (B) mIFN β -LAP. Unbehandelte Überstände (Spuren 1 und 5), mit MMP1 behandelt (Spuren 2 und 6), mit MMP3 behandelt (Spuren 3 und 7) und mit Gelenkflüssigkeit von Patienten mit

rheumatoider Arthritis behandelt (Spuren 4 und 8). Immunpräzipitationen mit monoklonalen anti-LAP- (Spuren 1-4) und anti-IFN β -Antikörpern (Spuren 5-8). Die Positionen des LTBP und der Fusionsproteine sind durch Pfeile angegeben. Die mit einem Sternchen (*) markierten Pfeile geben das Vorhandensein von MMP-Spaltprodukten an;

[0102] [Fig. 9](#) Kinetiken der IFN-Aktivität nach einer Inkubation in einem Medium, allein oder mit Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatischer Arthritis zeigt: A. LAP-mIFN β ; Tafel B: mIFN β -LAP;

[0103] [Fig. 10](#) die Inhibition einer durch Kollagen herbeigeführten Arthritis durch eine DNA-Injektion mit LAP-mIFN β zeigt: Die Tafel A zeigt die Schwellung der Hinterpfote, und die Tafel B zeigt die Entwicklung des klinischen Scores ab dem Zeitpunkt der Re-Immunisierung mit Kollagen vom Typ II;

[0104] [Fig. 11](#) die vorausgesagte Nukleotidsequenz (A) und die entsprechende Aminosäuresequenz (B) des hIFN β -LAP-Konstrukts zeigt;

[0105] [Fig. 12](#) die vorausgesagte Nukleotidsequenz (A) und die entsprechende Aminosäuresequenz (B) des LAP-hIFN β -Konstrukts zeigt.

[0106] Die Erfindung wird nun mit Bezug auf die folgenden Beispiele beschrieben, die nicht einschränkend sind.

Beispiel 1: Bildung von hLAP-mIFN β -, mIFN β -hLAP und pLAP-mIFN β -Fusionsproteinen

Verfahren

Klonieren eines GS-MMP-GS-Linkers in EcoR1-Not1-Stellen von pcDNA3

[0107] Es wurde ein Vektor gebildet, indem der GS-MMP-GS-Linker in mit EcoR1-Not1 gespaltene pcDNA3 eingefügt wurde. pcDNA3 ist ein Expressionsvektor (von Invitrogen), der den unmittelbar frühen Promotor und Enhancer des menschlichen Cytomegalovirus zusammen mit RNA-Verarbeitungs-Signalen, die eine Transkription ermöglichen, aufweist.

[0108] Ein doppelsträngiges Desoxyoligonukleotid, das die Sequenz GLY GLY GLY GLY SER PRO LEU GLY LEU TRP ALA GLY GLY GLY SER codiert, wurde wie folgt konstruiert:

Sense-Oligo:

5'AATTGGGGAGGCGGATCCCGCTGGCTTGGCGGGAGGGGCTCAGC3'

Antisense-Oligo:

5'GGCGCTGAGCCCCCTCCGCCAAAGCCGAGCGGGATCCGCCTCCCCG3'

[0109] Es wurden synthetische Desoxyoligonukleotide von Life Technologies Ltd. (Paisley, GB) bezogen. Reassoziierte Desoxyoligonukleotide wurden in mit EcoR1-Not1 gespaltene pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, Die Niederlande) kloniert. Der rekombinante Klon verlor seine EcoRV-Stelle und gewann eine zusätzliche BamH1-Stelle hinzu. Die Plasmidklone wurden mittels Southern-Blot-Hybridisierung mit endmarkierten Oligos beurteilt. Der Klon wurde als GS-MMP-GS bezeichnet. Die Restriktionsenzyme und die DNA-modifizierenden Enzyme wurden von New England Biolabs, Hitchin, GB, bezogen.

Bildung von LAP (TGF β) am NH₂-Ende, gefolgt von GS-MMP-GS und reifem IFN β

[0110] Ein LAP (TGF β) gefolgt von GS-MMP-GS und reifem IFN β aufweisender Vektor wurde folgendermaßen gebildet:

LAP von TGF β als eine 5'-Einheit (mit Signalpeptid) mit HindIII- und EcoR1-Enden wurde mittels PCR aus Plasmid-TGF β -Babe neo (Chernajovsky et.al.: Gene Ther. 4, 553-559 (1997)) kloniert. Es wurden folgende Primer verwendet:

Sense-Primer: 5' CCAAGCTTATGCCGCCCTCCGGGCTGCGG 3'

Antisense-Primer: 5' CCGAATTGCTTGAGATGCTGGCCCT 3'

[0111] Nach der PCR wurde das Produkt mit Phenol extrahiert, seine Enden wurden mit Klenow aufgefüllt, und es wurde mit HindIII und EcoR1 verdaut. Das 820 Basenpaare umfassende Produkt wurde in mit den gleichen Enzymen geschnittenem GS-MMP-GS-Plasmid kloniert. Der Klon wurde TGF β -GS-MMP-GS-Linker genannt. Reifes mIFN β (von der Maus) mit 5'Not1- und 3'Xba1-Stellen wurde mittels PCR vom Klon Aphrodite

(Triantaphylloopoulos et.al.: Gene Ther. 5, 253-263 (1998)) synthetisiert. Dazu wurden die folgenden Primer verwendet:

Sense-Primer: 5' CGCGGCCGCAATCAACTATAAGCAGCTCCAG 3'

Antisense-Primer: 5' GGTCTAGATCAGTTGGAAGTTCTGGTAAG 3'

[0112] Nach der PCR wurde das Fragment mit Phenol extrahiert, die Enden wurden mit Klenow aufgefüllt und es wurde mit Not1 und Xba1 verdaut. Der LAP-mIFN β -Klon wurde durch Klonieren des Fragments in Not1- und Xba1-Stellen des TGF β -GS-MMP-Gs-Linker-Plasmids erhalten. Die Nukleotidsequenz und die Aminosäuresequenz des LAP-mIFN β -Inserts sind in [Fig. 1](#) gezeigt.

Bildung von mIFN β am NH₂-Ende gefolgt von GS-MMP-GS und reifem LAP (TGF β)

[0113] Ein reifes mIFN β gefolgt von GS-MMP-GS und LAP (TGF β) aufweisender Vektor wurde folgendermaßen gebildet:

Vorläufer-IFN β mit Signalpeptid und ohne Stoppcodon wurde mittels PCR wie oben angegeben unter Verwendung der folgenden Primer synthetisiert:

Sense-Primer: 5' CCAAGCTTATGAACAAACAGGTGGATCCTC 3'

Antisense-Primer: 5' CCGAATTCGTTTGGAAAGTTCTGGTAAG 3'

[0114] Nach der PCR-Synthese, der Phenolextraktion und dem Auffüllen mit einem Klenow-Fragment von DNA-Polymerase wurde das DNA-Produkt mit HindIII und EcoR1 verdaut und in Plasmid-pCDNA3-GS-MMP-GS an den gleichen Stellen kloniert. Der Klon wurde IFN β -GS-MMP-GS-Linker genannt. Reifes LAP (TGF β) mit Stoppcodon wurde mittels PCR wie oben angegeben unter Verwendung der folgenden Primer synthetisiert:

Sense-Primer: 5' CGCGGCCGCACTATCCACCTGCAAGACTATC 3'

Antisense-Primer: 5' GGTCTAGATCAGTTGCAGATGCTGGGCCCT 3'

[0115] Nach der PCR und der Phenolextraktion wurden die Enden mit Klenow aufgefüllt, und es wurde mit Not1 und Xba1 verdaut. Der mIFN β -LAP-Klon wurde durch Klonieren des PCR-Fragments an den gleichen Stellen des Plasmids IFN β -GS-MMP-GS erhalten. Die Nukleotidsequenz und die Aminosäuresequenz des mIFN β -LAP-Inserts sind in [Fig. 2](#) gezeigt.

Klonieren von LAP (Schwein) vor mIFN β

[0116] Mutierte Schweine-cDNA, die von Cys bis Ser (223/225) mutiert war, wurde als Plasmid pPK14 (Sanderson et.al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 2572-2576 (1995)) freundlicherweise von P.J. Wirth, NIH, Bethesda, Maryland, zur Verfügung gestellt. Das Klonieren des Schweine-LAP erfolgte mittels PCR unter Verwendung des folgenden Primer-Satzes.

[0117] Der Sense-Primer, der am Signalpeptid begann, war:

5' CGCCCATGGCGCCTCGGGGCCT 3'. Dieser Primer weist in der Umgebung des Initiator-ATG eine modifizierte Sequenz auf um eine Nco1-Stelle zu schaffen.

Antisense-Primer: 5' CCGAATTCGCTGTGCAGGTGCTGGGCCCT 3'

[0118] Nach der PCR-Synthese wurde das PCR-Produkt an den Enden mit Klenow-DNA-Polymerase aufgefüllt, mit EcoR1 geschnitten, in mit HindIII geschnittenem LAP-mIFN β -Plasmid kloniert (aufgefüllt) und dann mit EcoR1 geschnitten (Austausch des menschlichen LAP). Das Konstrukt wurde PorcLap-mIFN β genannt.

Ergebnisse

Strukturbetrachtungen

[0119] Um ein latentes Cytokin unter Verwendung der LAP-Domäne von TGF β zu entwickeln wurden Fusionsproteine mit zwei Konformationen gebildet, wovon die eine LAP am Amino-Terminus von Maus-IFN β (siehe [Fig. 1](#)) und das andere an dessen COOH-Ende (siehe [Fig. 2](#)) aufwies. Um ein Processing des LAP-mIFN β -Proteins bei Arg 278 des LAP zu vermeiden, wurde sich von den Aminosäuren Met1 bis Ser273 erstreckendes LAP kloniert. Auf diese Sequenz folgten ein flexibler Linker (GGGGS), ein mutmaßliches MMP9 (Peng et.al.: Human Gene Therapy, 8, 729-738 (1997); Ye et.al.: Biochemistry, 34, 4702-4708 (1995)) oder ein mutmaßliches MMP1 (Nagase und Fields, Biopolymers, 40, 399-416 (1996)) oder ein mutmaßliches MMP1 (Nagase und Fields: Biopolymers, 40, 399-416 (1996)), eine Schnittstelle (PLGLWA) und ein weiterer flexibler Ab-

schnitt (GGGGSAAA), gefolgt von reifem mIFN β (bei der Aminosäure Ile-22 beginnend). Das Einbetten der MMP-Schnittstelle in einen hydrophilen Bereich sollte die Zugänglichkeit für Enzymangriffe erleichtern. Es ist gezeigt worden, dass das Kernstück der Schnittstelle (PLGL) als Peptid durch MMP2 und in einer anderen Version (PLGI) auch durch MMP3, MMP7 und MMP8 gespaltet wird (Nagase und Fields: Biopolymers, 40, 399-416 (1996)).

[0120] Das IFN β -LAP-Molekül bestand aus der Vorläufer-mIFN β -Sequenz, deren Stopcodon mutiert war, um ein Überlesen des flexiblen Linkers und der MMP-Stelle gefolgt von der reifen Sequenz des LAP (von Leu-29 bis Ser-273) zu ermöglichen.

[0121] Die nicht verarbeiteten LAP-mIFN β - und mIFN β -LAP-Fusionsproteine weisen eine erwartete relative Molekülmasse von 52,375 bzw. 51,768 Dalton auf. Die Primärsequenz dieser Fusionsproteine enthält vier mögliche N-Glycosylierungsorte. Eine schematische Darstellung der Primärstruktur und der mutmaßlichen Faltung dieser Proteine sowie ihre möglichen Interaktionen mit LTBP sind in [Fig. 5](#) gezeigt. Auf der rechten Tafel von [Fig. 5B](#) ist die Faltung von LAP-mIFN β gezeigt, die der Faltung von nativen TGF β ähnlich ist. Nahe dem Amino-Terminus (N) des LAP-mIFN β interagiert Cys 33 mit der dritten 8-Cystein-reichen Wiederholung von LTBP, während von Cys 224 und 226 erwartet wird, dass sie das Protein durch intermolekulare Disulfid-Bindungen dimerisieren (Saharinen et.al.: Cytokine and Growth Factors, 10, 99-117 (1999)). Auf der linken Tafel von [Fig. 5B](#) ist die Struktur von mIFN β -LAP gezeigt. Cys 33 befindet sich nun hinter der MMP-Spaltstelle, und Cys 224 und 226 sind dem Carboxy- (C-) Ende des Proteins näher.

Beispiel 2 – Zelltransfektionsuntersuchungen

Verfahren

Transfektion in DHFR-defiziente Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters (CHO)

[0122] Dihydrofolatreduktase (DHFR) -defiziente CHO-Zellen wurden in einem HAM-F12-Medium (Life Technologies Ltd., Paisley, GB) mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS) (Life Technologies Ltd.), Penicillin/Streptomycin und Glutamin gehalten.

[0123] LAP-mIFN β oder mIFN β -LAP exprimierende pcDNA3-Plasmide (20 μ g) wurden jeweils mit Pvul linearisiert und gesondert mit Pvul-geschnittenem pSV₂DHFR (1 μ g) ligiert (Chernajovsky et.al.: DNA, 3, 297-308 (1984)). Nach einer Phenolextraktion wurden die Plasmide in 300 μ l mit T4-DNA-Ligase bei 16°C über einen Zeitraum von 3 Tagen ligiert. Die DNA wurde in 0,4 M NH₄-Acetat gefällt und in Wasser wieder resuspendiert, um als 1 ml Calcium-Phosphat-Co-präzipitat zu 0,5 \times 10⁶ CHO-Zellen auf 9-cm-Platten, die 24 h früher angeimpft wurden, hinzugefügt zu werden. 4 h später wurden die Zellen mit 10 %-igem Glycerin in HAM-F12 ohne FBS behandelt, in FBS-freien Medien gewaschen und 48 h in Ruhe gelassen. Die transfizierten Zellen wurden trypsinisiert und auf sechs 9-cm-Platten aufgeteilt. Die Selektion wurde in einem nukleosidfreien Alpha-DMEM-Medium (PAA Laboratories, Linz, Österreich), 10 % dialysiertem FBS (PAA Laboratories) und 1 mg/ml G418 (Geneticin, von Life Technologies Ltd.) durchgeführt. Das Selektionsmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Zwei bis drei Wochen später zeigten sich Zellklone, die als eine Population gehalten wurden (Chernajovsky et.al.: DNA, 3,297-308 (1984)).

[0124] Für eine Genamplifikation wurden außerdem Zellen mit Methotrexat (MTX) (Sigma, Poole, GB) bei Einsatz von 50 nM (LAP-mIFN β) bzw. 12,5 nM (mIFN β -LAP) selektiert.

[0125] Die Zellklone wurden durch Ring-Klonieren isoliert und in Selektionsmedien expandiert.

Bestimmung der biologischen Aktivität des IFN β

[0126] Die biologische Aktivität von Maus-IFN β wurde durch Inhibieren des zytopathischen Effekts einer Infektion mit dem EMC-Virus (freundlicherweise von I. Kerr, Imperial Cancer Research Fund, London) in Maus-LTK-Zellen unter Verwendung von doppelt verdünnten Zellüberständen wie beschrieben (Triantaphyllopoulos et.al.: Gene Ther. 5, 253-263 (1998)) bestimmt. Wie angegeben wurden serumfreie CHO-Überstände durch Zentrifugieren unter Verwendung von Vivaspin-Filtern (Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit einer Grenze bei 30 000 kDa konzentriert.

Metabolische Markierung von CHO-Zellen

[0127] Konfluente Platten mit dauerhaft transfizierten Zellen oder nicht transfizierten CHO-Zellen wurden mit einem cystein-methionin-freien Medium (Life Technologies Ltd.), das 10 % dialysiertes FBS enthielt und mit Thymidin, Glutamin, Penicillin/Streptomycin und 150 µg/ml L-Prolin supplementiert war, gewaschen. Die Markierung erfolgte entweder über Nacht oder über 48 h bei Anwesenheit einer ^{35}S -Methionin-Cystein-Mischung (Amersham-Pharmacia Biotech, Bucks, GB) mit 1 Ci/mmol bei 250 mCi/Platte in 5 ml Medium.

[0128] Nach Ablauf der Markierungsperiode wurden die Überstände gesammelt, Zellreste zentrifugiert und klare Überstände wie angegeben mit Serin-Protease-Inhibitoren (SPI) (Pepstatin-A mit 10 µg/ml, Aprotinin mit 1 µg/ml, Chymostatin mit 10 µg/ml, Leupeptin mit 10 µg/ml und AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-Benzol-Sulfonylfluorid, HCl) bei 200 µM (alle von Calbiochem, Beeston, GB) versetzt. Diese Überstände wurde bis zu ihrer Verwendung für Immunfällungsuntersuchungen bei -70°C eingefroren aufbewahrt.

Immunpräzipitation

[0129] Überstände von metabolisch markierten Zellen wurden mit (400 µl) Protein-G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech), äquilibriert in PBS mit 0,1 % NP40 (50 % Kugelchen/vol) (BDH, Poole, GB), vorgeklärt. Es wurden Überstände verwendet, die insgesamt 25×10^6 cpm mittels Trichloressigsäure (TCA) (Sigma) gefälltes Protein enthielten (ungefähr 5-7 ml Zellüberstände). Nach 4 h Mischen durch Stürzen und Nichtstürzen bei 4°C wurde die Protein-G-Sepharose durch Zentrifugieren (2000 Umdrehungen/min, 5 min) entfernt. Der geklärte Überstand wurde entweder mit Ziegen-Antihuman-LAP-Antikörpern (R&D Systems, Oxon, GB, mit 0,9 µg/ml) oder monoklonalem Ratten-Anti-mIFN β (7F-D3, AMS, Abingdon, GB, bei einer Verdünnung von 1/250) 3 bis 4 h bei 4°C inkubiert.

[0130] Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden dann durch Mischen mittels Stürzen und Nichtstürzen bei 4°C über Nacht an Protein-G-Sepharose (700 µl einer 50 % Lösung) gebunden. Die Protein-G-Sepharose-Kugelchen wurden dreimal mit 5 ml 0,1 % NP40 in PBS gewaschen. Die an die Kugelchen gebundenen Proteine wurden in Fraktionen von 50 µl Kugelchen in enge Röhrchen aufgeteilt und entweder direkt in Laemmli-Puffer resuspendiert oder für MMP-Reaktionen prior zu einer SDS-PAGE in 10 %-igem Acrylamid-Gel verwendet. Alternativ wurden Überstände mit MMPs behandelt und dann immunpräzipitiert. Die Gele wurden 30 min lang in 7 %-iger Essigsäure und 10 %-igem Methanol fixiert und mit 1 M Natriumsalicylat behandelt, bevor sie getrocknet und einer Autoradiographie mit einem Röntgenfilm ausgesetzt wurden. Die Protein-Farbmarker für die relative Molekulmasse waren von Amersham-Pharmacia Biotech.

[0131] Überstände von MTX-selektierten Zellen wurden mit MMPs oder Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA/SF: 1/5) über Nacht behandelt, die Reaktionen wurden mit 10 mM EDTA abgestoppt, anschließend erfolgte die Immunpräzipitation.

MMP-Verdauung

[0132] Rekombinant hergestelltes pro-MMP9 (freundlicherweise von R. Friedman, Wayne University, Detroit, zur Verfügung gestellt) oder aktives MMP1 und MMP3 (freundlicherweise von H. Nagase, Kennedy Institute of Rheumatology, London, zur Verfügung gestellt) wurde über Nacht bei 37°C mit immunpräzipitierten Überständen von CHO-Zellen in 20 mM TrisHCl pH 7,4, 5 mM CaCl₂, 140 mM NaCl und 0,1 % Brij 35 (alle von Sigma) in 50 µl bei 1 µg/ml inkubiert oder wurde direkt zu Zellüberständen (4 µg/ml) hinzugegeben. Bei einigen Versuchen wurde Aminophenyl-Quecksilberacetat (APMA) (Sigma) mit 10 µM eingesetzt, um über Nacht bei 37°C das pro-MMP9 zu aktivieren (Ogata et.al.: J. Biol. Chem. 270, 18506-18511 (1995)).

Ergebnisse

Tabelle 1: Bestimmung der biologischen Aktivität von mIFN β

Probe	antivirale Aktivität (U/ml)
nichttransfiziert	0
mIFN β -LAP	210
LAP-mIFN β	0

[0133] LAP-mIFN β - und mIFN β -LAP-rekombinante Proteine wurden nach einer dauerhaften Cotransfektion linearisierten Plasmids mit dem DHFR-Plasmid (pSV₂DHFR) (Chernajovsky et.al.: DNA, 3, 297-308 (1984)) und Selektion sowohl in G418 als auch in dialysiertem Serum in Dihydrofolatreduktase-defizienten Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters (DHFR CHO) (Klon CHO-K1) exprimiert.

[0134] Wie in der Tabelle 1 gezeigt ist, wurde mIFN β -LAP sekretiert, das eine niedrige biologische Restaktivität aufweist, während das LAP-mIFN β völlig "latent" oder inaktiv war. Der Grad der Proteinexpression war ähnlich, wie auch durch Western Blotting mit einem anti-LAP-Antikörper bestätigt wurde (nicht gezeigt).

Biochemische Charakterisierung rekombinanter Proteine

[0135] Sekretierte Proteine von dauerhaft transfizierten Zellen wurden mit ³⁵S-Methionin und Cystein metabolisch markiert. Sowohl die LAP-mIFN β - als auch die mIFN β -LAP-markierten Proteine zeigten unter nicht reduzierenden Bedingungen zwei Hauptbanden bei ungefähr 97 kDa, die bei Überständen aus nicht transfizierten CHO-Zellen nicht festzustellen waren ([Fig. 6](#)).

[0136] Bei einer Immunpräzipitation mit anti-LAP-Antikörpern zeigten LAP-mIFN β - und mIFN β -LAP-Überstände unter reduzierenden Bedingungen drei Banden: eine bei 57 kDa, eine weitere bei 135 kDa und eine weitere, schwächere Komponente bei ungefähr 75 kDa ([Fig. 7](#)). Das Protein bei 135 kDa ist wahrscheinlich das von CHO abgeleitete (LTBP), über Disulfid an LAP gebundene (Saharinen et.al.: Cytokine and Growth Factors, 10, 99-117 (1999))

[0137] Die schwächere Komponente bei 75 kDa ([Fig. 7](#), Spuren 1, 3 und 5) wird bei einer Genamplifikation mit MTX ([Fig. 8A](#), Spuren 1-4) zur von anti-LAP-Antikörpern erkannten Hauptkomponente. Interessanterweise scheint der monoklonale anti-mIFN β -Antikörper, das glycosyierte Produkt mit 75 kDa nicht zu erkennen ([Fig. 8A](#) und [Fig. 7](#), Spuren 5-8), und das anti-LAP erkennt es schlecht in der mIFN β -LAP-Konfiguration des Proteins ([Fig. 8A](#), Spuren 5-8), was darauf schließen lässt, dass die Fusionsproteine verschiedene Konformationen aufweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn das immunpräzipitierte Material mit Enzymen (MMP1 oder MMP3) behandelt und dann mittels SDS-PAGE getrennt wurde. Der Unterschied in der Konformation könnte die unterschiedliche Empfindlichkeit dieser Proteine gegenüber verschiedenen MMPs (siehe unten) und ihren Latenzgrad erklären.

[0138] Die vorausgesagte relative Molekülmasse der sekretierten rekombinannten Proteine beträgt sowohl für LAP-mIFN β als auch für mIFN β -LAP 49,376 Da. Die festgestellte höhere relative Molekülmasse, könnte auf eine Glycosylierung dieser Proteine zurückzuführen sein. Ein Inkubieren der immunpräzipitierten Proteine mit N-Glycosidase F liefert zwei Hauptproteine mit relativen Molekülmassen von 70 kDa und 51 kDa, die dem LTBP bzw. dem Fusionsprotein entsprechen (nicht gezeigt).

MMP-Spaltung rekombinanter Proteine

[0139] Immunpräzipitierte Komplexe wurden über Nacht mit einzelnen MMPs oder Kombinationen davon behandelt. Wie in [Fig. 7](#) gezeigt ist, spalteten pro-MMP9 oder MMP1 das rekombinante Produkt mit 57 kDa nicht sehr effizient. MMP1 war zu einer Spaltung der glycosyierte Form des Fusionsproteins ([Fig. 7](#), Spuren 3 und 4; [Fig. 8A](#), Spur 2) fähig, wohingegen MMP3 allein fähig war, es in verschiedene, getrennte Banden zu verdauen ([Fig. 7](#), Spuren 5 und 6; [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#), Spuren 3 und 7).

[0140] Außerdem wurde die LTBP-Bande durch MMP3 aufgespaltet ([Fig. 7](#), Spur 3 und Spur 4 und [Fig. 8B](#), Spuren 3 und 7), wobei ein Produkt mit 78 kDa entstand. Zwei der verdauten Produkte (MW 36 kDa und 20 kDa) entsprechen den erwarteten LAP- bzw. IFN β -Polypeptid-Fragmenten. Es könnte sein, dass die bei diesen in vitro-Versuchen ersichtlich gewordene Spezifität die antivirale Aktivität, die in Zellüberständen nach einer MMP-Behandlung gemessen wird, nicht vollständig widerspiegelt. Die Tatsache, dass die Zellüberstände schon in einem gewissen Maße aktiviert waren, lässt darauf schließen, dass weitere proteolytische Enzyme, die in dem Überstand vorhanden sind, die latente Cytokin-Komponente aktivieren können. Es trat in vitro keine gesteigerte Proteolyse der Fusionspolypeptide nach der Immunpräzipitation mit einer Kombination von rekombinantern pro-MMP9 mit MMP1 oder MMP3 oder mit APMA-aktiviertem proMMP9 allein auf (nicht gezeigt).

Aktivierung von latentem IFN β durch MMPs

Tabelle 2

Biologische Aktivität (U/ml) von mIFN β aus mit MMPs behandelten konzentrierten Überständen

		pro-MMP9	MMP1	MMP3	pro-MMP9 +MMP1	pro-MMP9 +MMP3
mIFN β -LAP	Versuch 1	1,305	1,740	870	3,481	7,740
LAP-mIFN β	Versuch 1	163	217	109	435	217
	Versuch 2	109	-	-	435	217

[0141] Konzentrierte serumfreie Überstände wurden wie gezeigt mit MMPs behandelt.

- = nicht ausgeführt

Tabelle 3

Biologische Aktivität (U/ml) von mIFN β aus nicht konzentrierten Überständen von MTX-amplifizierten CHO-transfizierten Zellen

Behandlung

	ohne	MMP1	MMP3	pro-MMP9	pro-MMP9 +MMP1	pro-MMP9 +MMP3	RA-S.F.	kein SPI
LAP-mIFN β (50 nM MTX)	288	6144	9216	288	1536	768	1152	768
mIFN β -LAP (12,5 nM MTX)	1536	6144	3072	1536	1536	4608	6144	3072

[0142] Überständen wurden wie angegeben Serinprotease-Inhibitoren (SPI) zugesetzt oder nicht (letzte Spalte) sowie MMPs zugesetzt. Die Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA.SF) ist die gleiche, die auch bei [Fig. 6](#) verwendet wurde.

[0143] Der nicht konzentrierte Überstand wies eine antivirale Aktivität von ungefähr 210 U/ml auf, was ungefähr 0,3 ng Protein entspricht (Iwakura et.al.: J. Biol. Chem. 253, 5074-5079 (1978)). Durch Zentrifugieren durch poröse Membranen wurden Zellüberstände hundertfach konzentriert, um die MMP-Aktivität bei höheren Substratkonzentrationen zu berücksichtigen.

[0144] Nach dem Konzentrieren zeigte sogar der LAP-IFN β -Überstand ohne weitere Behandlung eine antivirale Aktivität (Tabelle 3). Dieses Ergebnis könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass die CHO-Zellen, wie berichtet wurde, verschiedene Proteinasen sekretieren (Goldman et.al.: Cytotechnology, 23, 103-111 (1997); Satoh et.al.: Cytotechnology, 13, 79-88 (1993)), darunter MMPs (Masure et.al.: Eur. J. Biochem. 244, 21-30 (1997)). Möglicherweise können einige natürliche Inhibitoren von MMPs (TIMPs) durch dieses Konzentrationsverfahren von den Proteinasen abgetrennt werden, wodurch ihre Aktivität gefördert wird.

[0145] Überstände von nicht transfizierten CHO-Zellen hatten selbst nach einer Behandlung mit MMPs oder Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA-S.F.) mit 1/5 des Endvolumens (Daten nicht gezeigt) keine biologische Aktivität.

[0146] Eine Zugabe von MMP1 zu konzentrierten Überständen erhöhte die biologische Aktivität leicht, derweil eine Zugabe von sowohl MMP 1 und pro-MMP9 oder MMP3 und pro-MMP9 zu dem gleichen Ergebnis führte

(siehe Tabelle 2) Interessanterweise führt eine Behandlung von IFN β -LAP mit MMP 1 und pro-MMP9 zu einer Erhöhung der antiviralen Aktivität auf das 3- bis 6-fache, was darauf schließen lässt, dass eine weitere Aktivierung dieses Moleküls erzielt werden kann.

[0147] Anhand nichtkonzentrierter Überstände von MTX-amplifizierten Zellen wurde gezeigt, dass sowohl MMP1 als auch MMP3 LAP-IFN β um das 21- bzw. 32-fache aktivieren können (Tabelle 3) und dass Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis es bis zu vierfach aktivieren kann (Tabelle 3). mIFN β -LAP kann ebenfalls aktiviert werden, jedoch ist, wie an früherer Stelle gezeigt worden ist (Tabelle 1), das Niveau seiner Grundaktivität hoch. Aus [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) (Spuren 4 und 8) ist ersichtlich, dass Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis die Fusionsproteine ebenfalls in getrennte Produkte mit 36 kDa und 20 kDa spalten kann, die LAP bzw. IFN β entsprechen.

[0148] Wie weiter oben erwähnt worden ist, bewirkt die Inkubation der Überstände ohne Protease-Inhibitoren eine erhöhte biologische Aktivität, was darauf schließen lässt, dass die von den CHO-Zellen sekretierten Enzyme eine Spaltung bewirken können. Die Tatsache, dass die Empfindlichkeit der zwei Fusionsproteine gegen Anwesenheit von MMP9 unterschiedlich ist, zeigt, dass mIFN β -LAP aktiviert werden kann, während für LAP-mIFN β , MMP9 inhibitorisch wirkt, die vielleicht einen weiteren Abbau durch andere Enzyme, die in den CHO-Zellüberständen vorhanden sind, herbeiführen.

Aktivierung von latentem IFN β mit Proben von entzündeten Stellen

[0149] [Fig. 8](#) und Tabelle 3 zeigten, dass Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis fähig ist, das latente Cytokin zu aktivieren.

[0150] Um abzuschätzen, ob eine langzeitige Inkubation des latenten Cytokins mit diesen Proben zu seinem Abbau oder zu einer Anhäufung in die aktive Verbindung führt, wurde sowohl LAP-mIFN β als auch mIFN β -LAP bis zu fünf Tage bei 37°C bei Anwesenheit oder Abwesenheit von Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis inkubiert und dann mittels IFN biologischen Test geprüft. Leere Symbole repräsentieren Proben, die in einem Medium mit 10 % FBS inkubiert wurden, während ausgefüllte Symbole Proben repräsentieren, die mit 1/5 vol/vol Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA.SF) inkubiert wurden.

[0151] In Abständen von 24 h wurden Proben genommen. [Fig. 9](#) zeigt, dass eine Inkubation über diesen ausgedehnten Zeitraum zu einer erhöhten Aktivität, d.h. zu einer Aktivierung des LAP-mIFN β bis auf das 10-fache während der ersten 24-48 h, bei einer stetigen Abnahme danach führte. Die Aktivierung des mIFN β -LAP scheiterte; es war nur eine Abnahme seiner Aktivität festzustellen. Dieses Ergebnis zeigt klar an, dass die LAP-IFN β -Konformation therapeutische Verwendungsmöglichkeiten besitzt.

[0152] Mit mIFN β -LAP war keine Aktivierung festzustellen. Allgemein, in beiden Fällen, nahm die Proteinaktivität über die Zeit ab, da Proteasen, die in dem Medium der Zellen festgestellt wurden, in der Lage sind, die gentechnisch hergestellten Proteine abzubauen.

[0153] Um festzustellen, ob sich die Aktivierung des latenten Cytokins mit Proben von anderen pathologischen entzündlichen Konditionen bestätigen lässt, wurde Zerebrospinal-Flüssigkeit von Versuchsaffen mit allergischer Enzephalomyelitis getestet. Nach einer Inkubation über Nacht war bei zwei der drei untersuchten Proben die biologische Aktivität der Fusionsproteine bis zu viermal höher als bei den parallellaufenden Serumproben (Daten nicht gezeigt), was darauf schließen lässt, dass eine ortsspezifische Aktivierung erzielt werden kann.

Beispiel 3

[0154] Um zu beurteilen, ob die bei LAP-mIFN β festgestellte Latenz die Bildung einer mutmaßlich geschlossenen Hüllstruktur, die durch das dimere disulfidgekoppelte LAP begrenzt ist, erforderte, wurde ein Fusionsprotein unter Verwendung von LAP vom Schwein hergestellt, das in Cys 223 und 225 zu Ser mutiert war.

Verfahren

Herstellung des Konstrukts

[0155] LAP vom Schwein wurde wie im Beispiel 1 dargelegt mittels PCR kloniert. Die benutzten Primer waren wie im Beispiel (Klonieren von LAP vom Schwein) dargelegt. Das klonierte Schweine-LAP wurde in Cys 223

und 225 zu Ser mutiert (Sanderson et.al.: Proc. Natl. Acad. Science, 92, 2572-2576 (1995)).

Transiente Transfektion in Affen-COS-7-Zellen

[0156] 20 µg Plasmid-DNA, PorcLAP-mIFNβ und mIFNβ-LAP sowie LAP-mIFNβ-Kontrollen wurden mittels des Calcium-Phosphat-Co-präzipitationsverfahren jeweils zweifach in $0,5 \times 10^6$ COS-7-Zellen transfiziert, mit denen wie oben beschrieben 9 cm-Platten beimpft worden waren. Die DNA-Co-präzipität wurde statt 4 h über Nacht auf den Zellen gelassen. Es wurden COS-7-Zellen in DMEM mit Antibiotika und 10 % FBS aufgezogen. 48 h nach dem Glycerin-Schock wurden die Überstände für den IFN-Antivirustest abgenommen.

Ergebnisse

[0157] Das mutierte PorcLAP-mIFNβ-Konstrukt wurde hinsichtlich seiner biologischen Aktivität in vitro nach einer transienten Transfektion in COS-7-Zellen mit den anderen Konstrukten verglichen. Die Tabelle 4 zeigt, dass PorcLAP-mIFNβ genauso aktiv wie mIFNβ-LAP in diesem Test war.

Tabelle 4

Plasmid	Antivirale Aktivität
LAP-mIFNβ	0
PorcLAP-mIFNβ	256
mIFNβ-LAP	256

[0158] Die gezeigten Ergebnisse sind für einen von zwei Versuchen repräsentativ.

Schlussfolgerung

[0159] Die Ergebnisse zeigen, dass für eine Latenz von LAP-mIFNβ Disulfid-Bindungen an den Positionen 223 und 225 erforderlich sind.

Beispiel 4

Klonierung und Expression von menschlichen IFNβ-, IL-2- und IL-10-LAP-Fusionsproteinen

[0160] Das Bilden von humanen IFNβ-MMP-LAP und LAP-MMP-humanen IFNβ wird die Prüfung der Expression dieser Konstrukte in CHO-Zelllinien und die anschließende Prüfung der Aktivität des exprimierten Produkts mit einigen menschlichen Zelllinien in vitro und in vivo erleichtern.

[0161] Menschliches IL-2 und IL10 aufweisende Konstrukte werden wie oben angegeben exprimiert und untersucht. Bei der Reinigung der exprimierten Fusionsproteine wird von einem poly-His-Schwanz als Verankerung für die Reinigung Gebrauch gemacht. Derartige Reinigungsschemata sind im Fach wohl bekannt.

Bildung von humanen IFN-LAP- und LAP-humanen IFN-Fusionsproteinen

Verfahren

[0162] Wie das Maus-IFNβ-Gen (siehe Beispiel 1) wurde das menschliche IFN-Gen am COOH-Ende der MMP-Stelle (nach LAP) an den Not1/Xba1-Stellen kloniert, was das Molekül OM52 (LAP-huIFNβ) zur Folge hatte. Dazu wurden die folgenden Primer benutzt:

Sense-Primer:

5' cgc/g gcc gca ATG AGC TAC AAC TTG CTT GG

Antisense-Primer:

5' ggt/ctaga TCA GTT TCG GAG GTA ACC

[0163] Das PCR-Produkt wurde mittels PCR von Plasmid-PSVEIF (Chernajovsky et.al.: DNA 3, 297-308, (1984)) erhalten, mit Not1 und Xba1 verdaut und in das LAP-mIFNβ exprimierende Plasmid kloniert, das mit den gleichen Enzymen verdaut wurde und aus dem das Mausgen entfernt worden war.

[0164] Menschliches Vorläufer-IFN β wurde kloniert, bevor menschliches LAP zu dem Molekül OM53 (huIFN β -LAP) führte. Dazu wurden die folgenden PCR-Primer benutzt:

Sense-Primer:

5' cca/agc tt ATG ACC AAC AAG TGT C

Antisense-Primer

5' ccg/aat tc GTT TCG GAG GTA ACC TG

[0165] Es wurde Plasmid-PSVEIF als Matrize für die PCR wie oben benutzt, und das PCR-Produkt wurde mit HindIII und EcoR1 verdaut und an denselben Stellen des mIFN β -LAP kloniert, von denen die Maus-cDNA entfernt worden war.

[0166] Die Nukleotidsequenz und die Aminosäuresequenz des huIFN β -LAP-Konstrukts und des LAP-huIFN β -Konstrukts sind in [Fig. 11](#) bzw. [Fig. 12](#) gezeigt.

[0167] Um die Latenz oder Aktivität dieser Moleküle abzuschätzen wurden CHO-Zellen dauerhaft mit 20 Mikrogramm linearisierter OM52- und OM53-Plasmid-DNA und mit 1 Mikrogramm pSV2DHPR (wie zuvor) co-transfiziert. Die Selektion wurde in G418 (Geneticin von Life Technologies Ltd.), 10 % dialysiertem fötalem Rinderserum (FBS) und α -DMEM-Medium durchgeführt. Überstände von 24 h alten konfluenten Kulturen wurden in einem Antivirus-Test unter Verwendung menschlicher Fibroblasten (MRC5-Linie) und des EMC-Virus wie im Beispiel 2 beschrieben untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5

Plasmid	Antivirale Aktivität (U/ml)
OM52 (LAP-huIFN)	256
OM53 (huIFN β -LAP)	0

Ergebnisse

[0168] Diese Daten lassen erkennen, dass eine Latenz des Fusionsproteins nicht vorausgesagt werden kann, da sich menschliches IFN β , das mit LAP-MMP fusioniert ist, anders gegenüber dem Maus-Protein verhält, wenn es mit dem LAP-MMP-Peptid fusioniert ist. Während bei der Maus-Sequenz die LAP-MMP-IFN β -Konformation latent war, war im Falle des menschlichen OMS2 dieses Konstrukt aktiv und umgekehrt, d.h. die Maus-IFN-LAP-Konformation war aktiv, während die menschliche (OM53) inaktiv war.

Beispiel 5

Durch Kollagen herbeigeführte Arthritis (CIA) und DNA-Injektion

[0169] DBA/1-Mäuse wurde mit Kollagen vom Typ II (CII) wie in Dreja et.al.: Arthritis and Rheumatism, 43, 1698-1708 (2000), beschrieben immunisiert und drei Wochen später mit CII in inkomplettem Freud'schen Adjuvans re-immunisiert. 100 Mikrogramm Plasmid-DNA in PBS wurden am Tag des Arthritisausbruchs an 3 Stellen in den Quadrizeps intramuskulär injiziert, und die Mäuse wurden jeden weiteren Tag für das klinische Bild der Arthritis bepunktet, wobei die Schwellung der Hinterpfote mit Messlehnen wie beschrieben (Dreja et.al.: Arthritis and Rheumatism, 43, 1698-1708,(2000)), gemessen wurde.

[0170] Bei einem Arthritismochel (CIA) wurde die relative Wirksamkeit des latenten Cytokins (LAP-mIFN β) versus die aktiven Versionen (PorcLAP-mIFN β und mIFN β -LAP) gemessen. Das latente LAP-mIFN β zeigte im Vergleich zu der Kontrolle, die mit einem leeren pCDNA3-Plasmidvektor behandelt war, eine größere Wirksamkeit als beide aktiven Komponenten, mIFN β -LAP und PorcLAP-mIFN β .

[0171] Es ist festgestellt worden, dass bei einer Zuführung mittels Gentherapie durch intramuskuläre Injektion das latente Cytokin wirksamer bei der Behandlung einer bestehenden Krankheit war.

Schlussfolgerungen

[0172] Es ist hierin gezeigt worden, dass ein aktives Cytokin-Molekül gentechnisch so konstruiert werden könnte, dass es durch das Hinzufügen der Latenzdomäne von TGF β entweder an seinem NH₂- oder an seinem

COOH-Terminus "latent" wird. In den Modellversuchen wurde das Cytokin IFN β benutzt.

[0173] Die LAP-Domäne von TGF β verlieh dem IFN β "Latenz", die durch Inkubieren des Fusionsproteins mit MMPs außer Kraft gesetzt werden konnte. Möglicherweise hat die Latenz mit einem sterischen Hindernis durch LAP bei der Interaktion der IFN β -Komponente mit ihren zellulären Rezeptoren zu tun. Anscheinend ist trotz der Tatsache, dass das NH₂-Ende und das COOH-Ende des Moleküls in der Kristallstruktur des IFN β eng beieinander sind, dem TGF β durch Fusionieren der LAP-Domäne an den NH₂-Terminus eine bessere "äußere Hülle" verliehen worden, als sie bei TGF β allein angetroffen wird. Es ist plausibel, dass dies bei anderen Cytokinen in Abhängigkeit von ihrer Tertiärstruktur und der Oberfläche für Interaktionen mit ihren Rezeptoren anders sein kann.

[0174] Die MMP-Stelle, die sich zwischen LAP und IFN β befand, konnte in vitro durch MMP-3 und MMP-1 gespaltet werden. MMP-3 und MMP-1 weisen homologe Bereiche Aktivitätszentrum auf (Massova et.al.: J. Mol. Model. 3, 17-30 (1997)). Es ist völlig plausibel, dass andere MMPs diese Stelle ebenfalls spalten werden, wie die Aktivierung, die in konzentrierten serumfreien Überständen von CHO-Zellen auftritt (Tabelle 2), erkennen lassen hat. Die Expression von MMPs ist sehr streng reguliert (Han et.al.: Autoimmunity, 28, 197-208 (1998)). MMPs sind während eines Gewebeumbaus, einer Wundheilung und bei einer Entzündung aktiv (Kubota et.al.: J. Oral & Maxillofacial Surgery, 55, 20-27 (1997); Van Meurs et.al.: Arthritis & Rheumatism, 42, 2074-2084 (1999); Leppert et.al.: Brain, 121, 2327-2334 (1998); Uhm et.al.: Annals of Neurology, 46, 319-324 (1999); Louis et.al.: Clin. Exp. Immunol. 120, 241-246 (2000); Baugh et.al.: Gastroenterology, 117, 814-822 (1999)). Außerdem werden MMPs von Tumorzellen benötigt, um in das umgebende Gewebe einzudringen. In der Tat kann eine Expression von Gewebeinhibitor Metalloproteasen (TIMPs) die Tumorinvasion und Metastasis hemmen (DeClerck et.al.: Cancer Res. 52, 701-708 (1992)).

[0175] MMP9 konnte die Fusionsproteine nicht spalten. Bei Verwendung von fluorogenen Peptidsubstraten mit der Sequenz PLGLWA-d-R scheint der Wert der Hydrolysegeschwindigkeit (kcat/Km) der Matrix-Metallproteinasen der Reihe MMP9 > MMP2 > MMP7 > MMP3 > MMP1 zu folgen (Nagase und Fields: Biopolymers, 40, 399-416 (1996)). Diese Diskrepanz in der Hydrolyseempfindlichkeit zwischen dem Peptidsubstrat und den gentechnisch hergestellten Proteinen, die bei dieser Untersuchung verwendet wurden, kann ihrer Tertiärstruktur zugeschrieben werden.

[0176] Es zeigt sich, dass die gentechnische Konstruktion des "latenten" Cytokins verschiedene Vorteile bietet. Erstens wird das Cytokin nach der Verabreichung von den Zellen, die Rezeptoren dafür besitzen, anscheinend nicht schnell aufgenommen; diese könnte sich auf seine Toxizität auswirken und für eine längere Halbwertszeit sorgen. Es ist gezeigt worden, dass LAP-enthaltendes TGF β in vivo eine größere Halbwertszeit aufweist (Wakefield et.al.: J. Clin. Invest. 86, 1976-1984 (1990)). Demzufolge könnte eine systemische Verabreichung zu Therapiezwecken niedriger dosiert sein.

[0177] Zweitens können sowohl LAP als auch LTBP die Wechselwirkung des latenten Cytokins mit der extrazellulären Matrix erleichtern.

[0178] Drittens, üblicherweise wird das Cytokin nicht freigesetzt, um mit zellulären Rezeptoren zu interagieren, sofern nicht Entzündungs- oder Gewebeumbauprozesse stattfinden, die mit einer MMP-Aktivität einhergehen. Eine solche Aktivität ist bei Osteoarthritis, rheumatoider Arthritis (Kubota et.al.: J. Oral & Maxillofacial Surgery, 55, 20-27 (1997); Van Meurs et.al.: Arthritis & Rheumatism, 42, 2074-2084 (1999); Singer et.al.: Osteoarthritis & Cartilage, 5, 407-418 (1997)) und bei anderen Typen chronischer Krankheiten, wie etwa bei der entzündlichen Darmkrankheit (Louis et.al.: Clin. Exp. Immunol. 120, 241-246 (2000); Baugh et.al.: Gastroenterology, 117, 814-822 (1999)), Multipler Sklerose (Leppert et.al.: Brain, 121, 2327-2334)), Atherosklerose (Libby: Vascular Medicine, 3, 225-229 (1998)), und während der Krebsinvasion (DeClerck u.a.: Cancer Res. 52, 701-708 (1992)) festgestellt worden.

[0179] Es könnte der Standpunkt vertreten werden, dass bei einer Spaltung das Freisetzen von LAP antagonistische Wirkungen auf das TGF β haben könnte, da gezeigt worden ist, dass in vitro LAP fähig ist, die Wirkung des aktiven TGF β zu hemmen (Wakefield et.al.: Growth Factors, 1, 203-218 (1989)). Es wird jedoch erwartet, dass das vorliegende LAP-Fusionsprotein seine Wirkung an entzündeten Stellen entfalten kann, wo freie Radikale im Überfluss vorhanden ist. Es ist gezeigt worden, dass eine Nitrosylierung von LAP seine Fähigkeit, an TGF β zu binden, unwirksam macht (Vodovotz et.al.: Cancer Res. 59, 2142-2149 (1999)). Folglich ist es unwahrscheinlich, dass an entzündeten Stellen das freigesetzte LAP der Funktion des TGF β entgegenwirken wird.

[0180] Weitere Modifikationen an der MMP-Spaltstelle könnten für eine zusätzliche Gewebespezifität sorgen.

Übersetzung der Figurenlegenden

EPA 02 729 440.4

Fig. 1, 2

Englische Figurenlegende	Deutsche Übersetzung
Sequence	Sequenz
Contd	Fortsetzung

Fig. 3

Englische Figurenlegende	Deutsche Übersetzung
Hu	menschlich
Ck	Huhn
Fg	Frosch
Contd	Fortsetzung

Fig. 4

Protein	Sequenz	Referenz
MMP-1/MMP-8		
Menschliches Kollagen Typ I (α 1)	Ala-Pro-Gln-Gly ₇₇₅ -Ile ₇₇₆ -Ala-Gly-Gln	80
Menschliches Kollagen Typ I (α 2)	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₇₅ -Leu ₇₇₆ -Leu-Gly-Ala	80
Menschliches Kollagen Typ II	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₇₅ -Leu ₇₇₆ -Ala-Gly-Gln	80
Menschliches Kollagen Typ III	Gly-Pro-Leu-Gly ₇₇₅ -Leu ₇₇₆ -Ala-Gly-Ile	80
Menschliches α_2 -Makroglobulin	Gly-Pro-Glu-Gly ₆₇₉ -Leu ₆₈₀ -Arg-Val-Gly	84
Ratten- α_2 -Makroglobulin	Ala-Ala-Tyr-His ₆₈₁ -Leu ₆₈₂ -Val-Ser-Gin	84
Ratten- α_2 -Makroglobulin	Met-Asp-Ala-Phe ₆₉₁ -Leu ₆₉₂ -Glu-Ser-Ser	84
Ratten- α_1 -Makroglobulin	Glu-Pro-Gln-Ala ₆₈₃ -Leu ₆₈₄ -Ala-Met-Ser	84
Ratten- α_1 -Makroglobulin	Gln-Ala-Leu-Ala ₆₈₅ -Met ₆₈₆ -Ser-Ala-Ile	84
Hühner-Ovostatin	Pro-Ser-Tyr-Phe ₆₇₃ -Leu ₆₇₃ -Asn-Ala-Gly	79
Menschliches "Pregnancy Zone Protein"	Tyr-Glu-Ala-Gly ₆₈₅ -Leu ₆₈₆ -Gly-Val-Val	84
Menschliches "Pregnancy Zone Protein"	Ala-Gly-Leu-Gly ₆₈₇ -Val ₆₈₈ -Val-Glu-Arg	84
Menschliches "Pregnancy Zone Protein"	Ala-Gly-Leu-Gly ₇₅₇ -Ile ₇₅₈ -Ser-Ser-Thr	84
α_1 -Proteaseinhibitor	Gly-Ala-Met-Phe ₃₅₂ -Leu ₃₅₃ -Glu-Ala-Ile	85
Menschliches Aggrecan	Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ -Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val	86

Menschliches Aggrecan	Thr-Glu-Gly-Glu ₃₇₃ -Ala ₃₇₄ -Arg-Gly-Ser	86
Menschliches Cartilage-Link-Protein	Arg-Ala-Ile-His ₁₆ -Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu	87
Menschliches insulinähnliches	Leu-Arg-Ala-Tyr ₉₉ -Leu ₁₀₀ -Leu-Pro-Ala	88
Wachstumsfaktor-Bindungsprotein-3		
MMP-2		
Meerschweinchen- α_1 (I)-Gelatine	Gly-Ala-Hyp-Gly ₅₄₇ -Leu ₅₄₈ -Glx-Gly-His	24
Ratten- α_1 (I)-Gelatine	Gly-Pro-Gln-Gly ₁₉₀ -Val ₁₉₁ -Arg-Gly-Glu	30
Ratten- α_1 (I)-Gelatine	Gly-Pro-Ala-Gly ₂₇₇ -Val ₂₇₈ -Gln-Gly-Pro	30
Ratten- α_1 (I)-Gelatine	Gly-Pro-Ser-Gly ₃₀₁ -Leu ₃₀₂ -Hyp-Gly-Pro	30
Ratten- α_1 (I)-Gelatine	Gly-Pro-Ala-Gly ₃₃₁ -Glu ₃₃₂ -Arg-Gly-Ser	30
Ratten- α_1 (I)-Gelatine	Gly-Ala-Lys-Gly ₃₆₁ -Leu ₃₆₂ -Thr-Gly-Ser	30
Ratten- α_1 (I)-Gelatine	Gly-Pro-Ala-Gly ₃₈₂ -Gln ₃₈₂ -Asp-Gly-Pro	30
Ratten- α_1 (I)-Gelatine	Gly-Pro-Ala-Gly ₆₃₄ -Phe ₆₃₅ -Ala-Gly-Pro	30
Ratten- α_1 (I)-Gelatine	Gly-Pro-Ile-Gly ₆₇₆ -Asn ₆₇₇ -Val-Gly-Ala	30
Ratten- α_1 (I)-Gelatine	Gly-Pro-Hyl-Gly ₆₈₅ -Ser ₆₈₆ Arg-Gly-Ala	30
Rinder-Kollagen Typ I (α_1)	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₇₅ -Ile ₇₇₆ -Ala-Gly-Gln	22
Rinder-Kollagen Typ I (α_2)	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₇₅ -Leu ₇₇₆ -Leu-Gly-Ala	22
Menschliches Aggrecan	Ile- Pro-Glu-Asn ₃₄₁ -Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val	89
Menschliches Galectin-3	Pro-Pro-Gly-Ala ₆₂ -Tyr ₆₃ -His-Gly-Ala	90
Menschliches Cartilage-Link-Protein	Arg-Ala-Ile-His ₁₆ -Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu	87
Menschliches Cartilage-Link-Protein	Gly-Pro-His-Leu ₂₆ -Leu ₂₆ -Val-Glu-Ala	87
		87
Menschliches insulinähnliches	Leu-Arg-Ala-Tyr ₉₉ -Leu ₁₀₀ -Leu-Pro-Ala	88
Wachstumsfaktor-Bindungsprotein-3		
MMP-3		
Menschliches α_2 -Makroglobulin	Gly-Pro-Glu-Gly ₆₇₉ -Leu ₆₈₀ -Arg-Val-Gly	79
Menschliches α_2 -Makroglobulin	Arg-Val-Gly-Phe ₆₈₄ -Tyr ₆₈₅ -Glu-Ser-Asp	79
Menschliches α_1 -Antichymotrypsin	Leu-Leu-Ser-Ala ₃₆₀ -Leu ₃₆₁ -Val-Glu-Thr	91
α_1 -Protease-Inhibitor	Glu-Ala-Ile-Pro ₃₅₇ -Met ₃₅₈ -Ser-Ile-Pro	91
Antithrombin III	Ile-Ala-Gly-Arg ₃₈₅ -Ser ₃₈₆ -Leu-Asn-Pro	91
Hühner-Ovostatin	Leu-Asn-Ala-Gly ₆₇₇ -Phe ₆₇₈ -Thr-Ala-Ser	79, 92
Menschliches Aggrecan	Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ -Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val	93
Substanz P	Lys- Pro-Gln-Gln ₆ -Phe ₇ - Phe-Gly-Leu	37
Menschliches ProMMP-1	Asp-Val-Ala-Gln ₈₀ -Phe ₈₁ -Val-Leu-Thr	43
Menschliches ProMMP-3	Asp-Thr-Leu-Glu ₆₈ -Val ₆₉ -Met-Arg-Lys	94
Menschliches ProMMP-3	Asp-Val-Gly-His ₈₂ -Phe ₈₃ -Arg-Thr-Phe	94
Menschliches ProMMP-8	Asp-Ser-Gly-Gly ₇₈ -Phe ₇₉ -Met-Leu-Thr	95

Menschliches ProMMP-9	Arg-Val-Ala-Glu ₄₀ -Met ₄₁ -Arg-Gly-Glu	48
Menschliches ProMMP-9	Asp-Leu-Gly-Arg ₈₇ -Phe ₈₈ -Gln-Thr-Phe	48
Menschliches Fibronectin	Pro-Phe-Ser-Pro ₆₈₉ -Leu ₆₉₀ -Val-Ala-Thr	21
Menschliches insulinähnliches	Leu-Arg-Ala-Tyr ₉₉ -Leu ₁₀₀ -Leu-Pro-Ala	88
Wachstumsfaktor-Bindungsprotein-3		
	Ala-Pro-Gly-Asn ₁₀₉ -Ala ₁₁₀ -Ser-Glu-Ser	88
	Phe-Ser-Ser-Glu ₁₇₆ -Ser ₁₇₇ -Lys-Arg-Glu	88
Rinder- α_1 (II)-Kollagen, N-Telopeptid	Ala-Gly-Gly-Ala ₁₁₅ -Gln ₁₁₆ -Met-Gly-Val	96
Rinder- α_1 (II)-Kollagen, N-Telopeptid	Gln-Met-Gly-Val ₁₁₉ -Met ₁₂₀ -Gln-Gly-Pro	96
Rinder- α_1 (IX)-Kollagen, NC2	Met-Ala-Ala-Ser-Leu-Lys-Arg-Pro	96
Rinder- α_2 (IX)-Kollagen, NC2	-Ala-Lys-Arg-Glu	96
Rinder- α_3 (IX)-Kollagen, NC2	-Leu-Arg-Lys-Pro	96
Rinder- α_1 (XI)-Kollagen, N-Telopeptid	Gln-Ala-Gln-Ala-Ile-Leu-Gln-Gln	96
Menschliches Cartilage-Link-Protein	Arg-Ala-Ile-His ₁₆ -Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu	87
Rinder-Insulin, B-Kette	Leu-Val-Glu-Ala ₁₄ -Leu ₁₅ -Tyr-Leu-Val	97
Rinder-Insulin, B-Kette	Glu-Ala-Leu-Tyr ₁₆ -Leu ₁₇ -Val-Cys-Gly	21, 97
MMP-7		
Menschliches Aggrecan	Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ -Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val	89
Menschliches Cartilage-Link-Protein	Gly-Pro-His-Leu ₂₅ -Leu ₂₆ -Val-Glu-Ala	87
Menschliche Prourokinase	Pro-Pro-Glu-Glu ₁₄₃ -Leu ₁₄₄ -Lys-Phe-Gln	98
MMP-9		
Menschliches Kollagen Typ V (α_1)	Gly-Pro-Pro-Gly ₄₃₉ -Val ₄₄₀ -Val-Gly-Pro	99
Menschliches Kollagen Typ V (α_2)	Gly-Pro-Pro-Gly ₄₄₅ -Leu ₄₄₆ -Arg-Gly-Glu	99
Menschliches Kollagen Typ XI (α_1)	Gly-Pro-Gly-Gly ₄₃₉ -Val ₄₄₀ -Val-Gly-Pro	99
Menschliches Aggrecan	Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ -Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val	89
Menschliches Galectin-3	Pro-Pro-Gly-Ala ₆₂ -Tyr ₆₃ -His-Gly-Ala	90
Menschliches Cartilage-Link-Protein	Arg-Ala-Ile-His ₁₆ -Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu	87
MMP-10		
Menschliches Cartilage-Link-Protein	Arg-Ala-Ile-His ₁₆ -Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu	87
Menschliches Cartilage-Link-Protein	Gly-Pro-His-Leu ₂₅ -Leu ₂₆ -Val-Glu-Ala	87

Fig. 6, 7

Englische Figurenlegende	Deutsche Übersetzung
Fusion protein	Fusionsprotein

Fig. 9A+B

Englische Figurenlegende	Deutsche Übersetzung
IFN activity (Units/ml)	IFN-Aktivität (Einheiten/ml)
Time (HRS)	Zeit (h)

Fig. 10

Englische Figurenlegende

Deutsche Übersetzung

Paw swelling	Schwellung der Hinterpfote
Day post boosting	Tage nach Re-Immunisierung
Clinical Score	Klinischer Score

Fig. 11, 12

Englische Figurenlegende

Deutsche Übersetzung

1-phase Translation	einphasige Translation
DNA Sequence	DNA-Sequenz
Contd	Fortsetzung
human IFNbeta	menschliches IFNbeta

Patentansprüche

1. Fusionsprotein, das ein mit Latenz assoziiertes Peptid (LAP) von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 und eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle aufweist, um einem pharmazeutisch aktiven Protein Latenz zu verleihen.
2. Fusionsprotein, das ein mit Latenz assoziiertes Peptid (LAP) von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 und eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle aufweist, um ein latentes pharmazeutisch aktives Protein ortsspezifisch zu aktivieren.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die MMP-Spaltstelle durch eine Matrix-Metallproteinase gespalten ist, die aus der Gruppe MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 oder MMP10 ausgewählt ist.
4. Fusionsprotein zur Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmazeutisch aktive Protein ein Wachstumsfaktor, Differenzierungsfaktor, Cytokin, Chemokin, trophischer Faktor, Cytokininhibitor, Cytokinrezeptor, freie Radikale abfangendes Enzym, Arzneimittelvorläufer konvertierendes Enzym, Peptidmimetikum, Proteaseinhibitor, Metallproteinase-Gewebsinhibitor oder Serinproteaseinhibitor ist.
5. Fusionsprotein zur Verwendung nach Anspruch 4, bei dem das Cytokin ein Interleukin oder ein Interferon ist.
6. Fusionsprotein zur Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Fusionsprotein mit einem latenten TGF β -bindenden Protein assoziiert ist.
7. Nukleinsäurekonstrukt, das eine erste, ein pharmazeutisch aktives Protein codierende Nukleinsäuresequenz und eine zweite Nukleinsäuresequenz enthält, die ein LAP von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 codiert, dadurch gekennzeichnet, dass eine Nukleinsäuresequenz, die eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle codiert, zwischen der ersten und der zweiten Nukleinsäuresequenz vorgesehen ist.
8. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die MMP-Spaltstelle durch eine Matrix-Metallproteinase gespalten ist, die aus der Gruppe MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 oder MMP10 ausgewählt ist.
9. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmazeutisch aktive Protein ein Wachstumsfaktor, Differenzierungsfaktor, Cytokin, Chemokin, trophischer Faktor, Cytokininhibitor, Cytokinrezeptor, freie Radikale abfangendes Enzym, Arzneimittelvorläufer konvertierendes Enzym, Peptidmimetikum, Proteaseinhibitor, Metallproteinase-Gewebsinhibitor oder Serinproteaseinhibitor ist.
10. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 9, bei dem das Cytokin ein Interleukin oder ein Interferon ist.

11. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Nukleinsäuresequenz das Protein IFN β codiert.
12. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 7 bis 11, welches in der Form eines Vektors vorliegt.
13. Zelle, die ein Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 7 bis 12 enthält.
14. Cytokin, das das Expressionsprodukt eines Nukleinsäurekonstrukt nach den Ansprüchen 7 bis 12 ist.
15. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 7 bis 12 zur Verwendung in der Medizin.
16. Verwendung eines Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 7 bis 12 bei der Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von Osteoarthritis, Sklerodermie, Nierenkrankheit, rheumatoider Arthritis, entzündlicher Darmkrankheit, Multipler Sklerose, Atherosklerose, entzündlicher Krankheit oder Krebs.
17. Pharmazeutische Zusammensetzung, die einen pharmazeutisch akzeptablen Träger und ein Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 7 bis 12 enthält.
18. Fusionsprotein, das ein LAP von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 und eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle enthält, wobei das Fusionsprotein mit einem pharmazeutisch aktiven Protein verbunden ist.
19. Verfahren zur Herstellung eines Fusionsproteins nach Anspruch 18, der die Herstellung des Fusionsproteins rekombinant durch Expression in einer Wirtszelle, Reinigung des exprimierten Fusionsproteins und Verbindung des pharmazeutisch aktiven Proteins mit dem gereinigten Fusionsprotein mittels chemischer Vernetzung umfasst.
20. Fusionsprotein nach Anspruch 18 zur Verwendung in der Medizin.
21. Verwendung eines Fusionsproteins nach Anspruch 18 bei der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Osteoarthritis, Sklerodermie, Nierenkrankheit, rheumatoider Arthritis, entzündlicher Darmkrankheit, Multipler Sklerose, Atherosklerose, entzündlicher Krankheit oder Krebs.
22. Pharmazeutische Zusammensetzung, die einen pharmazeutisch akzeptablen Träger und ein Fusionsprotein nach Anspruch 18 enthält.
23. Ein in vitro-Verfahren zur Ausstattung eines pharmazeutisch aktiven Proteins mit Latenz, die das Verbinden eines Fusionsproteins, das ein mit Latenz assoziiertes Peptid (LAP) von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 und eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle enthält, mit dem vorerwähnten pharmazeutisch aktiven Protein beinhaltet.
24. Komponentensatz, der ein Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 7 bis 12 oder ein Fusionsprotein nach Anspruch 18 und eine Trägersubstanz zur Verabreichung enthält.
25. Verwendung eines Fusionsproteins, das ein mit Latenz assoziiertes Peptid (LAP) von TGF β -1, -2, -3, -4 oder -5 und eine Matrix-Metallproteinase (MMP)-proteolytische Spaltstelle enthält, dadurch gekennzeichnet, dass das Fusionsprotein mit einem pharmazeutisch aktiven Protein bei der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Osteoarthritis, Sklerodermie, Nierenkrankheit, rheumatoider Arthritis, entzündlicher Darmkrankheit, Multipler Sklerose, Atherosklerose, entzündlicher Krankheit oder Krebs verbunden ist.

Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

TGFb+MMP+ifn b Sequence

10	20	30	40	50	60
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
ATGCCGCCCT	CCGGGCTGCG	GCTGCTGCCG	CTGCTGCTAC	CGCTGCTGTG	GCTACTGGTG
MetProProS	erGlyLeuAr	gLeuLeuPro	LeuLeuLeuP	roLeuLeuTr	pLeuLeuVal
CTGACGCCTG	GCCCCGCCGGC	CGCGGGACTA	TCCACCTGCA	AGACTATCGA	CATGGAGCTG
LeuThrProG	lyProProAl	aAlaGlyLeu	SerThrCysL	ysThrIleAs	pMetGluLeu
GTGAAGCGGA	AGCGCATCGA	GGCCATCCGC	GGCCAGATCC	TGTCCAAGCT	GCGGCTCGCC
ValLysArgL	ysArgIleG1	uAlaIleArg	GlyGlnIleL	euSerLysLe	uArgLeuAla
AGCCCCCGA	GCCAGGGGGA	GGTGCCGCC	GGCCCGCTGC	CCGAGGCCGT	GCTCGCCCTG
SerProProS	erGlnGlyG1	uValProPro	GlyProLeuP	roGluAlaVa	lLeuAlaLeu
TACAAACAGCA	CCCGCGACCG	GGTGGCCGGG	GAGAGTGCAG	AACCGGAGCC	CGAGCCTGAG
TyrAsnSerT	hrArgAspAr	gValAlaGly	GluSerAlaG	luProGluPr	oGluProGlu
GCCGACTACT	ACGCCAAGGA	GGTCACCCGC	GTGCTAATGG	TGGAAACCCA	CAACGAAATC
AlaAspTyrT	yrAlaLysG1	uValThrArg	ValLeuMetV	alGluThrHi	sAsnGluIle
TATGACAAGT	TCAAAGCAGAG	TACACACAGC	ATATATATGT	TCTTCAACAC	ATCAGAGCTC
TyrAspLysP	heLysGlnSe	rThrHisSer	IleTyrMetP	hePheAsnTh	rSerGluLeu
CGAGAACCGG	TACCTGAACC	CGTGGTGTCT	TCCCGGGCAG	AGCTGCGTCT	GCTGAGGAGG
ArgGluAlaV	alProGluPr	oValLeuLeu	SerArgAlaG	luLeuArgLe	uLeuArgArg
CTCAAGTTAA	AAGTGGAGCA	GCACGTGGAG	CTGTACCAGA	AATACAGCAA	CAATTCTGG
LeuLysLeuL	ysValGluG1	nHisValGlu	LeuTyrGlnL	ysTyrSerAs	nAsnSerTrp
CGATACCTCA	GCAACCGGCT	GCTGGCACCC	AGCGACTCGC	CAGAGTGGTT	ATCTTTGAT
ArgTyrLeuS	erAsnArgLe	uLeuAlaPro	SerAspSerP	roGluTrpLe	uSerPheAsp
GTCACCGGAG	TTGTGCGGCA	GTGGTTGAGC	CCTGGAGGGG	AAATTGAGGG	CTTCGCCTT
ValThrGlyV	alValArgG1	nTrpLeuSer	ArgGlyGlyG	luIleGluG1	yPheArgLeu
AGCGCCCAC	GCTCCTGTGA	CAGCAGGGAT	AAACACACTGC	AAGTGGACAT	CAACGGGTTC
SerAlaHisC	ysSerCysAs	pSerArgAsp	AsnThrLeuG	lnValAspIl	eAsnGlyPhe
ACTACCGGCC	GCCGAGGTGA	CCTGGCCACC	ATTCACTGGCA	TGAACCGGCC	TTTCCTGCTT
ThrThrGlyA	rgArgGlyAs	pLeuAlaThr	IleHisGlyM	etAsnArgPr	oPheLeuLeu
CTCATGGCCA	CCCCGCTGGA	GAGGGCCAG	CATCTGCAA	GCGAATTCGG	GGGAGGCGGA
LeuMetAlaT	hrProLeuG1	uArgAlaGln	HisLeuGlnS	erGluPheG1	yGlyGlyGly
TCCCCGCTCG	GGCTTTGGC	GGGAGGGGGC	TCAGCGGCCG	CAATCAACTA	TAAGCAGCTC
SerProLeuG	lyLeuTrpAl	aGlyGlyGly	SerAlaAlaA	laIleAsnTy	rLysGlnLeu
CAGCTCCAAG	AAAGGACGAA	CATTGGAAA	TGTCAGGAGC	TCCTGGAGCA	GCTGAATGGA
GlnLeuGlnG	luArgThrAs	nIleArgLys	CysGlnGluL	euLeuGluG1	nLeuAsnGly

AAGATCAACC	TCACCTACAG	GGCGGACTTC	AAGATCCCTA	TGGAGATGAC	GGAGAAGATG	1020
LysIleAsnL	euThrTyrAr	gAlaAspPhe	LysIleProM	etGluMetTh	rGluLysMet	
CAGAAGAGTT	ACACTGCCTT	TGCCATCCAA	GAGATGCTCC	AGAATGTCTT	TCTTGTCTTC	1080
GlnLysSerT	yrThrAlaPh	eAlaIleGln	GluMetLeuG	lnAsnValPh	eLeuValPhe	
AGAAACAATT	TCTCCAGCAC	TGGGTGGAAT	GAGACTATTG	TTGTACGTCT	CCTGGATGAA	1140
ArgAsnAsnP	heSerSerTh	rGlyTrpAsn	GluThrIleV	alValArgLe	uLeuAspGlu	
CTCCACCAGC	AGACAGTGTT	TCTGAAGACA	GTACTAGAGG	AAAAGCAAGA	GGAAAGATTG	1200
LeuHisGlnG	lnThrValPh	eLeuLysThr	ValLeuGluG	luLysGlnG1	uGluArgLeu	
ACGTGGGAGA	TGTCTCTAAC	TGCTCTCCAC	TTGAAGAGCT	ATTACTGGAG	GGTGCAAAGG	1260
ThrTrpGluM	etSerSerTh	rAlaLeuHis	LeuLysSerT	yrTyrTrpAr	gValGlnArg	
TACCTTAAAC	TCATGAAGTA	CAACAGCTAC	GCCTGGATGG	TGGTCCGAGC	AGAGATCTTC	1320
TyrLeuLysL	euMetLysTy	rAsnSerTyr	AlaTrpMetV	alValArgAl	aGluIlePhe	
AGGAACCTTC	TCATCATTG	AAGACTTACC	AGAAACTTCC	AAAACTGATC	TAGACC	1376
ArgAsnPheL	euIleIleAr	gArgLeuThr	ArgAsnPheG	lnAsn***Se	rArg	
				uga		

FIG. 1 CONT'D

FIG. 2

ifn+MMP+TGFb Sequence

10	20	30	40	50	60
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
ATGAACAAACA	GGTGGATCCT	CCACGCTGCG	TTCCTGCTGT	GCTTCTCCAC	CACAGCCCTG
MetAsnAsnA	rgTrpIleLe	uHisAlaAla	PheLeuLeuc	ysPheSerTh	rThrAlaLeu
TCCATCAACT	ATAAGCAGCT	CCAGCTCCAA	GAAAGGACGA	ACATTGGAA	ATGTCAGGAG
SerIleAsnT	yrLysGlnLe	uGlnLeuGln	GluArgThrA	snIleArgLy	sCysGlnGlu
CTCCTGGAGC	AGCTGAATGG	AAAGATCAAC	CTCACCTACA	GGGCGGACTT	CAAGATCCCT
LeuLeuGluG	lnLeuAsnG1	yLysIleAsn	LeuThrTyrA	rgAlaAspPh	eLysIlePro
ATGGAGATGA	CGGAGAAAGAT	GCAGAAAGAGT	TACACTGCCT	TTGCCATCCA	AGAGATGCTC
MetGluMetT	hrGluLysMe	tGlnLysSer	TyrThrAlaP	heAlaIleG1	nGluMetLeu
CAGAATGTCT	TTCTTGTCTT	CAGAAACAAT	TTCTCCAGCA	CTGGGTGGAA	TGAGACTATT
GlnAsnValP	heLeuValPh	eArgAsnAsn	PheSerSerT	hrGlyTrpAs	nGluThrIle
GTTGTACGTC	TCCTGGATGA	ACTCCACCAG	CAGACAGTGT	TTCTGAAGAC	AGTACTAGAG
ValValArgL	euLeuAspG1	uLeuHisGln	GlnThrValP	heLeuLysTh	rValLeuGlu
GAAAAGCAAG	AGGAAAGATT	GACGTGGGAG	ATGTCTCAA	CTGCTCTCCA	CTTGAAGAGC
GluLysGlnG	luGluArgLe	uThrTrpGlu	MetSerSerT	hrAlaLeuHi	SleuLysSer
TATTACTGGA	GGGTGCAAAG	GTACCTTAAA	CTCATGAAGT	ACAAACAGCTA	CGCCTGGATG
TyrTyrTrpA	rgValGlnAr	gTyrLeuLys	LeuMetLyst	yrAsnSerTy	rAlaTrpMet
GTGGTCCGAG	CAGAGATCTT	CAGGAACCTT	CTCATCATTC	GAAGACTTAC	CAGAAACTTC
ValValArgA	laGluIlePh	eArgAsnPhe	LeuIleIleA	rgArgLeuTh	rArgAsnPhe
CAAAACGAAT	TG	GGGGGAGG	CGGATCCCCG	CTCGGGCTTT	GGGCGGGAGG
GlnAsnGluP	heGlyGlyG1	yGlySerPro	LeuGlyLeuT	rpAlaGlyG1	yGlySerAla
GCCGCACTAT	CCACCTGCAA	GAATATCGAC	ATGGAGCTGG	TGAAGCGGAA	GCCCATCGAG
AlaAlaLeuS	erThrCysLy	sThrIleAsp	MetGluLeuV	alLysArgLy	sArgIleGlu
GCCATCCGCG	GCCAGATCCT	GTCCAAGCTG	CGGCTCGCCA	GCCCCCGAG	CCAGGGGGAG
AlaIleArgG	lyGlnIleLe	uSerLysLeu	ArgLeuSlaS	erProProSe	rGlnGlyGlu
GTGCCGCCG	GCCCCGCTGCC	CGAGGCCGTG	CTCGCCCTGT	ACAAACAGCAC	CCGCGACCGG
ValProProG	lyProLeuPr	OGLuAlaVal	LeuAlaLeuT	yrAsnSerTh	rArgAspArg
GTGGCCGGGG	AGAGTGCAGA	ACCGGAGCCC	GAGCCTGAGG	CCGACTACTA	CGCCAAGGAG
ValAlaGlyG	luSerAlaG1	uProGluPro	GluProGluA	laAspTyrTy	rAlaLysGlu
GTCACCCGCG	TGCTAATGGT	GGAAACCCAC	AACGAAATCT	ATGACAAGTT	CAAGCAGAGT
ValThrArgV	alLeuMetVa	lGluThrHis	AsnGluIleT	yrAspLysPh	eLysGlnSer
ACACACAGCA	TATATATGTT	CTTCAACACA	TCAGAGCTCC	GAGAACCGGT	ACCTGAACCC
ThrHisSerI	leTyrMetPh	ePheAsnThr	SerGluLeuA	rgGluAlaVa	lProGluPro

GTGTTGCTCT CCCGGGCACA GCTGCGTCTG CTGAGGAGGC TCAAGTTAAA AGTGGAGCAG	1020
ValLeuLeuS erArgAlaG1 uLeuArgLeu LeuArgArgL euLysLeuLy sValGluGln	
CACGTGGAGC TGTACCAGAA ATAC ⁴ GCAAC AATTCCCTGGC GATAACCTCAG CAACCGGCTG	1080
HisValGluL euTyrGlnLy sTyrSerAsn AsnSerTrPA rgTyrLeuSe rAsnArgLeu	
CTGGCACCCA GCGACTCGCC AGAGTGGTTA TCTTTGATG TCACCGGAGT TGTGCGGCAG	1140
LeuAlaProS erAspSerPr oGluTrpLeu SerPheAspV alThrGlyVa lValArgGln	
TGGTGAGCC GTGGAGGGGA AATTGAGGGC TTTGCCTTA GCGCCCACTG CTCCTGTGAC	1200
TrpLeuSerA rgGlyGlyG1 uIleGluGly PheArgLeuS erAlaHisCy sSerCysAsp	
AGCAGGGATA ACACACTGCA AGTGGACATC AACGGGTTCA CTACCGGCCG CCGAGGTGAC	1260
SerArgAspA snThrLeuG1 nValAspIle AsnGlyPheT hrThrGlyAr GArgGlyAsp	
CTGGCCACCA TTCATGGCAT GAACCGGCCT TTCCTGCTTC TCATGGCCAC CCCGCTGGAG	1320
LeuAlaThrI leHisGlyMe tAsnArgPro PheLeuLeuL euMetAlaTh rProLeuGlu	
AGGGCCCAGC ATCTGCAAAG GtgaTCTAGA CC	1352
ArgAlaGlnH isLeuGlnSe r...SerArg	

FIG. 2 CONT'D

三
五
經

FIG. 3 CONT'D

FIG. 4

Protein	Sequence	Reference
MMP-1/MMP-8		
Human type I collagen ($\alpha 1$)	Ala-Pro-Gln-Gly ₇₇₅ ~Ile ₇₇₆ -Ala-Gly-Gln	80
Human type I collagen ($\alpha 2$)	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₇₅ ~Leu ₇₇₆ -Leu-Gly-Ala	80
Human type II collagen	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₇₅ ~Leu ₇₇₆ -Ala-Gly-Gln	80
Human type III collagen	Gly-Pro-Leu-Gly ₇₇₅ ~Ile ₇₇₆ -Ala-Gly-Ile	80
Human α_2 -macroglobulin	Gly-Pro-Glu-Gly ₆₇₉ ~Leu ₆₈₀ -Arg-Val-Gly	84
Rat α_2 -macroglobulin	Ala-Ala-Tyr-His ₆₈₁ ~Leu ₆₈₂ -Val-Ser-Gin	84
Rat α_2 -macroglobulin	Met-Asp-Ala-Phe ₆₉₁ ~Leu ₆₉₂ -Glu-Ser-Ser	84
Rat α_1 -macroglobulin	Glu-Pro-Gln-Ala ₆₈₃ ~Leu ₆₈₄ -Ala-Met-Ser	84
Rat α_1 -macroglobulin	Gln-Ala-Leu-Ala ₆₈₅ ~Met ₆₈₆ -Ser-Ala-Ile	84
Chicken ovostatin	Pro-Ser-Tyr-Phe ₆₇₃ ~Leu ₆₇₄ -Asn-Ala-Gly	79
Human pregnancy zone protein	Tyr-Glu-Ala-Gly ₆₈₅ ~Leu ₆₈₆ -Gly-Val-Val	84
Human pregnancy zone protein	Ala-Gly-Leu-Gly ₆₈₇ ~Val ₆₈₈ -Val-Glu-Arg	84
Human pregnancy zone protein	Ala-Gly-Leu-Gly ₇₅₇ ~Ile ₇₅₈ -Ser-Ser-Thr	84
α_1 -protease inhibitor	Gly-Ala-Met-Phe ₃₅₂ ~Leu ₃₅₃ -Glu-Ala-Ile	85
Human aggrecan	Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ ~Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val	86
Human aggrecan	Thr-Glu-Gly-Glu ₃₇₃ ~Ala ₃₇₄ -Arg-Gly-Ser	86
Human cartilage link	Arg-Ala-Ile-His ₁₆ ~Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu	87
Human insulin-like growth factor binding protein-3	Leu-Arg-Ala-Tyr ₉₉ ~Leu ₁₀₀ -Leu-Pro-Ala	88
MMP-2		
Guinea pig $\alpha 1$ (I) gelatin	Gly-Ala-Hyp-Gly ₅₄₇ ~Leu ₅₄₈ -Glx-Gly-His	24
Rat $\alpha 1$ (I) gelatin	Gly-Pro-Gln-Gly ₁₉₀ ~Val ₁₉₁ -Arg-Gly-Glu	30
Rat $\alpha 1$ (I) gelatin	Gly-Pro-Ala-Gly ₂₇₇ ~Val ₂₇₈ -Gln-Gly-Pro	30
Rat $\alpha 1$ (I) gelatin	Gly-Pro-Ser-Gly ₃₀₁ ~Leu ₃₀₂ -Hyp-Gly-Pro	30
Rat $\alpha 1$ (I) gelatin	Gly-Pro-Ala-Gly ₃₃₁ ~Glu ₃₃₂ -Arg-Gly-Ser	30
Rat $\alpha 1$ (I) gelatin	Gly-Ala-Lys-Gly ₃₆₁ ~Leu ₃₆₂ -Thr-Gly-Ser	30
Rat $\alpha 1$ (I) gelatin	Gly-Pro-Ala-Gly ₃₈₂ ~Gln ₃₈₃ -Asp-Gly-Pro	30
Rat $\alpha 1$ (I) gelatin	Gly-Pro-Ala-Gly ₆₃₄ ~Phe ₆₃₅ -Ala-Gly-Pro	30
Rat $\alpha 1$ (I) gelatin	Gly-Pro-Ile-Gly ₆₇₆ ~Asn ₆₇₇ -Val-Gly-Ala	30
Rat $\alpha 1$ (I) gelatin	Gly-Pro-Hyl-Gly ₆₈₅ ~Ser ₆₈₆ -Arg-Gly-Ala	30
Bovine type 1 collagen ($\alpha 1$)	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₇₅ ~Ile ₇₇₆ -Ala-Gly-Gln	22
Bovine type 1 collagen ($\alpha 2$)	Gly-Pro-Gln-Gly ₇₇₅ ~Leu ₇₇₆ -Leu-Gly-Ala	22
Human aggrecan	Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ ~Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val	89
Human galectin-3	Pro-Pro-Gly-Ala ₆₂ ~Tyr ₆₃ -His-Gly-Ala	90
Human cartilage link	Arg-Ala-Ile-His ₁₆ ~Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu	87
Human cartilage link	Gly-Pro-His-Leu ₂₅ ~Leu ₂₆ -Val-Glu-Ala	87
Human insulin-like growth factor binding protein-3	Leu-Arg-Ala-Tyr ₉₉ ~Leu ₁₀₀ -Leu-Pro-Ala	88

MMP-3			
Human α_2 -macroglobulin	Gly-Pro-Glu-Gly ₆₇₉ ~Leu ₆₈₀ -Arg-Val-Gly	79	
Human α_2 -macroglobulin	Arg-Val-Gly-Phe ₆₈₄ ~Tyr ₆₈₅ -Glu-Ser-Asp	79	
Human α_1 -antichymotrypsin	Leu-Leu-Ser-Ala ₃₆₀ ~Leu ₃₆₁ -Val-Glu-Thr	91	
α_1 -protease inhibitor	Glu-Ala-Ile-Pro ₃₅₇ ~Met ₃₅₈ -Ser-Ile-Pro	91	
Antithrombin III	Ile-Ala-Gly-Arg ₃₈₅ ~Ser ₃₈₆ -Leu-Asn-Pro	91	
Chicken ovostatin	Leu-Asn-Ala-Gly ₆₇₇ ~Phe ₆₇₈ -Thr-Ala-Ser	79, 92	
Human aggrecan	Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ ~Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val	93	
Substance P	Lys-Pro-Gln-Gln ₆ ~Phe ₇ -Phe-Gly-Leu	37	
Human ProMMP-1	Asp-Val-Ala-Gln ₈₀ ~Phe ₈₁ -Val-Leu-Thr	43	
Human ProMMP-3	Asp-Thr-Leu-Glu ₆₈ ~Val ₆₉ -Met-Arg-Lys	94	
Human ProMMP-3	Asp-Val-Gly-His ₈₂ ~Phe ₈₃ -Arg-Thr-Phe	94	
Human ProMMP-8	Asp-Ser-Gly-Gly ₇₈ ~Phe ₇₉ -Met-Leu-Thr	95	
Human ProMMP-9	Arg-Val-Ala-Glu ₄₀ ~Met ₄₁ -Arg-Gly-Glu	48	
Human ProMMP-9	Asp-Leu-Gly-Arg ₈₇ ~Phe ₈₈ -Gln-Thr-Phe	48	
Human fibronectin	Pro-Phe-Ser-Pro ₆₈₉ ~Leu ₆₉₀ -Val-Ala-Thr	21	
Human insulin-like growth factor	Leu-Arg-Ala-Tyr ₉₉ ~Leu ₁₀₀ -Leu-Pro-Ala	88	
binding protein-3	Ala-Pro-Gly-Asn ₁₀₉ ~Ala ₁₁₀ -Ser-Glu-Ser	88	
Bovine $\alpha 1$ (II)collagen, N-telopeptide	Phe-Ser-Ser-Glu ₁₇₆ ~Ser ₁₇₇ -Lys-Arg-Glu	88	
Bovine $\alpha 1$ (II)collagen, N-telopeptide	Ala-Gly-Gly-Ala ₁₁₅ ~Gln ₁₁₆ -Met-Gly-Val	96	
Bovine $\alpha 1$ (IX)collagen, NC2	Gln-Met-Gly-Val ₁₁₉ ~Met ₁₂₀ -Gln-Gly-Pro	96	
Bovine $\alpha 2$ (IX)collagen, NC2	Met-Ala-Ala-Ser~Leu-Lys-Arg-Pro	96	
Bovine $\alpha 3$ (IX)collagen, NC2	~Ala-Lys-Arg-Glu	96	
Bovine $\alpha 1$ (XI)collagen, N-telopeptide	~Leu-Arg-Lys-Pro	96	
Human cartilage link	Gln-Ala-Gln-Ala-Ile-Leu-Gln-Gln	96	
Bovine insulin, B chain	Arg-Ala-Ile-His ₁₆ ~Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu	87	
Bovine insulin, B chain	Leu-Val-Glu-Ala ₁₄ ~Leu ₁₅ -Tyr-Leu-Val	97	
	Glu-Ala-Leu-Tyr ₁₆ ~Leu ₁₇ -Val-Cys-Gly	21, 97	
MMP-7			
Human aggrecan	Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ ~Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val	89	
Human cartilage link	Gly-Pro-His-Leu ₂₅ ~Leu ₂₆ -Val-Glu-Ala	87	
Human prourokinase	Pro-Pro-Glu-Glu ₁₄₃ ~Leu ₁₄₄ -Lys-Phe-Gln	98	
MMP-9			
Human type V collagen ($\alpha 1$)	Gly-Pro-Pro-Gly ₄₃₉ ~Val ₄₄₀ -Val-Gly-Pro	99	
Human type V collagen ($\alpha 2$)	Gly-Pro-Pro-Gly ₄₄₅ ~Leu ₄₄₆ -Arg-Gly-Glu	99	
Human type XI collagen ($\alpha 1$)	Gly-Pro-Gly-Gly ₄₃₉ ~Val ₄₄₀ -Val-Gly-Pro	99	
Human aggrecan	Ile-Pro-Glu-Asn ₃₄₁ ~Phe ₃₄₂ -Phe-Gly-Val	89	
Human galectin-3	Pro-Pro-Gly-Ala ₆₂ ~Tyr ₆₃ -His-Gly-Ala	90	
Human cartilage link	Arg-Ala-Ile-His ₁₆ ~Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu	87	
MMP-10			
Human cartilage link	Arg-Ala-Ile-His ₁₆ ~Ile ₁₇ -Gln-Ala-Glu	87	
Human cartilage link	Gly-Pro-His-Leu ₂₅ ~Leu ₂₆ -Val-Glu-Ala	87	

FIG. 4 CONT'D

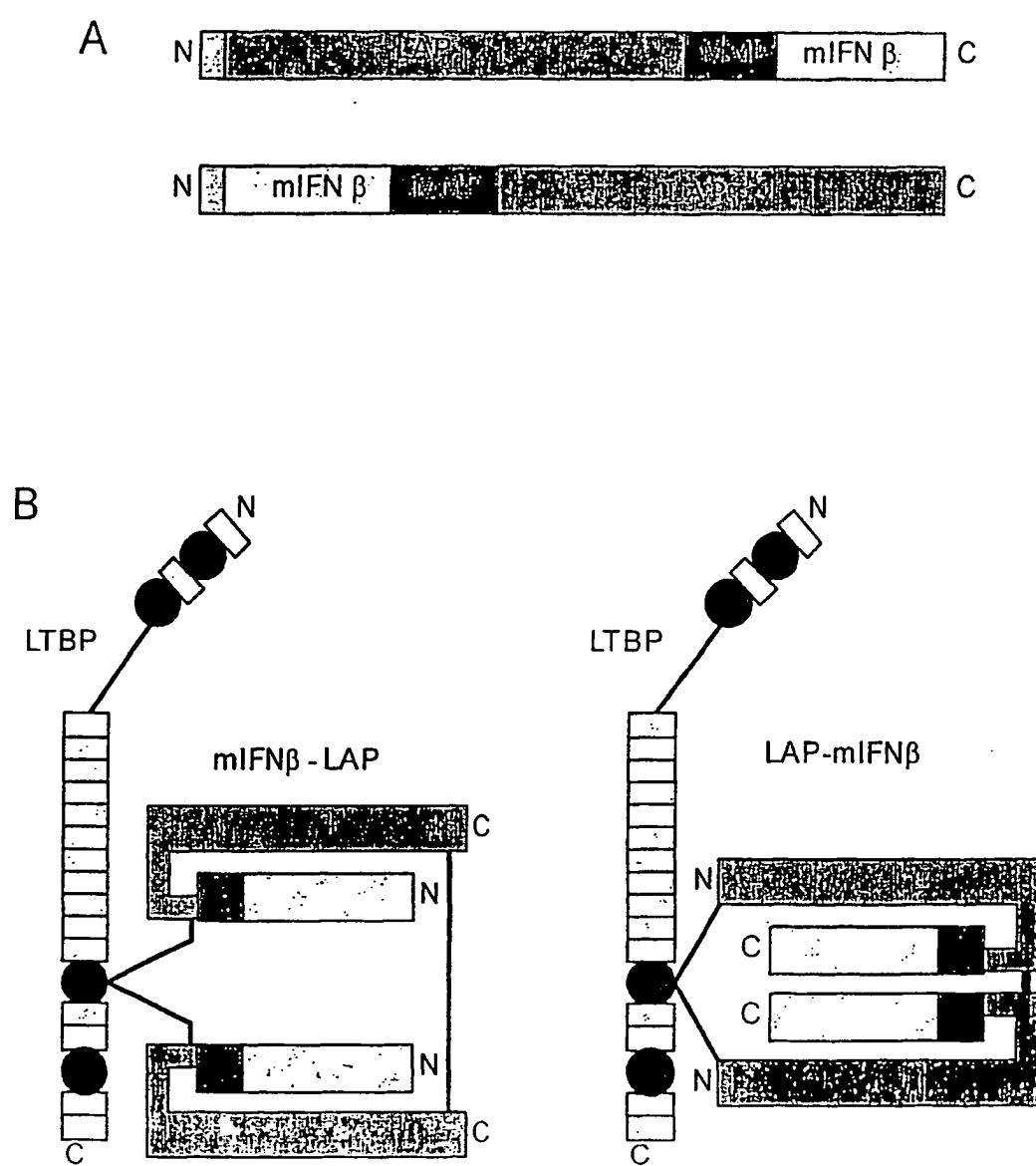
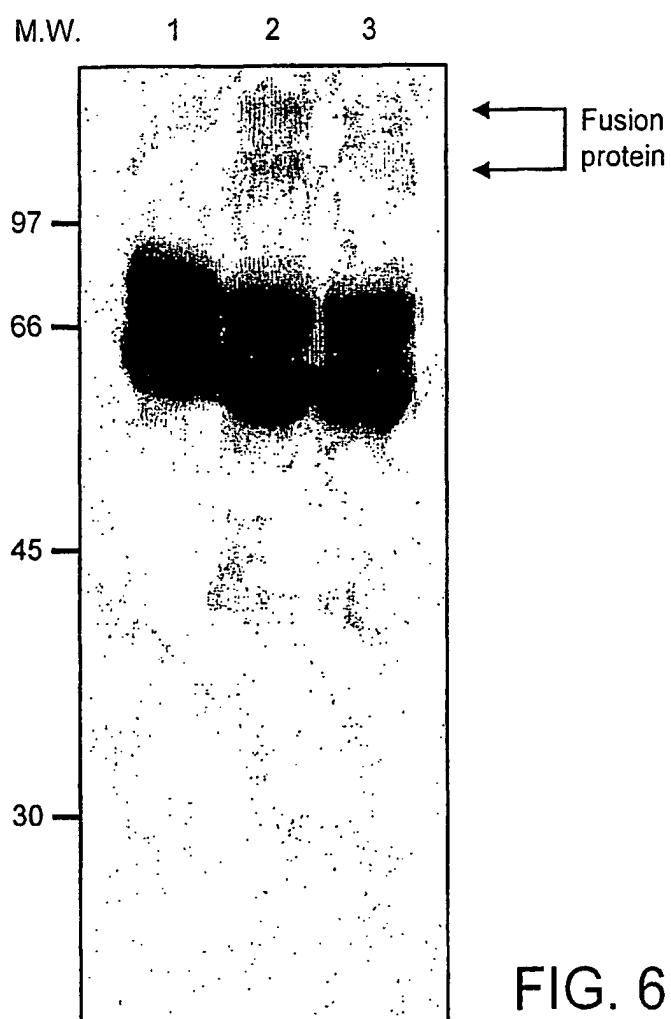


FIG. 5



LAP-IFN

+ -

+ - + -

IFN-LAP

- +

- + - +

MMP1

- -

- - + +

MMP3

- -

+ + - -

1

2

M.W.

3

4

5

6

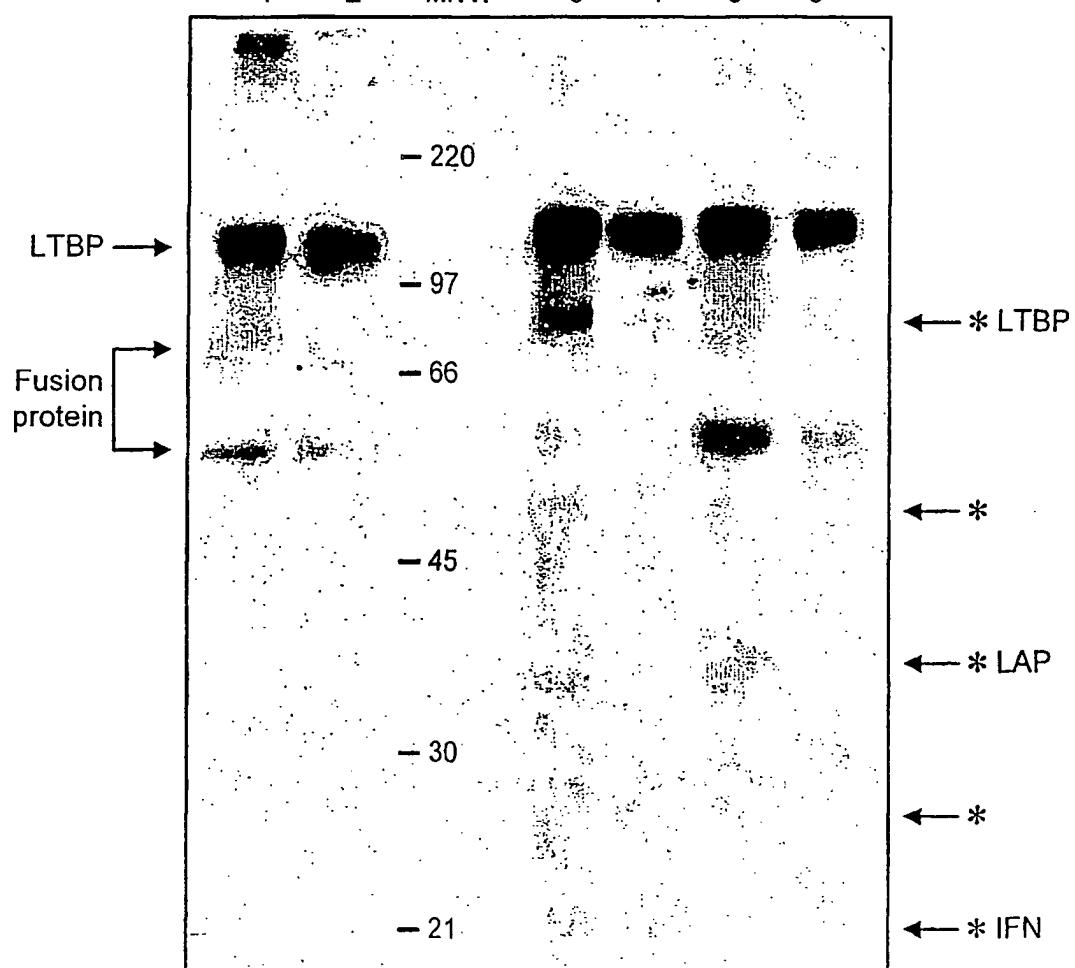


FIG. 7

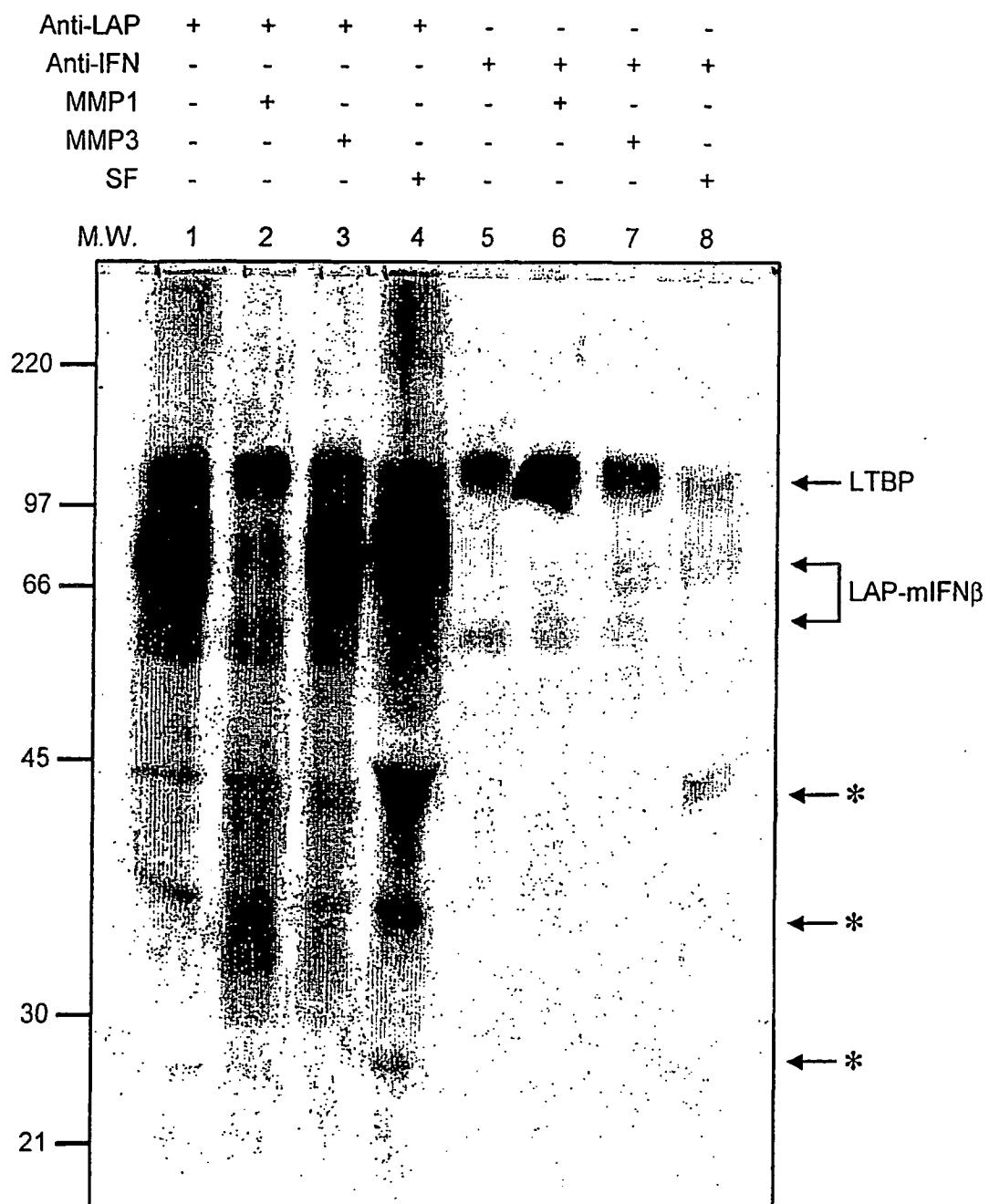


FIG. 8a

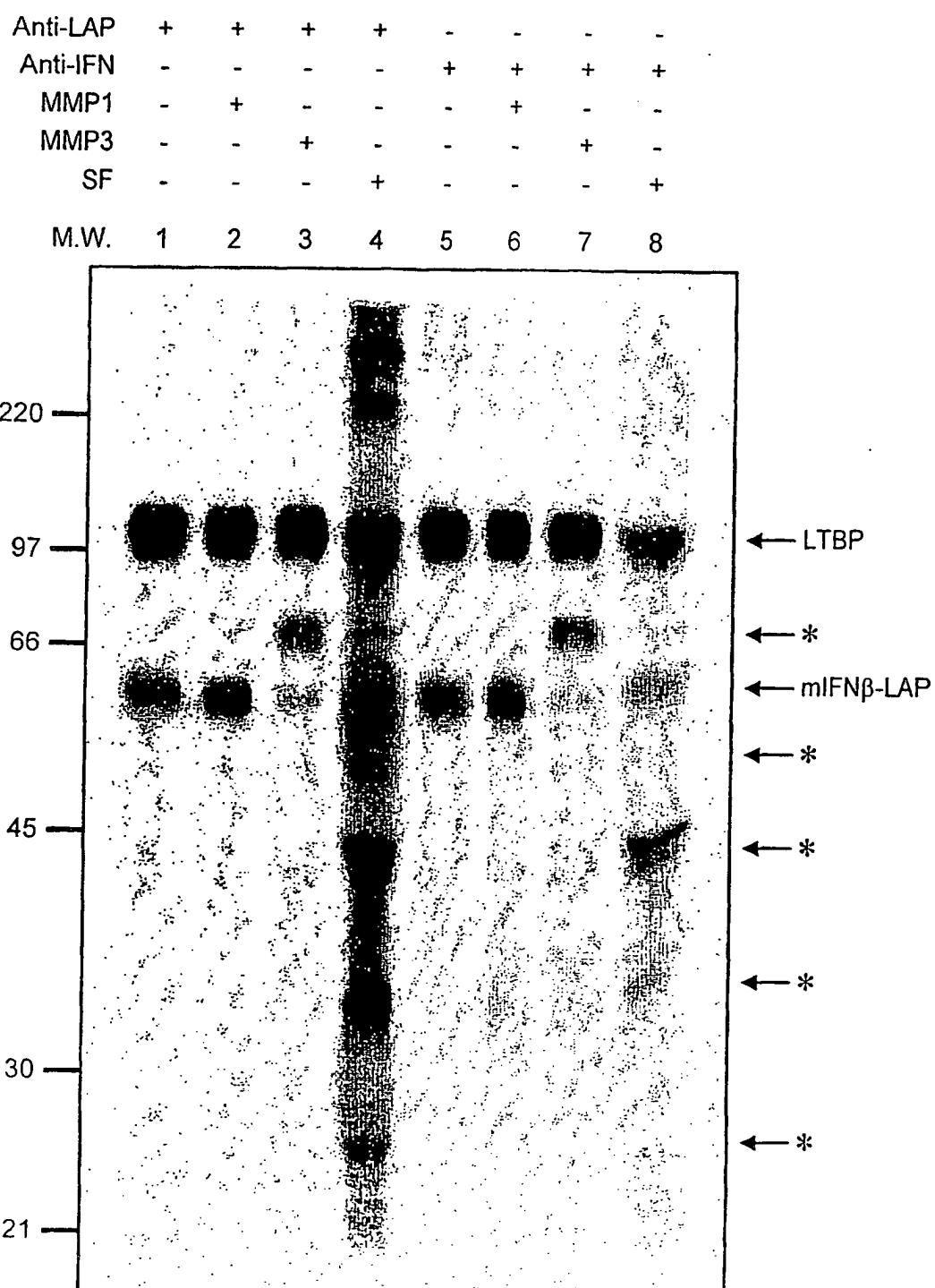


FIG. 8b

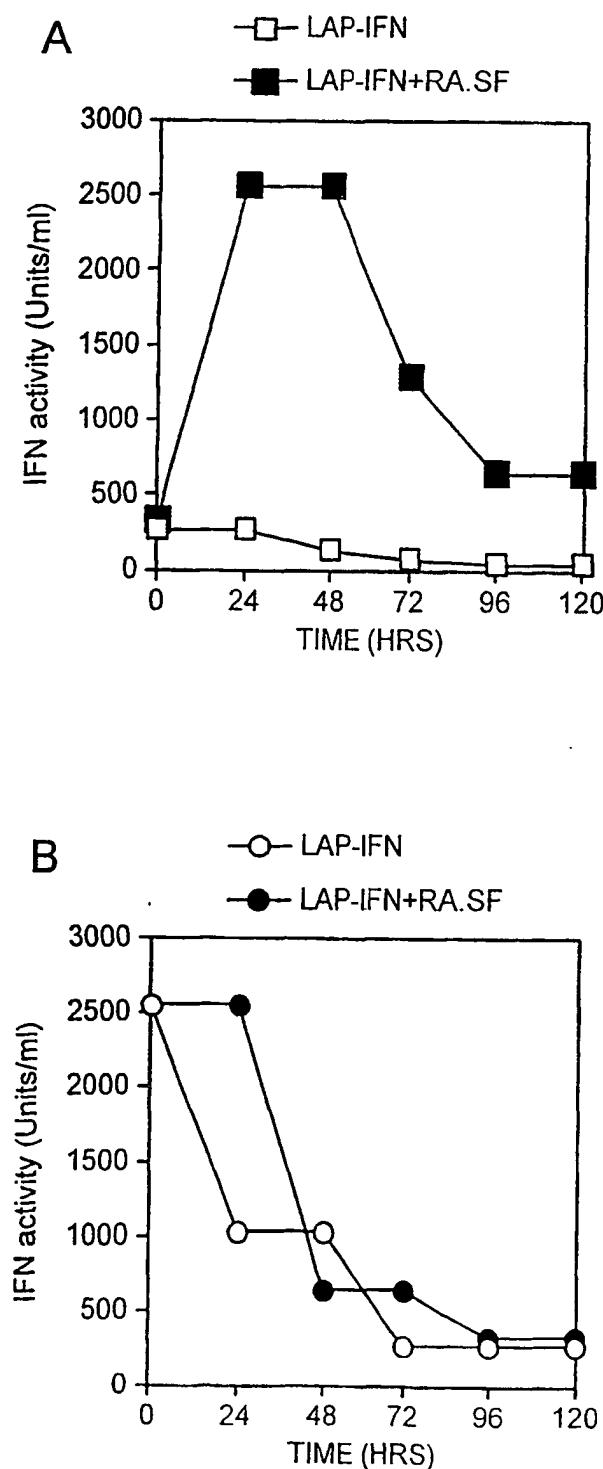


FIG. 9

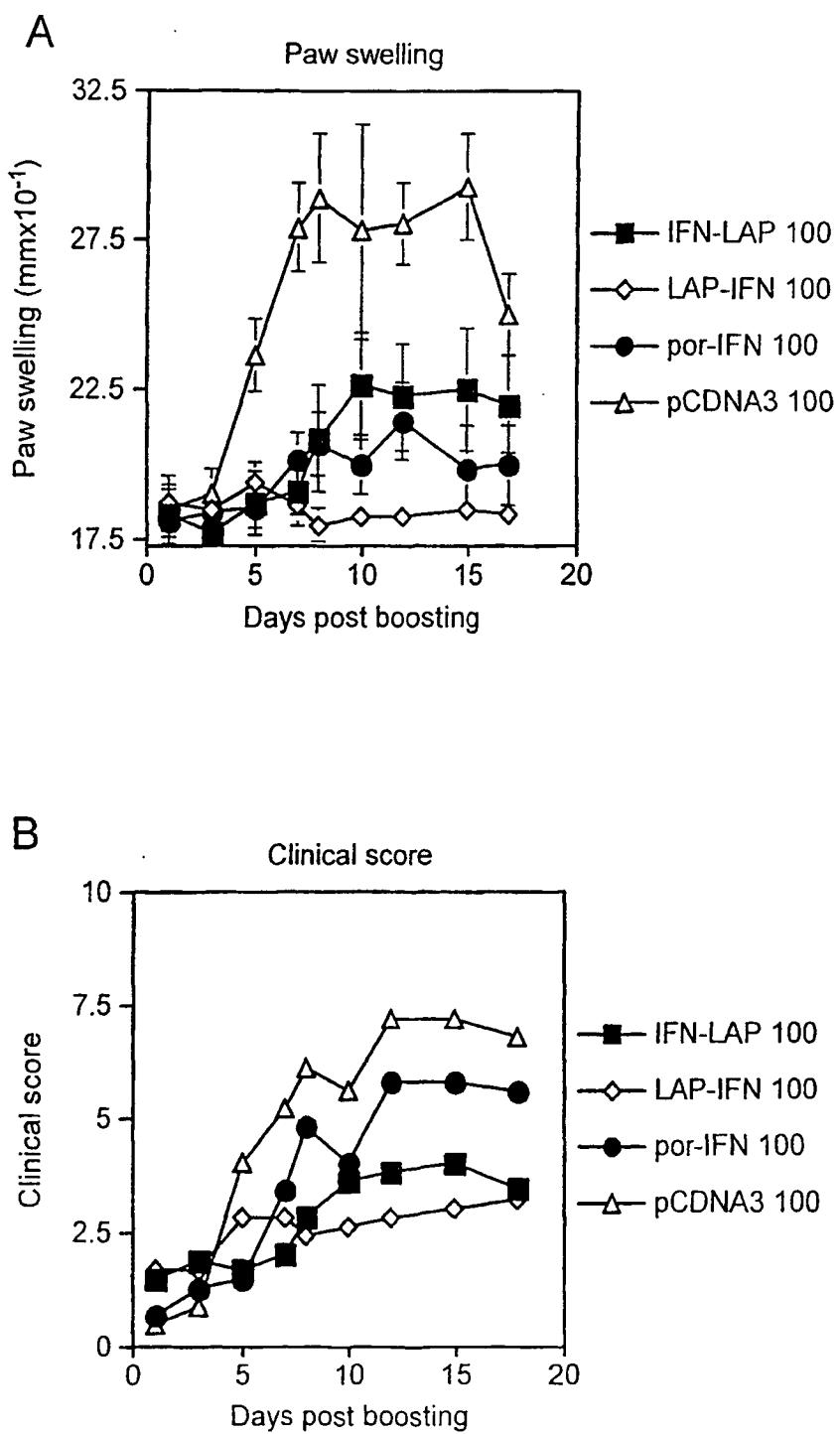


FIG. 10

FIG. 11

huIFN-LAP -> 1-phase Translation

DNA Sequence 1352b.p. ATGAAACAAACAGG ... CTGATCTAGACC linear

1 / 1 31 / 11
 ATG AAC AAC AGG TGG ATC CTC CAC GCT GCG TTC CTG CTG TGC TTC TCC ACC ACA GCA GCC CTC
 met asn asn arg trp ile leu his ala ala phe leu leu cys phe ser thr thr ala leu
 61 / 21 91 / 31
 TCC ATC AAC TAT AAG CAG CTC CAG CTC CAA GAA AGG ACG AAC ATT CGG AAA TGT CAG GAG
 ser ile asn tyr lys gln leu gln glu arg thr asn ile arg lys cys gln glu
 121 / 41 151 / 51
 CTC CTG GAG CAG CTG AAT GGA AAG ATC AAC CTC ACC TAC AGG GCG GAC TTC AAG ATC CCT
 leu leu glu gln leu asn gly lys ile asn leu thr tyr arg ala asp phe lys ile pro
 181 / 61 211 / 71
 ATG GAG ATG ACG GAG AAG ATG CAG AAG AGT TAC ACT GCC TTT GCC ATC CAA GAG ATG CTC
 met glu met thr glu lys met gln lys ser tyr thr ala phe ala ile gln glu met leu
 241 / 81 271 / 91
 CAG AAT GTC TTT CTT GTC TTC AGA AAC AAT TTC TCC AGC ACT GGG TGG AAT GAG ACT ATT
 gln asn val phe leu val phe arg asn asn phe ser ser thr gly trp asn glu thr ile
 301 / 101 331 / 111
 GTT GTA CGT CTC CTG GAT GAA CTC CAC CAG CAG ACA GTG TTT CTG AAG ACA GTA CTA GAG
 val val arg leu leu asp glu leu his gln gln thr val phe leu lys thr val leu glu
 361 / 121 391 / 131
 GAA AAG CAA GAG GAA AGA TTG ACG TGG GAG ATG TCC TCA ACT GCT CTC CAC TTG AAG AGC
 glu lys gln glu glu arg leu thr trp glu met ser ser thr ala leu his leu lys ser
 421 / 141 451 / 151
 TAT TAC TGG AGG GTG CAA AGG TAC CTT AAA CTC ATG AAG TAC AAC AGC TAC GCC TGG ATG
 tyr tyr trp arg val gln arg tyr leu lys leu met lys tyr asn ser tyr ala trp met
 481 / 161 511 / 171
 GTG GTC CGA GCA GAG ATC TTC AGG AAC TTT CTC ATC ATT CGA AGA CTT ACC AGA AAC TTC
 val val arg ala glu ile phe arg asn phe leu ile ile arg arg leu thr arg asn phe
 541 / 181 571 / 191
 CAA AAC GAA TTC GGG GGA GGC GGA TCC CCG CTC GGG CTT TGG GCG GGA GGG GGC TCA GCG
 gln asn glu phe gly gly gly ser pro leu gly leu trp ala gly gly gly ser ala
 601 / 201 631 / 211
 GCC GCA CTA TCC ACC TGC AAG ACT ATC GAC ATG GAG CTG GTG AAG CGG AAG CGC ATC GAG
 ala ala leu ser thr cys lys thr ile asp met glu leu val lys arg lys arg ile glu
 661 / 221 691 / 231
 GCC ATC CGC GGC CAG ATC CTG TCC AAG CTG CGG CTC GCC AGC CCC CCG AGC CAG GGG GAG
 ala ile arg gly gln ile leu ser lys leu arg leu ala ser pro pro ser gln gly glu
 721 / 241 751 / 251
 GTG CCG CCC GGC CCG CTG CCC GAG GCC GTG CTC GCC CTG TAC AAC AGC ACC CGC GAC CGG
 val pro pro gly pro leu pro glu ala val leu ala leu tyr asn ser thr arg asp arg
 781 / 261 811 / 271
 GTG GCC GGG GAG AGT GCA GAA CCG GAG CCC GAG CCT GAG GCC GAC TAC TAC GCC AAG GAG
 val ala gly glu ser ala glu pro glu pro glu ala asp tyr tyr ala lys glu
 841 / 281 871 / 291
 GTC ACC CGC GTG CTA ATG GTG GAA ACC CAC AAC GAA ATC TAT GAC AAG TTC AAG CAG AGT
 val thr arg val leu met val glu thr his asn glu ile tyr asp lys phe lys gln ser

901 / 301 931 / 311
 ACA CAC AGC ATA TAT ATG TTC TTC AAC ACA TCA GAG CTC CGA GAA GCG GTA CCT GAA CCC
 thr his ser ile tyr met phe phe asn thr ser glu leu arg glu ala val pro glu pro
 961 / 321 991 / 331
 GTG TTG CTC TCC CGG GCA GAG CTG CGT CTG AGG AGG CTC AAG TTA AAA GTG GAG CAG
 val leu leu ser arg ala glu leu arg leu leu arg arg leu lys leu lys val glu gln
 1021 / 341 1051 / 351
 CAC GTG GAG CTG TAC CAG AAA TAC AGC AAC AAT TCC TGG CGA TAC CTC AGC AAC CGG CTG
 his val glu leu tyr gln lys tyr ser asn asn ser trp arg tyr leu ser asn arg leu
 1081 / 361 1111 / 371
 CTG GCA CCC AGC GAC TCG CCA GAG TGG TTA TCT TTT GAT GTC ACC GGA GTT GTG CGG CAG
 leu ala pro ser asp ser pro glu trp leu ser phe asp val thr gly val val arg gln
 1141 / 381 1171 / 391
 TGG TTG AGC CGT GGA GGG GAA ATT GAG GGC TTT CGC CTT AGC GCC CAC TGC TCC TGT GAC
 trp leu ser arg gly gly glu ile glu gly phe arg leu ser ala his cys ser cys asp
 1201 / 401 1231 / 411
 AGC AGG GAT AAC ACA CTG CAA GTG GAC ATC AAC GGG TTC ACT ACC GGC CGC CGA GGT GAC
 ser arg asp asn thr leu gln val asp ile asn gly phe thr thr gly arg arg gly asp
 1261 / 421 1291 / 431
 CTG GCC ACC ATT CAT GGC ATG AAC CGG CCT TTC CTG CTT CTC ATG GCC ACC CCG CTG GAG
 leu ala thr ile his gly met asn arg pro phe leu leu leu met ala thr pro leu glu
 1321 / 441
 AGG GCC CAG CAT CTG CAA AGC TGA TCT AGA
 arg ala gln his leu gln ser OPA ser arg

FIG. 11 CONT'D

FIG. 12

LAP human IFNbeta -> 1-phase Translation

DNA Sequence 1391b.p. ATGCCGCCCTCC ... CTGATCTAGACC linear

1 / 1	31 / 11
ATG CCG CCC TCC GGG CTG CGG CTG CTG CCG CTG CTG CTA CCG CTG CTG TGG CTA CTG GTG	
met pro pro ser gly leu arg leu leu pro leu leu leu pro leu leu trp leu leu val	
61 / 21	91 / 31
CTG ACG CCT GGC CCG CCG GCC GCG GGA CTA TCC ACC TGC AAG ACT ATC GAC ATG GAG CTG	
leu thr pro gly pro pro ala ala gly leu ser thr cys lys thr ile asp met glu leu	
121 / 41	151 / 51
GTG AAG CGG AAG CGC ATC GAG GCC ATC CGC GGC CAG ATC CTG TCC AAG CTG CGG CTC GCC	
val lys arg lys arg ile glu ala ile arg gly gln ile leu ser lys leu arg leu ala	
181 / 61	211 / 71
AGC CCC CCG AGC CAG GGG GAG GTG CCG CCC GGC CCG CTG CCC GAG GCC GTG CTC GCC CTG	
ser pro pro ser gln gly glu val pro pro gly pro leu pro glu ala val leu ala leu	
241 / 81	271 / 91
TAC AAC AGC ACC CGC GAC CGG GTG GCC GGG GAG AGT GCA GAA CCG GAG CCC GAG CCT GAG	
tyr asn ser thr arg asp arg val ala gly glu ser ala glu pro glu pro glu pro glu	
301 / 101	331 / 111
GCC GAC TAC TAC GCC AAG GAG GTC ACC CGC GTG CTA ATG GTG GAA ACC CAC AAC GAA ATC	
ala asp tyr tyr ala lys glu val thr arg val leu met val glu thr his asn glu ile	
361 / 121	391 / 131
TAT GAC AAG TTC AAG CAG AGT ACA CAC AGC ATA TAT ATG TTC AAC ACA TCA GAG CTC	
tyr asp lys phe lys gln ser thr his ser ile tyr met phe phe asn thr ser glu leu	
421 / 141	451 / 151
CGA GAA GCG GTA CCT GAA CCC GTG TTG CTC TCC CCG GCA GAG CTG CGT CTG CTG AGG AGG	
arg glu ala val pro glu pro val leu leu ser arg ala glu leu arg leu leu arg arg	
481 / 161	511 / 171
CTC AAG TTA AAA GTG GAG CAG CAC GTG GAG CTG TAC CAG AAA TAC AGC AAC AAT TCC TGG	
leu lys leu lys val glu gln his val glu leu tyr gln lys tyr ser asn asn ser trp	
541 / 181	571 / 191
CGA TAC CTC AGC AAC CGG CTG CTG GCA CCC AGC GAC TCG CCA GAG TGG TTA TCT TTT GAT	
arg tyr leu ser asn arg leu leu ala pro ser asp ser pro glu trp leu ser phe asp	
601 / 201	631 / 211
GTC ACC GGA GTT GTG CGG CAG TGG TTG AGC CGT GGA GGG GAA ATT GAG GGC TTT CGC CTT	
val thr gly val val arg gln trp leu ser arg gly gly glu ile glu gly phe arg leu	
661 / 221	691 / 231
AGC GCC CAC TGC TCC TGT GAC AGC AGG GAT AAC ACA CTG CAA GTG GAC ATC AAC GGG TTC	
ser ala his cys ser cys asp ser arg asp asn thr leu gln val asp ile asn gly phe	
721 / 241	751 / 251
ACT ACC GGC CGC CGA GGT GAC CTG GCC ACC ATT CAT GGC ATG AAC CGG CCT TTC CTG CTT	
thr thr gly arg arg gly asp leu ala thr ile his gly met asn arg pro phe leu leu	
781 / 261	811 / 271
CTC ATG GCC ACC CCG CTG GAG AGG GCC CAG CAT CTG CAA AGC GAA TTC GGG GGA GGC GGA	
leu met ala thr pro leu glu arg ala gln his leu gln ser glu phe gly gly gly	
841 / 281	871 / 291
TCC CCG CTC GGG CTT TGG GCG GGA GGG GGC TCA GCG GCC GCA ATG AGC TAC AAC TTG CTT	
ser pro leu gly leu trp ala gly gly ser ala ala met ser tyr asn leu leu	

901 / 301 931 / 311
 GGA TTC CTA CAA AGA AGC AGC AAT TTT CAG TGT CAG AAG CTC CTG TGG CAA TTG AAT GGG
 gly phe leu gln arg ser ser asn phe gln cys gln lys leu leu trp gln leu asn gly
 961 / 321 991 / 331
 AGG CTT GAA TAT TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC CCT GAG GAG ATT AAG CAG
 arg leu glu tyr cys leu lys asp arg met asn phe asp ile pro glu glu ile lys gln
 1021 / 341 1051 / 351
 CTG CAG CAG TTC CAG AAG GAG GAC GCC GCA TTG ACC ATC TAT GAG ATG CTC CAG AAC ATC
 leu gln gln phe gln lys glu asp ala ala leu thr ile tyr glu met leu gln asn ile
 1081 / 361 1111 / 371
 TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT AGC ACT GGC TGG AAT GAG ACT ATT GTT GAG AAC
 phe ala ile phe arg gln asp ser ser ser thr gly trp asn glu thr ile val glu asn
 1141 / 381 1171 / 391
 CTC CTG GCT AAT GTC TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA GTC CTG GAA GAA AAA CTG
 leu leu ala asn val tyr his gln ile asn his leu lys thr val leu glu glu lys leu
 1201 / 401 1231 / 411
 GAG AAA GAA GAT TTT ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA AGA TAT TAT
 glu lys glu asp phe thr arg gly lys leu met ser ser leu his leu lys arg tyr tyr
 1261 / 421 1291 / 431
 GGG AGG ATT CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AGT CAC TGT GCC TGG ACC ATA GTC
 gly arg ile leu his tyr leu lys ala lys glu tyr ser his cys ala trp thr ile val
 1321 / 441 1351 / 451
 AGA GTG GAA ATC CTA AGG AAC TTT TAC TTC ATT AAC AGA CTT ACA GGT TAC CTC CGA AAC
 arg val glu ile leu arg asn phe tyr phe ile asn arg leu thr gly tyr leu arg asn
 1381 / 461
 TGA TCT AGA
 OPA ser arg

FIG. 12 CONT'D