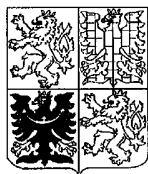


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.12.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/068295**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.03.2001**
(Věstník č. 3/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/26926**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/32141**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2287

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/21	A 61 P 35/00
A 61 K 38/17	A 61 P 37/00
C 07 K 14/555	
C 07 K 14/715	
C 07 K 19/00	
C 12 N 15/12	
C 12 N 5/10	
A 61 P 31/12	

(71) Přihlašovatel:

APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING
N.V., Curacao, AN;

(72) Původce:

Tepper Mark, Canton, MA, US;
Cunningham Mark, Waltham, MA, US;
Sherris David, Jamaican Plain, MA, US;
El Tayar Nabil, Milton, MA, US;
McKenna Sean, Ducksberry, MA, US;

(74) Zástupce:

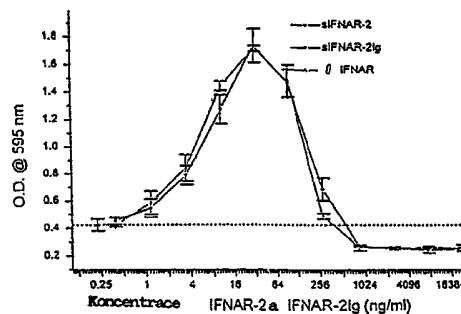
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Komplex IFNAR2/IFN

(57) Anotace:

Účinek in vivo interferonu typ I (IFN) se může prodloužit aplikací interferonu ve formě komplexu s řetězcem vázajícího IFN receptoru lidského interferonu α/β (IFNAR). Takový komplex také zlepšuje stabilitu IFN a zesiluje účinnost IFN. Komplex může být nekovalentní komplex nebo komplex, ve kterém IFN a IFNAR jsou vázány kovalentní vazbou nebo peptidem. Když jsou vázány peptidovou vazbou ve formě fúzního proteinu, IFN se může separovat od IFNAR pomocí peptidového linkeru. Takový fúzní protein se může připravovat technologií rekombinantní DNA. Uchovávání IFN ve formě takového komplexu zlepšuje kvalitu uchovávání IFN a umožňuje skladování za vlidnějších podmínek, než je jinak možné.



Oblast techniky

Vynález popisuje komplex interferonu typ I skládající se z polypeptidové sekvence extracelulární oblasti receptoru lidského interferonu α/β a interferonu typ I ($\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$ a $\text{IFN}\omega$). Takový komplex zlepšuje stabilitu, zvyšuje účinnost a prodlužuje farmakokinetiku anti-virové, imunomodulační aktivity a aktivity proti zhoubnému bujení volného IFN *in vivo*. Komplex je fúzní protein nebo kovalentní komplex nebo nekovalentní komplex obsahující polypeptidovou sekvenci celé extracelulární oblasti IFNAR2 nebo její libovolnou část vázající interferon, která tvoří komplex s interferonem typu I ($\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\omega$) nebo s její libovolnou biologicky aktivní částí.

Dosavadní stav techniky

Interferony se klasifikují buď jako interferony typu I získané z leukocytů a fibroblastů nebo jako indukované mitogeny nebo „imunitní“ interferony typu II (Pestka et al., „Interferons and their actions,” Ann. Rev. Biochem. 56: 727-777 (1987)). Na základě analýzy sekvenčních identit a běžných biologických aktivit se zjistilo, že interferony typu I zahrnují interferon alfa ($\text{IFN}\alpha$), interferon beta ($\text{IFN}\beta$) a interferon omega ($\text{IFN}\omega$), zatímco interferon typu II zahrnuje interferon gama ($\text{IFN}\gamma$). Geny $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\beta$, $\text{IFN}\omega$ se nacházejí na krátkém rameni chromozomu 9 (Lengyl, P., „Biochemistry of interferons and their actions,” Ann. Rev. Biochem. 51: 251-282 (1982)). Existuje alespoň 25 nealelových genů $\text{IFN}\alpha$, 6 nealelových genů $\text{IFN}\omega$ a jeden gen $\text{IFN}\beta$. Odborníci věří, že se všechny vyvinuly z jednoho běžného původního genu. Mezi druhy

geny IFN α sdílejí alespoň 80 % sekvenční identitu. Geny IFN β sdílejí přibližně 50 % sekvenční identitu s IFN α a gen IFN ω sdílí 70 % homologii s IFN α (Weissmann et al., „Prog. Nucleic. Acid Res. 33. 251-302 (1986), Dron et al., „Interferon α/β gene structure and regulation" in Interferon : Principles and Medical Applications, Baron et al., Editors, (University of Texas Medical Branch: Galveston, TX, 1992) pp. 33-45.)). Molekulová hmotnost IFN α je v rozmezí 17 000 až 23 000 (165 až 166 aminokyselin), molekulová hmotnost IFN β je přibližně 23 000 (166 aminokyselin) a molekulová hmotnost IFN ω je přibližně 24 000 (172 aminokyselin).

Interferony typ I jsou pleiotrofní cytokiny, které vykazují aktivitu v obranném systému hostitele proti virové a parazitické infekci, jako cytokiny působící proti rakovině a jako imunitní modulátory (Baron et al., „The interferons: A biological system with therapeutic potential in viral infections", Antiviral Res. 24: 97-110 (1994), Baron et al., „The interferons. Mechanisms of action and clinical applications," J. Am. Med. Assoc. 266: 1375-1383 (1991)). Fyziologické odezvy interferonu typ I zahrnují anti-proliferační aktivitu na normálních a transformovaných buňkách, stimulaci cytotoxické aktivity v lymfocytech, přirozené buňky K a fagocytů, modulaci buněčné diferenciaci, stimulaci exprese antigenů MHC třídy I, inhibici MHC třídy II a modulaci různých buněčných povrchových receptorů. Za normálních fyziologických podmínek IFN α a IFN β (IFN α /IFN β) se vylučují konstitutivně ve většině lidských buněk v malém množství, přičemž exprese se zesiluje adicí různých indukčních činidel, které zahrnují infekční činidla (viry, bakterie, mykoplasma a protozoa), dvouřetězcovou RNA a cytokiny (M-CSF, IL-1 α , IL-2, TNF α). Působení interferonu typ I *in vivo* se může monitorovat za použití náhradních markerů, neopterinu, 2',5'-oligoadenylátové syntetázy a β -2-mikroglobulinu (Alam et al.,

„Comperative pharmacokinetics and Pharmacodynamics of two recombinant human interferon beta-1 ($\text{IFN}\beta\text{-1}\alpha$) products administered intramuscularly in healthy male and female volunteers," *Parmaaceutical Research* 14: 546-549 (1997), Fierlbeck et al., "„harmacodynamics of recombinant $\text{IFN}\beta$ during long-term treatment of malignant melanoma," *Journal of Interferon and Cytokine Research* 16: 777 (1996), Salmon et al., „Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human $\text{IFN}\beta$ in healthy male volunteers," *Journal of Interferon and Cytokine Research* 16: 759 (1996)).

Interferony typ I ($\text{IFN}\alpha/\beta/\omega$) působí prostřednictvím komplexu povrchového receptoru tak, že indukují specifické biologické účinky, jako je antivirová, antinádorová a imunní modulační aktivita. Receptor IFN typ I (IFNAR) je heteromultimérový receptorový komplex, který se skládá z alespoň ze dvou různých polypeptidových řetězců (Colamonici et al., „Multichain structure of the interferon alpha receptor on hematopoietic cells," *J. Immunol.* 148: 2126-2132 (1992), Colamonici et al., „Identification of a novel subunit of the Type I interferon receptor localized to human chromosome 21", *J. BIOL. Chem.* 268: 10895-10899 (1993)). Geny pro tyto řetězce se nacházejí na chromozómu 21 a jejich proteiny se exprimují na povrchu většiny buněk (Tan et al., „The linkage of genes for the human interferon induced antiviral protein and indophenol oxidase-B traits to chromosome G-21," *J. Exp. Med.* 137: 317-330 (1973)). Řetězce receptorů se původně označily jako alfa a beta, vzhledem k jejich schopnosti být rozeznávány monoklonálními protilátkami $\text{IFN}\alpha\text{R3}$ a $\text{IFN}\alpha\text{R}\beta\text{1}$. Pak se přejmenovaly na IFNAR1 v případě podjednotky alfa a IFNR2 v případě podjednotky beta. U většiny buněk molekula IFNAR1 (řetězec alfa, podjednotka Uze) (Uze et al., „Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA," *Cell* 60: 225-234 (1990)) vykazuje molekulovou hmotnost 100 až 130 000 , zatímco

IFNAR2 (řetězec beta, β_L , IFN α / β R) má molekulovou hmotnost 100 000. U jistých buněčných typů (linie monocytů a normálních buněk kostní dřeně) se identifikoval další receptorový komplex, kde podjednotka IFNAR2 (β_s) se exprimuje jako zkrácený receptor s molekulovou hmotností 51 000. Klonovaly se podjednotky IFNAR1 a IFNAR2 β_s a β_L (Novick et al., „The human interferon α /b receptor: Characterization and molecular cloning,” Cell 77: 391-400 (1994), Domanski et al, „Cloning and Expression of a Long Form of the β subunit of the Interferon α β Receptor That is required for Signaling,” J. Exp. Med. 184: 2043-2048 (1995)). Podjednotky IFNAR2 β_s a β_L mají identické extracelulární a transmembránové domény, avšak v cytoplazmatické oblasti pouze sdílí identitu prvních 15 aminokyselin. Samotná podjednotka IFNAR2 je schopna vázat IFN α / β , zatímco podjednotka IFNAR1 je schopna vázat IFN α / β . Když se samotná podjednotka lidského receptoru IFNAR1 transfekovala do myších fibroblastů L-929, pak se na buňky nebyl schopen navázat žádný lidský IFN α s mimo IFN α 8/ IFN α B (Uze et al., „Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA,” Cell 60: 225-234 (1990)). Lidská podjednotka IFNAR2 transfekovaná do buněk L za nepřítomnosti lidské podjednotky IFNAR1 váže lidský IFN α 2. Přibližná hodnota K_d navázání je 0,45 nM. Když se lidské podjednotky IFNAR2 transfekovaly v přítomnosti lidské podjednotky IFNAR1, pak navázání s vysokou účinností vykazuje hodnotou K_d 0,026-0,114 nM (Novick et al., „The human interferon α /b receptor: Characterization and molecular cloning,” Cell 77: 391-400 (1994), Domanski et al, „Cloning and Expression of a Long Form of the β subunit of the Interferon α β Receptor That is required for Signaling,” J. Exp. Med. 184: 2043-2048 (1995)). Odhaduje se, že na většině buněk existují pro IFN vazebná místa s vysokou afinitou 500 až 20 000 a s nízkou afinitou 2

000 až 100 000. Ačkoli komplexní pod-jednotky IFNAR1/2 (α/β s nebo (α/β L) se váží s vysokou afinitou pak pouze pár (α/β L) se jeví být funkčním signálním receptorem.

Transfekce pod-jednotek IFNAR1 a IFNAR2 β L do myšších buněk L-929, následovaná inkubací s IFN α 2 vyvolává anti-virové stádium, inicijuje vnitrobuněčnou proteinovou fosforylaci a způsobuje aktivaci vnitrobuněčných kináz (Jak1 a Tyk2) a transkripční faktory (STAT 1, 2 a 3) (Novick et al., „The human interferon α/β receptor: Characterization and molecular cloning,” Cell 77: 391-400 (1994), Domanski et al., „Cloning and Expression of a Long Form of the β subunit of the Interferon α β Receptor That is required for Signaling,” J. Exp. Med. 184: 2043-2048 (1995)). V odpovídajícím experimentu transfekce pod-jednotky IFNAR2 β s není schopna iniciovat podobnou odezvu. Tak podjednotka IFNAR2 β L je nutná pro funkční aktivitu (anti-virovou odezvu) s maximální indukci, která se objevuje ve spojení s podjednotkou IFNAR1.

Vedle povrchových buněčných forem IFNAR vázaných na membráně se jak v séru tak v moči identifikoval rozpustný IFNAR (Novick et al., „The human interferon α/β receptor: Characterization and molecular cloning,” Cell 77: 391-400 (1994), Novick et al., „Soluble and membrana Novick et al., „The human interferon α/β receptor: Characterization and molecular cloning,” Cell 77: 391-400 (1994), ne-anchored forms of the human IFN- α/β receptor”, J. Leuk. Bio. 57: 712-718 (1995), Novick et al., Soluble interferon-alpha receptor molecules are present in body fluids” FEBS Lett. 314: 445-448 (1992), Lutfalla et al., „Mutant USA cells are complemented by an interferon- α/β receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster,” EMBO Journal 14: 5100-5108 (1995)). Rozpustný IFNAR izolovaný ze séra má v testu SDS-PAGE zjevnou molekulovou hmotnost 55 000, zatímco rozpustná forma IFNAR pocházející

z moče má zjevnou molekulovou hmotnost 40 až 45 000 (p40). Transkripty rozpustného p40 IFNAR2 jsou přítomny na úrovni mRNA a obsahují skoro celou extracelulární doménu podjednotky IFNAR2 se dvěma novými aminokyselinami na C-konci. Na rozpustném receptoru IFNAR2 existuje pět potenciálně glykozylovaných míst. Ukázalo se, že rozpustná forma p40 IFNAR2 váže IFN α 2 a IFN β a inhibuje *in vitro* anti-virovou aktivitu směsi druhů IFN α (leukocyt IFN) a jednotlivé IFN typ I (Novick et al., „Soluble and membra Novick et al., „The human interferon a/b receptor: Characterization and molecular clonning,” Cell 77: 391-400 (1994), ne-anchored forms of the human IFN- α / β receptor”, J. Leuk. Bio. 57: 712-718 (1995)). Dále se ukázalo, že rekombinantní podjednotka IFNAR2 Ig fúzního proteinu inhibuje navázání různých druhů IFN typ I (IFN α A, IFN α B, IFN α D, IFN β , IFN α Con1 a FN ω) na Daudiho buňky a podjednotkou α / β s se transfekovaly buňky COS.

Identifikovaly se signální cesty IFN typ I (Platanias et al., „Differences in interferon α and β signaling,” J. Biol. Chem. 271: 23630-23633 (1996), Yan et al., „Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFN α R1) domain required for TYK2 binding and signal transduction,” Mol. Cell. Bio. 16: 2074-2082 (1996), Yang et al., „Direct association of STAT3 with the IFNAR-1 chain of the human Type I interferon receptor,” J. Biol. Chem. 271: 8057-8061 (1996), Qureshi et al., „Function of Stat2 protein in transcriptional activation by alpha interferon,” Mol. Cell. Bio. 16: 288-293 (1996), Sharf et al., „Functional domain analysis of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) and its association with interferon regulatory factors,” J. Biol. Chem. 270: 13063-13069 (1995)). Uvažuje se, že iniciační rysy vedoucí k signalizaci se projevují navázáním IFN α / β / ω na podjednotku IFNAR2 následovanou spojením podjednotky IFNAR1 za vzniku komplexu IFNAR1/2 (Platanias et

al., „Tyrosine phosphorylation of the α and β subunits of the Type I interferon receptor" J. Biol. Chem. 269: 17761-17764 (1994). Navázání IFN α / β / ω na komplex IFNAR1/2 vede k aktivaci dvou Janusových kináz (Jak1 a Tyk2), které jsou známy tím, že fosforylují specifické tyroziny na podjednotkách IFNAR1 a IFNAR2. Po té, co se tyto podjednotky fosforylují, molekuly STAT (STAT 1, 2, a 3) se také fosforylují, což vede k dimerizaci transkripčních komplexů STAT, po čemž následuje jaderná lokalizace transkripčního komplexu a aktivace specifických indukovatelných genů IFN.

Hodnotily se farmakokinetiky a farmakodynamiky IFN typu I u lidí (Alam et al., „Comparative pharmacokinetics and Pharmacodynamics of two recombinant human interferon beta-1 (IFN β -1 α) products administered intramuscularly in healthy male and female volunteers," Pharmaceutical Research 14: 546-549 (1997), Fierlbeck et al., „Pharmacodynamics of recombinant IFN β during long-term treatment of malignant melanoma," Journal of Interferon and Cytokine Research 16: 777 (1996), Salmon et al., „Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human IFN β in healthy male volunteers," Journal of Interferon and Cytokine Research 16: 759 (1996)). Odstranění IFN β docela je rychlé, jestliže biologická dostupnost IFN β je nižší než se očekávalo v případě většiny cytokináz. Ačkoli u lidí se odhadovaly farmakodynamiky IFN β , nenašla se jasná korelace mezi biologickou dostupností IFN β a klinické účinností. U normálních zdravých lidských dobrovolníků aplikace jediné intravenózní (iv) bolusové dávky (6 MIU) rekombinantního CHO získaného IFN β vede do fáze rychlé distribuce, která trvá 5 minut a poločas rozpadu je 5 hodin (Alam et al., „Comparative pharmacokinetics and Pharmacodynamics of two recombinant human interferon beta-1 (IFN β -1 α) products administered intramuscularly in healthy male and female volunteers," Pharmaceutical Research 14: 546-549 (1997)). Po podkožní (sc) nebo intramuskulární aplikaci

IFN β , je v séru obsaženo pouze přibližně 15 % dávky, která je dostupná při systémové aplikaci. Farmakodynamiky IFN β , které následují po aplikaci iv, im nebo sc (měří se na základě změn 2',5'-oligoadenylované syntetázy (2',5'AS) v PBMC) se hodnotily během prvních 24 hodin. Po dobu dalších čtyř dní pomalu klesaly na hodnotu pozadí. Síla a délka biologického účinku je stejná s ohledem na způsob aplikace.

Po aplikaci injekcí im jediné dávky 6 MIU rekombinantního IFN β se testovaly farmakokinetiky (PK) a farmakodynamiky (PD) IFN β připravených dvěma rozdílnými firmami (REBIF®-Serono a AVONEX®-Biogen) (popisuje se v publikaci Salmon et al., „Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human IFN β in healthy male volunteers,” Journal of Interferon and Cytokine Research 16: 759 (1996)). Monitorovala se koncentrace IFN β v séru a IFN β nahradního markeru neoptorinu v čase. Oba přípravky IFN β vykazují podobné profily PK, přičemž maxima IFN β v séru se dosáhlo po přibližně 12 až 15 hodinách, ačkoli přípravek REBIF® vykazuje nižší maximální hodnotu. Množství IFN β zbývá hodnotit v případě přípravků REBIF® a AVONEX® po dobu alespoň prvních 36 hodin po injekci im. Po 48 hodinách hodnota poklesla slabě pod základní linii. Množství neopterinu vykazuje velmi podobný profil u přípravků REBIF® a AVONEX®, přičemž maximálního množství neopterinu se dosáhlo přibližně 44 až 50 hodin po injekci. Zbytek se hodnotil až do doby 72 hodin po injekci a pak postupně během 144 hodin klesly na základní linii.

Farmakodynamická studie IFN β s více dávkami se provedla u lidských pacientů s melanomem (Fierlbeck et al., „Pharmacodynamics of recombinant IFN β during long-term treatment of malignant melanoma,” Journal of Interferon and Cytokine Research 16: 777 (1996)), přičemž IFN β se aplikoval cestou sc, třikrát v týdnu při dávce 3MIU v jedné dávce po dobu šesti měsíců. Maxima farmakodynamických markerů, 2',5'-AS

syntetáz, β 2-mikroglobulinu, neopterinu a aktivace buněk NK se dosáhlo aplikací druhé injekce (den 4.) a poklesla během 28 dní, zbývající se po šesti měsících slabě zvýšily.

Vymizení interferonů typ I u lidí je rychlé. Přípravky interferonu působící po dlouhou dobu budou mít velký přínos v klinické praxi.

Podstata vynálezu

Zjistilo se, že komplex interferonu typ I zahrnuje rozpustnou formu IFNAR v komplexu s interferony typu I (IFN), vykazuje zlepšenou stabilitu, zvýšenou účinnost a prodloužené farmakokinetiky *in vivo* v porovnání s volným IFN v případě proti virové, proti rakovinové a imunitní modulační aktivity.

Vynález popisuje komplex interferonu typ I (IFN), který zahrnuje polypeptidovou sekvenci extracelulární oblast pod-jednotky receptoru lidského interferonu α/β (IFNAR), které vykazují zdokonalenou stabilitu, zvýšenou účinnost a/nebo prodloužené farmakokinetiky *in vivo* v porovnání s volným IFN v případě proti virové, proti rakovinové a imunitní modulační aktivity. Upřednostňuje se, aby komplex byl extracelulární oblast pod-jednotky IFNAR2 s libovolným interferonem typu I nebo s pod-jednotkou IFNAR1 s IFN α .

Komplex je fúzní protein nebo kovalentní komplex nebo ne kovalentní komplex obsahující polypeptidovou sekvenci celé extracelulární oblasti IFNAR, přednostňuje se IFNAR2 nebo jeho libovolná subfrakce vázající interferon, která tvoří komplex s IFN α nebo IFN β nebo s IFN ω , nebo její libovolnou biologicky aktivní subfrakci.

IFNAR zahrnuje libovolné známé extracelulární receptory IFNAR, jak jsou definovány shora v textu, stejně jako jejich libovolné aktivní fragmenty. IFNAR může tvořit fúzi s jiným proteinem například s imunoglobulinem, jako je IgG. Termín IFN, IFN α , IFN β a IFN ω tvoří jeden z více než 20 typů

interferonů typu I, které se do dnešního dne stanovily, nebo libovolný jiný interferon typu I, který se identifikuje v budoucnu.

V jednom provedení vynálezu komplex obsahuje IFN α nebo IFN β kovalentně spojený s IFNAR2 prostřednictvím chemické vazby.

Další provedení vynálezu obsahuje komplex složený z IFN α nebo IFN β , které tvoří nekovalentní komplex s IFNAR2. Další provedení vynálezu zahrnuje kompozici obsahující IFN typ I a IFNAR2 v libovolném poměru. Formulace IFN typu I s nadbytkem IFNAR2 definované shora v textu jsou také zahrnuty v definici termín „komplex“ podle vynálezu. Dva komponenty se mohou také aplikovat odděleně, přičemž mohou vytvořit komplex *in vivo*. V dalším provedení vynálezu komplex je směs IFNAR2 a IFN získaný současnou a následnou společnou aplikací IFN α nebo IFN β a rozpustného IFNAR2. IFNAR je dále možno aplikovat, aniž dochází ke společné aplikaci IFN tak, že se může tvořit komplex *in vivo* s endogenní cirkulací IFN, přičemž se zesilují účinky endogenního IFN.

V určitém provedení vynálezu komplex zahrnuje IFN α nebo IFN β nebo IFN ω , fúzované s IFNAR2, jako rekombinantní fúzní protein, kde části IFN a IFNAR2 se fúzují prostřednictvím molekuly flexibilního peptidového linkeru. Tento peptidový linker je štěpitelný nebo není štěpitelný *in vivo*.

Vynález dále popisuje DNA kódující takové fúzní proteiny, vektory obsahující takovou DNA, hostitelské buňky transformované takovými vektory uvedeným způsobem, aby se exprimovaly fúzní proteiny. Dále vynález popisuje metody produkce takových fúzních proteinů, kultivaci uvedených hostitelských buněk a izolaci fúzních proteinů, které exprimují.

Dále vynález popisuje metody použití komplexů podle vynálezu za účelem prodloužení účinku IFN *in vivo*, které je

možné použít při léčbě libovolného onemocnění nebo podmínek, které jsou léčitelné aplikací IFN.

Dále vynález popisuje použití IFNAR jako stabilizátoru ve formulacích IFN. Volný IFN β má tendenci tvořit oligoméry. Tomu se předchází tvorbou komplexu s IFNAR, zvláště s IFNAR2. Formulace rekombinantního IFN β musí vykazovat kyselé pH, které může způsobit podráždění při aplikaci. Jestliže se použije IFNAR jako stabilizátor, je možné vytvořit kompozice, které nejsou kyselé.

Vynález popisuje komplex IFNAR/IFN a technologii nutnou k produkci tohoto komplexu. Na základě výsledků se IFN β vybral jako příklad s nejmenším omezením.

Fúzní protein.

C-konec IFNAR2 nebo jeho libovolná sekvence vázající interferon se fúzovala s N-koncem IFN β nebo s jeho biologicky aktivními fragmenty, jak je nutné k překlenutí nejkratší vzdálenosti mezi dvěma molekulami. Mohou se také připravit reverzní konstrukce, kde C-konec IFN β nebo jeho fragmenty se fúzují s N-koncem IFNAR2 nebo s jejich sekvencemi.

Z modelů molekul komplexu IFNAR2/IFN β se odhadla vzdálenost mezi upoutanou C-terminální extracelulární oblastí IFNAR2 a N-terminální oblastí IFN β v aktivním modelu komplexu, která se rovná přibližně 80 angstromů. Za účelem navrhnout komplex IFNAR2/IFN β , který umožňuje udržovat aktivní komplex, se může použít například repetice flexibilního peptidového linkeru Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (GGGGS) (SEQ ID NO: 1). V jiném případě linker může být flexibilní a může tvořit cíl pro proteolytické štěpení sérem, membránové vazby a/nebo buněčných proteáz. Příklad místa štěpení sérové proteázy připravené komplexní fúze IFNAR2/IFN β může být místo štěpení faktoru Xa. Faktor Xa štěpí protrombin ve dvou polohách Arg273 a Arg322 a

30.05.00

vykazuje rozeznávaný tetrapetidový signál Ile-Glu-Glu-Arg (SEQ ID NO: 2) (Nagai et al., Nature 309: 810 (1984)). Samotný faktor Xa se vytvořil v intrinsické a extrinsické dráze různými aktivátory, které zahrnují tkáňový faktor, které uvolňují vaskulární endoteliální buňky, makrofágy a neutrofile.

Faktor Xa může působit na fúzní protein IFNAR2/IFN obsahující rozeznávanou sekvenci faktoru Xa v linkerové oblasti a uvolňuje komplex IFNAR2/IFN tak, že komplex může fungovat jako nekovalentní komplex.

V jiném případě komplexní fúze IFNAR2/IFN β může vykazovat místo štěpení vhodné pro proteázu buněčné membrány (například hepsin). Hepsin je serinový proteázový zymogen vázaný na membráně o molekulové hmotnosti 51 000, který se silně exprimuje ve tkáni jater, ale také se nachází v ledvinách, pankreasu, plicích, štítné žláze, v podvěsku mozkovém a ve varlatech. Jedna sekvence, která je známa, že ji štěpí hepsin je peptid Arg152-Ile153 vázaný na faktoru VII. Hepsin se podílí na tvorbě trombinu v nádorových buňkách (Kazam et al., J. Biol. Chem. 270: 1 (1995)).

Hepsin může působit na fúzní protein sIFNAR2/IFN obsahující rozeznávanou sekvenci hepsinu v oblasti linkeru a uvolňuje komplex sIFNAR2/IFN tak, že komplex může fungovat nekovalentním způsobem.

V jiném případě fúzní komplex sIFNAR2/IFN může obsahovat místo štěpení vnitrobuněčnou proteázou. Nekrotizující a odumírající buňky uvolňují různé proteázy. Jsou to kaspázy (proteázy podobné enzymu přeměňujícímu interleukin 1-beta), metalo-proteinázy, lysosomální proteázy (například katepsin B) a elastázu. Elastázu uvolňují granulocyty během stádia onemocnění (například během sepsí) a vykazují širokou specifitu, co se týče aminokyselinové štěpící sekvence. Jsou příbuzné trypsinu (popisuje se v publikacích Ertel et al.,

30.08.00

Arch. Surg. 129: 1 (1994), Szilagyi et al., Biochim. Biophys. Acta 1251: 1 (1995)).

Intracelulární proteázy mohou působit na fúzní protein sIFNAR2/IFN obsahující rozeznávanou sekvenci intracelulární proteázy v oblasti linkeru a uvolňují komplex sIFNAR2/IFN tak, že komplex může fungovat jako nekovalentní komplex.

Ve skutečnosti se připravilo několik příkladů konstrukcí fúzních proteinů, ve kterých C-konec sIFNAR2 (P40-ESEFS) je spojen s N-koncem IFN β (MSY) prostřednictvím flexibilního linkeru. Příklady peptidových linkerů jsou následující: ESEFS(GGGGS)_nMSY, kde n=5 (SEQ ID NO: 3), 4 (SEQ ID NO: 4), 3 (SEQ ID NO: 5), 2 (SEQ ID NO: 6) nebo (SEQ ID NO: 7), ESEFS(hCG-CTP)MSY, kde hCG-CTP = SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 8), ESEFS(EFM)_nMSY, kde n=5 (SEQ ID NO: 9), 4 (SEQ ID NO: 10) nebo 3 (SEQ ID NO: 11), ESEFS(EFGAGLVLGQFM)_nMSY, kde n=1 (SEQ ID NO: 12) nebo 2 (SEQ ID NO: 13) a libovolný jiný vhodný linker, který překrývá vzdálenost mezi vazebným místem sIFNAR2 a IFN β v komplexním modelu a který netvoří imunogenní epitop mezi částmi interferonu a receptoru. Upřednostňuje se, aby tyto linkery tvořilo až 30 aminokyselin.

Kovalentní komplex

Jeden příklad tvoření chemických zesíťovaných molekul je místně specifická modifikace IFNAR2 reakcí biodegradovatelného linkeru, jako je polyetylen glykol (PEG), s přítomnými cysteiny nebo zavedenými do molekuly IFNAR2 za použití substituce aminokyselin, jako je Ser210 až Cys nebo Asn89 až Cys (místně řízená mutageneze). Následující konstrukce se mohou navrhnout takto: IFNAR(S210C)-PEG_n-IFN β (Cys17), kde n=2 000, 5 000 nebo 10 000, nebo IFNAR(N89C)-PEG_n-IFN β (Cys17).

Tvorba kovalentních disulfidových vazeb mezi Cys dvou různých částí je také obsahem vynálezu.

Nekovalentní komplex

Lidský IFNAR2 tvoří komplex s IFN β za podmínek, které maximalizují tvorbu aktivního komplexu. Aby vznikl maximálně aktivní komplex je nutné dosáhnout *in vitro* optimální poměr 2,5 ng IFNAR2 ku 1 mezinárodní jednotka (IU) IFN β , jak se popisuje v příkladech. V současné době se stanovil optimální poměr IFNAR2 ku IFN β , při kterém dochází k maximální tvorbě aktivního komplexu aktivity *in vivo*, ačkoli se jeví, že optimální poměr závisí na koncentraci IFN β . Tak například optimální poměr IFNAR2: IFN β za účelem zvýšení proti-nádorové aktivity IFN β v koncentraci 2×10^4 IU/myš/den je 2,5 ng IFNAR2 na pg IFN β , zatímco při koncentraci 5×10^4 IU/myš/den IFN β je optimum 0,3 ng IFNAR2 na pg IFN β . Stejný poměr se používá při dosažení maximální tvorby aktivního komplexu *in vitro*, což vede k prodloužení farmakokinetiky IFN *in vivo*.

Přednostně se pro přípravu komplexu používají rekombinantní molekuly IFNAR2 a IFN β . V anti-virových testech *in vitro* komplex interferon/receptor vykazoval ve srovnání s aktivitou samotného IFN β zvýšenou aktivitu. Konstantní koncentrace IFN β se smísila s různými koncentracemi rekombinantního sIFNAR2 a tato směs se (komplex IFNAR2/IFN) přidala k buňkám WISH (lidské amniotické buňky). Tyto buňky WISH se pak infikovaly virem vesikulární stomatitidy (VSV) a monitorovala se antivirová aktivita IFN, jako množství přeživších buněk po dobu inkubace 48 hodin. V každém experimentu přidání IFNAR2 ke konstantnímu množství IFN β vedlo ke zvýšení množství buněk, které přežily infekci VSV při optimálním poměru IFNAR2 ku IFN, v závislosti na velikosti dávky. Tyto výsledky prokázaly, že komplex IFNAR2 a IFN β vykazuje zvýšenou aktivitu ve srovnání s volným IFN β v antivirovém testu. Praktické implikace této skutečnosti je, že komplex IFNAR2/IFN β má vyšší účinnost a zvýšenou aktivitu ve srovnání s volným IFN v případě různých terapeutických

30.08.17

indikací, při kterých je aktivní samotný IFN. Tyto indikace zahrnují ty, při kterých volný IFN vykazuje terapeutickou aktivitu, jako je anti-virová, proti-rakovinová a imunní modulační aktivita. Očekává se, že komplex IFNAR2/IFN, díky vyšší účinnosti zvyšuje aktivitu a/nebo zlepšuje farmakokinetiku (to je poločas rozpadu), bude účinnější při léčbě virových, onkogenních a imunitních poruch.

V případě, že dochází k aplikaci *in vivo* interferonový receptorový komplex zvyšuje biodostupnost, farmakokinetiku a/nebo farmakodynamiku IFN, čímž zesiluje antivirové, proti-rakovinové a imunitní modulační vlastnosti IFN.

Zvýšené biodostupnosti IFN zprostředkované komplexem je možné dosáhnout buď tvorbou nekovalentního komplexu IFN/IFNAR, společnou aplikací volného IFN s IFNAR, prostřednictvím postupné aplikace komponentů IFN a IFNAR, prostřednictvím aplikace kovalentního komplexu IFN/IFNAR nebo aplikací fúzního proteinu IFNAR/IFN.

V dalším provedení vynálezu se může zvýšení biodostupnosti také dosáhnout aplikací samotného komponentu IFNAR, aniž se přidá IFN. IFNAR bude tvořit „komplex“ *in vivo* s endogenním IFN a tak zvýší biodostupnost, farmakokinetiku a/nebo farmakodynamiku endogenního IFN. To je zvláště užitečné při léčbě pacientů, kteří trpí nemocí nebo stavem, který přirozeně způsobuje indukci přirozeného IFN tak, že IFN bude cirkulovat a přirozeně působit proti onemocnění a poruše. Přidaný IFNAR bude zesilovat účinky přirozeného IFN.

Preferované molekuly vhodné pro použití v komplexech podle vynálezu vykazují sekvenci přirozeného IFN a IFNAR. Přirozená sekvence je ta, kterou obsahuje přirozeně se vyskytující lidský IFN a IFNAR. Takové sekvence jsou známy a jsou popsány v literatuře. Také se uvažuje, že přirozeně se vyskytující alelové variace jsou přirozené sekvence.

Vynález také popisuje analogy shora popsaného komplexu IFNAR2/IFN podle vynálezu, které se uchovávají podstatně

stejnou biologickou aktivitu komplexu, který má v podstatě sekvence přirozeného IFNAR2 a IFN. Takovými analogy mohou být ty, které obsahují delecii, adici a substituci až přibližně 30 aminokyselinových zbytků v částech IFNAR a/nebo IFN komplexu tak, že modifikace tohoto druhu v podstatě nemění biologickou aktivitu analogu chimérového proteinu s ohledem na samotný komplex. Různé analogy se mohou vzájemně a od molekul základního komplexu lišit (v podstatě pouze přirozeně se vyskytujícími sekvencemi IFNAR2 a IFN) v místě linkerového peptidu, který spojuje obě části za vzniku komplexu. Jak se uvádí shora v textu Takový linker tvoří až přibližně 30 aminokyselin a slouží k oddělení částí IFNAR2 a IFN v komplexu. Co se týče takového linkeru, je nutné dbát na výběr jeho sekvence (a také je nutné každý takový analog biologicky testovat vhodnými standardními testy), aby například nedošlo k nesprávnému svinutí komplexu, což může způsobit deaktivaci nebo nedojde ke zvýšení aktivity nebo činní analog komplexu imunogenní, což vede u léčeného pacienta k vyvolání protilátek proti analogu. Takový analog je pak neúčinný alespoň jako medikament se střední nebo dlouhou dobou působení. Co se týče shora popsaných analogů komplexu podle vynálezu, tyto analogy jsou ty, kde jeden nebo více a až přibližně 30 aminokyselinových zbytků základního komplexu podle vynálezu jsou nahrazeny různými aminokyselinovými zbytky nebo jsou deletovány nebo se přidá jeden nebo více až přibližně 30 aminokyselinových zbytků k původní sekvenci komplexu podle vynálezu aniž dojde k podstatné změně aktivity výsledného produktu ve srovnání se základním komplexem podle vynálezu. Tyto analogy se připravují známou syntézou a/nebo místně řízenou mutagenezí nebo libovolným jiným způsobem, který je pro tento účel vhodný.

Libovolný takový analog vykazuje přednostně aminokyselinovou sekvenci, která je v podstatě duplikátem sekvence základního komplexu IFNAR2/IFN, který má v podstatě

stejnou aktivitu. Základními experimenty je možné stanovit, zda libovolný analog vykazuje podstatně stejnou aktivitu a/nebo schopnost jako základní komplex podle vynálezu. Takové experimenty zahrnují vystavení analogu testování biologické aktivity a stabilit, jak se uvádí dále v příkladech 2 až 7.

Analogy komplexu, které se mohou použít v souladu s vynálezem nebo nukleové sekvence, které je kódují, zahrnují konečnou sadu v podstatě odpovídajících sekvencí, jako substituce peptidů nebo polynukleotidů, které odborník může získat rutinním způsobem, aniž proběhnou experimenty. Chemie a struktura proteinů se popisuje v publikacích Schilz et al., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York (1978) a Creighton, T. E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman and Co., San Francisco (1983). Substituce přítomné nukleotidové sekvence se popisuje v publikaci Ausubel et al., *Current Protocols in molecular biology*, Greene Publications and Wiley Interscience (New York, 1987-1992), paragraf A.1. I-A. 1-24 a Sambrook et al., *Molecular Cloning : A Laboratory manual*, 2 nd Ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY, 1989, paragraf 6.3 a 6.4 v apendix C a D.))

Preferované změny v případě analogů v souladu s vynálezem jsou ty, které jsou známy jako konzervativní substituce. Konzervativní aminokyselinové substituce v komplexu, který vykazuje v podstatě přirozeně se vyskytující sekvence IFNAR2 a IFN, mohou zahrnovat synonymní aminokyseliny ve skupině, která má podstatně podobné fyzikálně chemické vlastnosti tak, že substituce mezi členy skupiny bude udržovat biologickou funkci molekuly (Grantham, *Science* 185: X62-X64 (1974)). Je zřejmé, že začlenění a delece aminokyselin se mohou také provést ve shora uvedených sekvencích, aniž se změní jejich funkce, zvláště, když inserce nebo delece zahrnuje pouze několik aminokyselin, například méně než 30. Upřednostňuje se méně než 10 aminokyselin a neodstraňují se nebo se nenahrazují

30.08.00

aminokyseliny, které jsou kritické při funkčním uspořádání. Jsou to například cysteinové zbytky (Anfinsen, „Principles That Govern The Folding of Protein Chains,” Science 181: 223-230 (1973)). Analogy, které vznikají na základě takových delecí a/nebo inzercí jsou v souladu s vynálezem.

Synonymní aminokyselinové skupiny jsou ty, které se definují v tabulce č. I. S výhodou synonymní aminokyselinové skupiny jsou ty definované v tabulce č. II a nejvýhodnější jsou synonymní aminokyselinové skupiny definované v tabulce č. III.

Tabulka č. I

Preferované skupiny synonymních aminokyselin

Aminokyselina	Synonymní skupina
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Tabulka č. II

Výhodnější skupiny synonymních aminokyselin

Aminokyselina	Synonymní skupina
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

Tabulka č. III

Nejvýhodnější skupiny synonymních aminokyselin

Aminokyselina	Synonymní skupina
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Glu
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Příklady produkce substitucí aminokyselin v proteinech, které se mohou použít při získání analogů komplexu IFNAR2/IFN vhodných pro použití podle vynálezu zahrnují libovolnou známou metodu, jako se popisuje v patentech US RE 33,653; 4,959,314; 4,588,585 a 4,737,462 (Mark et al.,); 5,116,943 (Koths et al.,); 4,965,195 (Namen et al.,) a 5,017,691 (Lee et al.,) a lyzinem substituované proteiny popsané v dokumentu US patent 4,904,584 (Shaw et al.,).

V jiném preferovaném provedení vynálezu libovolný analog komplexu vhodný pro použití podle vynálezu má aminokyselinovou sekvenci, která v podstatě odpovídá sekvenci shora popsaného komplexu podle vynálezu. Termín „v podstatě odpovídá“ analogům s minoritními změnami sekvence základního komplexu, který neovlivňuje jeho základní charakteristiky, zvláště jeho schopnost inhibovat proliferaci buněk zhoubného bujení nebo podporu transplantací kostní dřeně. Typ změn, které se v obecném případě zvažují, že spadají do skupiny „v podstatě odpovídající“ jsou ty, které jsou výsledkem běžných metod mutageneze DNA kódující komplex podle vynálezu vedoucí k několika minoritním modifikacím, a testování několika minoritních modifikací a testování požadované aktivity způsobem, který se popisuje shora v textu.

Část IFNAR2 komplexu bude mít jadernou sekvenci, která je stejná jako přirozená sekvence nebo její biologicky aktivní fragment nebo jeho varianta, která má aminokyselinovou sekvenci s alespoň 70 % shodou s přirozenou aminokyselinovou sekvencí a zachovává si svou biologickou aktivitu. Je výhodné, aby taková sekvence vykazovala alespoň 85 % shodu, alespoň 90 % shodu. Nejvýhodnější je, aby sekvence vykazovala alespoň 95 % shodu s přirozenou sekvencí.

S ohledem na část komplexu IFN jaderná sekvence, která se může použít, je přirozenou sekvencí nebo jejím biologicky aktivním fragmentem nebo jeho variantou, přičemž aminokyselinová sekvence vykazuje s ní alespoň 70 % shodu,

upřednostňuje se alespoň 85 % nebo alespoň 90 % shodu a nejvíce se upřednostňuje alespoň 95 % shodu. Takové analogy si ponechávají biologickou aktivitu přirozené sekvence IFN nebo jeho fragmentu nebo vykazují antagonistickou aktivitu, jak se diskutuje dále v textu.

Termín „shoda sekvence“ znamená, že se sekvence porovnávají dále popsáním způsobem. Sekvence jsou uspořádány za použití Genetic Computing Group's GAP verze 9 za použití implicitní (BLOSUM62) matrice (hodnoty -4 až +11) s hodnotou „gap open penalty“ -12 (pro první nulu gapů) a hodnotou „gap extension penalty“ -4 (pro každou další konzekutivní nulu v gapu). Po uspořádání se vypočítá procento identity tím, že se vyjádří číslo správného párování jaké procento počtu aminokyselin v nárokové sekvenci.

Analogy podle vynálezu se mohou také stanovit následujícím postupem. S ohledem na část IFNAR komplexu nebo část IFN DNA přirozené sekvence je známa v oboru a popisuje se v literatuře. Polypeptidy kódované libovolnou nukleovou kyselinou, jako je DNA nebo RNA, které hybridizují s komplementem nativní DNA nebo RNA za vysoce nebo středně stringentních podmínek, pokud si polypeptid uchovává biologickou aktivitu přirozené sekvence nebo v případě IFN si uchovává biologickou aktivitu nebo vykazuje antagonistickou aktivitu, se považují za obsah vynálezu.

Stringentní podmínky jsou funkcí teploty, při které dochází k hybridizaci, molarity monovalentních kationtů a procenta formamidu, který je obsažen v hybridizačním roztoku. Aby se stanovil stupeň přísnosti podmínek v dané sadě podmínek, nejdříve se použije rovnice popsána v publikaci Meinkoth et al., Anal. Biochem. 138: 267-284 (1984) vhodná pro stanovení stability hybridů 100 % identity vyjádřené jako poloviční teplota denaturace T_m hybridu DNA-DNA:

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form.}) - 500/L,$$

kde M je molarita monovalentních kationtů, %GC je

procento G a C nukleotidů v DNA, % form. je procento formamidu v hybridizačním roztoku a L je délka hybridu v párech bází. Pro každý jeden stupeň, o který se sníží teplota T_m oproti vypočítané hodnotě hybridu se 100 % identitou, množství nesprávných párů umožňuje její zvýšení o 1 %. Tak T_m užívaná pro libovolný daný hybridizační experiment při specifikovaných koncentracích solí a formamidu je 10°C pod hodnotou T_m vypočtenou pro 100 % hybrid podle Meinkothotovy rovnice. K hybridizaci dojde dokonce tehdy, jestli existuje až přibližně 10 % chybného párování.

Termín „vysoce přísné podmínky“ znamenají ty podmínky, při kterých se toleruje až přibližně 15 % sekvenční divergence. Termín „středně přísné podmínky“ znamená ty podmínky, při kterých se toleruje až přibližně 20 % sekvenční divergence. Příklady vysoce přísných podmínek (12 až 15°C pod vypočtenou T_m hybridu) a středně přísných podmínek (15 až 20°C pod vypočtenou T_m hybridu) používají promývací roztok 2x SSC (standardní solný iontový citrát) a 0,5 % SDS při vhodné teplotě pod vypočtenou hodnotu T_m hybridu. Omezená přísnost podmínek je primárně způsobena podmínkami promývání, zvláště jestliže se užívají ty podmínky hybridizace, které umožňují méně stabilní hybridy, které se tvoří spolu se stabilními hybridy. Podmínky promývání při vysoké přísnosti pak méně stabilní hybridy odstraní. Běžné hybridizační podmínky, které se používají s vysoce přísnými až středně přísnými podmínkami promývání, jak se popisuje shora v textu, je hybridizace v roztoku 6 x SSC (nebo 6 x SSPE), 5 x Denhardtovo činidlo, 0,5 % SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ denaturované fragmentované DNA spermatu lososa při teplotě přibližně 20 až 25°C pod T_m . Jestliže se použije směs sond, je výhodné použít místo SSC tetrametylamoniumchlorid (TMAC) (Ausubel et al., Current Protocols in molecular biology, Greene Publications and Wiley Interscience (New York, 1987-1992), paragraf A.1. I-A. 1-24).

Termín „funkční deriváty“ znamená deriváty, které se mohou připravit z funkčních skupin, které se vyskytují jako vedlejší řetězce zbytků nebo N- nebo C-terminální skupiny, způsobem známým v oboru a jsou předmětem vynálezu pokud zůstávají farmaceuticky přijatelné. To znamená, že neporuší biologickou aktivitu odpovídajícího proteinu komplexu, jak se popisuje shora v textu, a neudělají toxické vlastnosti kompozicím, které je obsahují nebo komplexům, které se z nich připravují. Deriváty mohou mít chemické části, jako jsou zbytky sacharidů nebo fosforečnanů. Takové frakce mají stejnou biologickou aktivitu a zůstávají farmaceuticky přijatelné.

Deriváty například mohou zahrnovat alifatické estery karboxylu karboxylových skupin, amidy karboxylových skupin reakcí s amoniakem nebo s primárními nebo sekundárními aminy, N-acylderiváty nebo volné aminoskupiny aminokyselinových zbytků karbocyklické aroylové skupiny) nebo O-acylderiváty volné hydroxylové skupiny vytvořených s acylovými částmi (například alkanoylové nebo karbocyklické aroylové skupiny) nebo O-acylderiváty volné hydroxylové skupiny (například hydroxylové skupiny serylových a threonylových zbytků) vytvořených s acylovými částmi. Takové deriváty mohou také zahrnovat například postranní řetězce polyetylenglykolu, které mohou maskovat antigenní místa a rozšířit výskyt komplexu nebo jeho části v tělních tekutinách.

Termín „deriváty“ zahrnuje pouze ty deriváty, které nezaměňují jednu aminokyselinu za jinou ze dvaceti běžně se vyskytujících přirozených aminokyselin.

Termín „sole“ znamená sole karboxylových skupin a kyselé adiční sole aminoskupin komplexu podle vynálezu nebo jeho analogů. Sole karboxylové skupiny se mohou tvořit způsobem, který je dobře znám v boru a zahrnují anorganické sole, například sodné, vápenaté, amonné, železité nebo zinečnaté sole a podobně a sole s organickými bázemi, jako se například tvoří s aminy, jako je trietanolamin, arginin nebo lyzin,

piperidin, prokain a podobně. Kyselé adiční sole zahrnují například sole minerálních kyselin, jako je například kyselina chlorovodíková nebo kyselina sírová a sole organických kyselin, jako je například kyselina octová nebo kyselina šťavelová. Samozřejmě libovolné takové sole musí mít podstatně stejnou biologickou aktivitu s komplexem podle vynálezu nebo s jeho analogy.

Termín „biologická aktivita“ znamená následující: V případě části IFNAR2 komplexu je důležitá biologická aktivita jeho schopnost vázat interferon typu I. Tak analogy nebo varianty, sole a funkční deriváty se musí vybrat tak, aby si uchovaly schopnost vázat interferon. To je možné testovat rutinními vazebnými testy. Navíc fragmenty IFNAR2 nebo jeho analogy se mohou také použít pokud si uchovávají svou vazebnou aktivitu vůči interferonu. Fragmenty se mohou snadno připravit odstraněním aminokyselin z libovolného konce polypeptidu vázajícího interferon a testují se výsledné vlastnosti navázání interferonu. Jsou známy proteázy odstraňující aminokyselinu z N- nebo C-konce polypeptidu a tak stanovení fragmentů, které se ponechávají schopnost vázat interferon, zahrnují pouze rutinní experimenty.

Navíc polypeptid, který vykazuje takovou vazebnou aktivitu vůči interferonu, kterým je IFNAR2, sIFNAR2, analog nebo varianta, sůl, funkční derivát nebo jeho fragment, může také obsahovat další aminokyselinové zbytky lemující polypeptid vázající interferon. Pokud si výsledná molekula udržuje schopnost vázat interferon jaderného polypeptidu, je možné stanovit za použití rutinních experimentů, zda libovolné takové lemující zbytky ovlivňují základní a nové charakteristiky jaderného peptidu. To znamená jeho charakteristiky navázání interferonu. Termín „v podstatě obsahující“ týkající se specifikované sekvence znamená, že mohou být přítomny další lemující zbytky, které neovlivňují základní nebo novou charakteristiku specifikované sekvence.

Tento termín nezahrnuje substituce, delece nebo adice ve specifikované sekvenci.

Zatímco se v uvedeném popisu a v příkladech provedení vynálezu používá IFNAR2 nebo sIFNAR2, je nutné rozumět, že jde o preferovaný příklad a že podjednotka IFNAR1 a zvláště její extracelulární oblast se může nahradit kdykoli IFNAR2. IFNAR1 se může použít pouze ve spojení s interferony, na které se váže. Je známo, že IFNAR1 se váže na IFN α . Libovolný komplex za použití IFNAR1 musí být tvořen druhý interferonu a upřednostňují se druhy IFN α , na které se IFNAR1 váže.

S ohledem na část interferonu komplexu podle vynálezu biologická aktivita, kterou si musí zachovat libovolný analog nebo varianta, sůl, funkční derivát nebo fragment je aktivita interferonu, na které záleží využitelnost. V mnoha příkladech to je schopnost vázat se na přirozený receptor na povrchu buněk a tím zprostředkovat produkci signálu receptorem. Libovolný takový analog, derivát nebo fragment by si mohl zachovat takovou receptorovou agonistickou aktivitu, aby se mohl použít podle vynálezu. Na druhou stranu je někdy výhodné, když existuje molekula s antagonistickou aktivitou vůči receptoru tak, že brání biologické aktivitě přirozeného interferonu. Takový antagonist se může také použít, kde je třeba prodloužit pozitivní účinek způsoby podle vynálezu. V případě takového použití, kde je nutno eliminovat nežádoucí účinek interferonu, analogů, které se vážou na receptor a části IFNAR komplexu, ale který nezprostředkovává signál a blokační signál přirozeným interferonem na uvedený receptor, se může také považovat, že je biologicky aktivní pro účely podle vynálezu. Přímé testy mohou stanovit, zda takový libovolný analog si uchovává takovou receptorovou agonistickou aktivitu nebo zda vykazuje receptorovou agonistickou aktivitu a bude proto použitelný podle vynálezu.

Vynález dále popisuje sekvence DNA kódující shora uvedený komplex podle vynálezu a jeho analogy, stejně jako vektory DNA

nesoucí takové sekvence DNA vhodné pro expresi ve vhodných eukaryontních nebo prokaryontních hostitelských buňkách. Schopnost vytvořit velké množství heterologních proteinů za použití rekombinantního systému exprimujícího protein vedlo k vývoji různých terapeutických činidel, například t-PA a EPO (Edington, S. M., „Biotech Products as Drug Leads,” *BioTechnology* 13: 649 (1995)). Různí expresivní hostitelé, ze kterých je možné vytvořit rekombinantní proteiny jsou původně prokaryonta (například bakterie) (Olins, P.O., „Recent Advances in Heterologous Gene Expression in *Escherichia coli*,” *Current Opinion in Biotechnology* 4: 520-525 (1993)), nižší eukaryonty (například kvasinky) (Ratner, M., „Protein Expressio in Yeast,” *Bio/Technology* 7: 1129-1133 (1989)) a vyšší eukaryonty (například hmyzí a savčí buňky) (Reuveny, S., „Production od Recombinant Proteins in High Density Insect Cell Cultures, „” *Biotechnology and Bioengineering* 42: 235-239 (1993), Reff, M. „High-level Production of Recombinant Immunoglobulins in mammalian Cells,” *Current Opinion in Biotechnology* 4: 573-576 (1993)). Všechny tyto systémy spočívají na stejném principu. To znamená zavedení sekvence DNA proteinu do buňky zvoleného typu (dočasně nebo stabilně, integruje se do chromozomu nebo zůstane jako epizomální element) za použití transkripce hostitele, translace a mechanismu transportu, přičemž cílem je nadměrná exprese zavedené sekvence DNA ve formě heterologního proteinu (popisuje se v publikaci Keown, W. A., „Metjods for Introducing DNA into Mammalian Cells,” *Methods in Enzymology* 185: 527-537 (1990)).

Vedle exprese nativních genových sekvencí schopnost manipulovat DNA na úrovni nukleotidů se očekával vývoj nových sekvencí, které, ačkoli se zakládají na přirozených proteinech, vykazují nové aktivity jako výsledek změny v primární proteinové struktuře (Grazia Cusi, M., „Harlequin Granulocyte-colony Stimulating Factor Interleukin 6 Molecules

with Bifunctional and Antagonistic Activities," Immunotechnology 3: 61-69 (1997)).

Vybrané sekvence DNA se mohou fyzicky spojit za vzniku transkriptů, ze kterých se vyvinou nové fúzní proteiny, kde jednou nezávislé proteiny se nyní exprimují jako jedna polypeptidová jednotka (Ibanez, C.F., „Chimeric Molecules with Multiple Neurotrophic Activities Reveal Structural Elements Determining the Specificities of NGF and BDNF, „ EMBO Journal 10: 2105-2110 (1991)). Aktivita takových fúzních proteinů se může lišit. Fúzní proteiny mohou být například účinnější než jednotlivé proteiny (Curtis, B. M., „Enhanced Hematopoietic Activity of a Human Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor-Interleukin 3 Fusion Protein," Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 5809-5813 (1991)).

Lidský IFN β se odvodil z procesu produkce, který se používá v případě savčí buňky vaječníků čínských křečků (CHO). Interferony typu 1 se mohou exprimovat v různých hostitelských buňkách, které zahrnují bakterie (Utsumi, J., „Characterization of E. coli-derived Recombinant Human Interferon-beta as Compared with Fibroblast Human Interferon-beta," Journal of Biochemistry 101: 1199-1208 (1987), hmyz (Smith, G. E., „Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector," Molecular and Cellular Biology 3: 2156-2165 (1983)) a člověk (Christofinis, G. J., „Interferon Production by Human Lymphoblastoid Cell Lines of Different Origins," Journal of General Virology 52: 169-171 (1981)). Lidský sIFNAR2 se také exprimuje za použití hostitelské buňky CHO. V jiném případě rozpustné receptory, jako je sIFNAR2, se mohou také úspěšně exprimovat v bakteriálním expresivním systému (Terlizze, M., „In vitro comparison of inhibiting ability of soluble TNF receptor p75 (TBPII) vs. Soluble TNF receptor p55 (TBPI) against TNF- α a TNF- β ," Journal of Interferon and Cytokine Research 16: 1047-1053 (1996)). DNA pro každá gen se zavedla

do genomu buňky CHO za použití postupu transfekce. Výsledkem je rekombinace a integrace expresivního vektoru. Pak se izolovaly a kultivovaly buňky, které exprimují uvedený protein. Protein se izoloval a čistil za použití standardních průmyslových metod, které jsou dobře známy v oboru.

Vynález také zahrnuje farmaceutickou kompozici obsahující jako aktivní látku komplex IFNAR2/IFN nebo jeho analog nebo jeho směs nebo jeho sole a farmaceuticky přijatelný nosič, ředidlo nebo excipient. Provedení farmaceutické kompozice podle vynálezu zahrnuje farmaceutickou kompozici vhodnou pro zvýšení účinnosti IFN při léčbě virového onemocnění, při léčbě zhoubného bujení, při imuno modulační terapii a jiných aplikacích interferonů a cytokinů.

Farmaceutické kompozice podle vynálezu se připravují aplikací směsi komplexu nebo jeho analogů s fyziologicky přijatelnými nosiči a/nebo stabilizátory a/nebo excipienty. Připravují se v dávkové formě, jako například lyofilizací do ampulí. Způsob aplikace se provádí v libovolném přijatelném módu, jak se aplikují podobná činidla a bude záviset na podmínkách, které je nutné léčit. Aplikace probíhá například intravenózně, intramuskulárně, podkožně, místní injekcí nebo povrchovou aplikací nebo bez přerušování infúzí atd.. Množství aktivní látky, které je možné aplikovat, závisí na způsobu aplikace, léčení onemocnění a stavu pacienta. K lokální injekci například postačí menší množství proteinu vzhledem k tělesné hmotnosti ve srovnání s intravenózní infúzí.

Volný IFN β má tendence oligomerizovat. Aby se potlačila tato tendence, dnes vytvořené formulace IFN β mají kyselé pH, které může zavinit při aplikaci místní podráždění. V případě, že IFNAR slouží jako stabilizační faktor IFN β , čímž brání oligomerizaci, jeho použití při tvorbě IFN β může sloužit ke stabilizaci IFN β a při tom je možné obejít nezbytnost kyselosti formulací. Farmaceutická formulace, která není kyselá a

obsahuje IFN β a IFNAR a spolu s jinými běžnými farmaceuticky přijatelnými excipienty tvoří součást vynálezu.

Vynález zahrnuje použití komplexu podle vynálezu nebo jeho analogy nebo směsi vhodné pro terapii virových onemocnění, terapii zhoubného bujení a imuno modulační terapii. Komplexy interferonový receptor-interferon podle vynálezu se mohou použít při anti-virové terapii, při takových terapeutických indikacích, jako je chronické granulomatózní onemocnění, špičatý kondylom, juvenilní papilomatóza hrtanu, hepatitida A a chronická infekce viry hepatitidy B a C.

Komplexy interferonový receptor-interferon podle vynálezu se mohou použít při terapii zhoubného bujení při takových terapeutických indikacích, jako je leukémie buněk ochlupení, Kaposiho syndrom, mnohotný myelom, chronická myelogenní leukémie, lymfom a melanom, který je jiný než Hodkinsův.

Komplexy interferonový receptor-interferon podle vynálezu je také možné použít při imunitní modulační terapii, jako je roztroušená skleróza, revmatická artritida, myastenie gravis, diabetes, AIDS, lupénka atd..

Vynález také zahrnuje komplex nebo jeho analogy nebo jeho směsi vhodné pro použití při přípravě medikamentů vhodných pro léčbu shora popsaných onemocnění nebo pro použití ve shora uvedených indikacích.

Přehled obrázků na výkrese

Na obrázku č. 1 je graf znázorňující anti-virovou aktivitu sIFNAR2 nebo IFNAR2Ig (obsahuje extracelulární doménu hIFNAR2 fúзованou s zámek lidského IgG1, oblastmi CH2 a CH3) v přítomnosti IFN β .

Obrázek č. 2 je graf znázorňující antivirovou aktivitu sIFNAR2 a IFN β při sub-optimální dávce IFN β . Současně působící antivirová aktivita IFN β a sIFNAR2 následující po jednorodinové pre-inkubaci se uvolnila při intermediální dávce IFN β .

Obrázek č. 4 je graf znázorňující anti-virovou aktivitu sIFNAR2 a sub-účinnou dávku IFN β (0,95 IU/ml) jako funkce doby pre-inkubace. Buňky WISH se exponovaly IFN β (sub-účinné dávce 0,95 IU/ml) a sIFNAR2, následuje pre-inkubace v indikovaném čase. Synergická antivirová aktivita se pozorovala pouze po čtyřech pre-inkubacích. Antivirová aktivita se měřila konverzí MTT 48 hodin po změně VSV. Při sub-terapeutickém množství IFN β tvorba komplexu IFNAR2/IFN vede k zesílení antivirové aktivity.

Obrázek č. 4 znázorňuje graf zobrazující zvýšenou antivirovou aktivitu lidského IFN β následující pre-inkubaci s sIFNAR2.

Obrázek č. 5 je graf znázorňující, že zvýšená antivirová aktivita lidského IFN β spojeného s sIFNAR je specifická pro IFNAR2, ale nikoli pro jiné proteiny.

Obrázek č. 6 je graf znázorňující farmakokinetické porovnání lidského IFN β a komplexu IFN β /IFNAR2 u myši, jak se stanovilo v tesu ELISA.

Obrázek č. 7 je graf znázorňující farmakokinetické srovnání lidského IFN β a komplexu IFN β /IFNAR2 u myši, jak se stanovilo v biologickém testu.

Na obrázku č. 8 je graf znázorňující farmakokinetické srovnání lidského IFN α a komplexu IFN α /IFNAR2 u myši, jak se stanovilo testem ELISA.

Na obrázku č. 9 je graf znázorňující farmakokinetické porovnání lidského IFN α a komplexu IFN α /IFNAR2 u myši, jak se stanovilo v biologickém testu.

Na obrázku č. 10 je aminokyselinová sekvence fúzního proteinu IFNAR2/IFN β n=2 (SEQ ID NO: 14). Linker (GGGGS)₂ (zbytky 240 až 249 sekvence SEQ ID NO: 14) jsou podtrženy.

Na obrázku č. 11 je gel zobrazující analýzu restrikčními enzymy pCMV-IFNAR2/IFN β , 10 % PAG, dráhy 3 až 7: štěpení enzymy BamHI/XhoI, dráha 2: štěpení enzymy SmaI/XhoI, dráha 1:

marker: štěpení pBR322 DNA-MspI, dráha č. 2 pCMV-IFNAR2/IFN β , OGS, dráha č. 3: 1GS, dráha č. 4: 2GS, dráha č. 5: 3GS, dráha č. 6: 4GS, dráha č. 7: 5GS, dráha č. 8: marker štěpení ϕ X174 RFDNA HaeIII.

Obrázek č. 12 je restrikční endonukleázová mapa expresivního vektoru IFNAR2/ IFN β .

Obrázek č. 13 znázorňuje analýzu fúzního proteinu IFNAR2/ IFN β westernovým přenosem. Dráha 1: konstrukce IFNAR2/ IFN β , která neobsahuje linker, dráha 2: konstrukce IFNAR2/ IFN β , která obsahuje linker Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), dráha 3: konstrukce IFNAR2/ IFN β , která obsahuje dva linkery Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), dráha 4: konstrukce IFNAR2/ IFN β , která obsahuje tři linkery Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), konstrukce IFNAR2/ IFN β , která obsahuje čtyři linkery Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), konstrukce IFNAR2/IFN β , která obsahuje pět linkerů Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1).

Na obrázku č. 14 je graf zobrazující anti-virovou aktivitu vnitřně fúzovaných molekul exprimovaných v supernatantech buněk CHO a normalizovaných na standardní aktivitu IFN β .

Obrázky č. 15A až B jsou grafy vykazující farmakokinetiky IFN β aplikované po intravenózní injekci IFNAR2. IFN β se zavedl injekcí buď samotný, nebo jako komplex IFNAR nebo bezprostředně po separované intravenózní injekci sIFNAR2. Poločas rozpadu séra se stanovil v časech po injekci testem ELISA, který je specifický pro IFN β (obrázek č. 15) a biologickou aktivitou v antivirovém testu WISH (Obrázek č. 15B).

Na obrázku č. 16 je graf znázorňující ochranný účinek v procentech cytotoxicity různých dávek komplexu „univerzálního“ IFN (lidský IFN α A/D), který tvoří komplex s sIFNAR2, ve srovnání s aplikací samotného univerzálního IFN nebo kontroly.

Obrázek č. 17 je graf znázorňující koncentraci IFN β v séru, jako funkci času po aplikaci intravenózní injekce s jednou dávkou buď přípravku Interfusion GS5 nebo samotného hIFN β .

Příklady provedení vynálezu

Materiály a metody

Antivirový biotest WISH a příprava komplexu:

Test WISH se vyvinul na základě protokolu popsaného v publikaci Novick et al., "Soluble interferon-alpha receptor molecules are present in body fluids" FEBS Lett. 314: 445-448 (1992).

Materiál:

- Buňky WISH (ATCC CCL 25)
- Zásobní roztok viru vesikulární stomatitidy (ATCC V-520-001-522), uchovávaný při teplotě -70°C
- IFN β , lidský rekombinant, InterPharm Laboratories LTD 90 x 10^6 IU/ml, specifická aktivita: $264,5 \times 10^6$ IU/mg.
- Rozpustný lidský IFNAR2, Koncentrace zásobního roztoku v PBS je 373 $\mu\text{g/ml}$.
- Růstové médium WISH (MEM s vysokým obsahem glukózy + sole Earles + 10 % FBS a 1,0 % L-glutamin + Penicilín/streptomycin (100 U/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$)).
- Médium pro test WISH (MEM s vysokým obsahem glukózy + sole Earles + 5 % FBS a 1,0 % L-glutamin + penicilín/streptomycin (100 U/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$), MTT v koncentraci 5 mg/ml PBS, uchovává se při teplotě -70°C).

Metody

- Ředění rekombinantního lidského IFN β na 19 IU/ml (4x koncentrovaná předem stanovená dávka EC50) v médiu vhodném pro test WISH.
- Ředění začíná při koncentraci 90 μ g/ml, připraví se 11 třinásobných ředění lidského rekombinantního sIFNAR2 v Eppendorfových zkumavkách v médiu vhodném pro test WISH. Dvanáct zkumavek obsahuje pouze médium vhodné pro test WISH.
- Do každé prohlubně s rovným dnem, která se nachází na destičce s 96 prohlubněmi, se přidá 25 μ l IFN β (aby se mohl kontrolovat účinek IFNAR2 v nepřítomnosti IFN β , přidej do sekce prohlubní 3 x 12 samotné médium vhodné pro test WISH o objemu 25 μ l).
- Do dvanácti řad destičky z 96 prohlubněmi ve třech kopiích přidej 25 μ l každého ředění sIFNAR2 (nebo do řady 12 pouze testovací médium).
- Předem se inkubuje IFN β s sIFNAR2 po dobu 1 až 4 hodiny při teplotě 37 °C v inkubátoru a pak se přidají buňky WISH.
- Do logaritmické fáze růstu buněk WISH se přidá roztok trypsin/EDTA, buňky se promyjí médiem testu WISH a připraví se suspenze o konečné koncentraci $0,8 \times 10^6$ buněk/ml.
- Do každé prohlubně se přidá 50 μ l suspenze buněk WISH (4×10^4 buněk do jedné prohlubně). Konečná koncentrace IFN β a IFNAR2 je ta, jak se vystaví působení buňkám. To znamená, že konečná koncentrace IFN β je 4,75 IU/ml (1x) a konečná koncentrace sIFNAR2 v řadě jedna je 22,5 μ g/ml.
- Po inkubaci po dobu 24 hodin ve zvlhčeném inkubátoru v atmosféře 5 % CO $_2$ se přidalo do všech prohlubní mimo prohlubní, kde jsou kontroly neobsahující virus (tam se přidal pouze stejný objem média vhodného pro test) 50 μ l ředění 1:10 (v médiu vhodném pro test WISH) zásobního roztoku VSV (dávka se předem stanovila tak, aby došlo k 100 % lyzi buněk WISH během 48 hodin).

- Po inkubaci dalších 48 hodin se do všech prohlubní přidalo 25 μ l rozotoku MTT. Destičky se pak inkubovaly po další dvě hodiny v inkubátoru.
- Obsahy prohlubní se odstranily otočením destičky a do prohlubní se přidalo 200 μ l 100 % etanolu.
- Po jedné hodině se provedlo odečítání destiček při vlnové délce 595 nm za použití software Soft max Pro a spektrofotometrického systému Spectramax (molekulové zařízení).

Všechny sekvenační reakce se provedly za použití sady „ThermoSequenase™ radiolabeled terminator cycle sequencing kit“ (Amersham Life Science, Cleveland, OH). Použily se protokoly doporučené výrobcem. Všechny sekvenační reakce se analyzovaly na sekvenačních gelech CastAway™Precast (Stratagene, LaJolla, CA), které obsahovaly 6 % polyakrylamidu a 7 M močovinu. Sekvenační reakce se nanosily v uspořádání A-C-G-T. Autoradiografy sekvenačních gelů se odečítaly manuálně. Pro analýzu sekvencí DNA se použil software Genetics Computer Sequence Analysis Software Package a počítač UNIX.

Příklad 1:

Aby se stanovila anti-virová aktivita lidského komplexu IFNAR2/IFN β a lidského komplexu IFNAR2Ig-IFN β , IFN β ve fixní koncentraci (4,75 IU/ml) se pre-inkubovalo po dobu 3 hodin při teplotě 37 °C s lidským sIFNAR2 (rekombinantní p40) nebo s různými koncentracemi lidského sIFNAR2Ig (0,25 až 30 000 ng/ml) a pak se testoval v testu WISH-VSV cytopaticity. V nepřítomnosti IFN se nedetekovala žádná antivirová ochrana (data nejsou uvedena).

Anti-virová aktivita interferonů typu I (užívaných v předem stanovených koncentracích EC50) v přítomnosti sIFNAR2 v přibližné koncentraci 30 ng/ml ukázala spolu s IFN β optimální

agonistickou aktivitu. Tuto aktivitu však nevykazuje samotná látka. Anti-virová aktivita se měřila MTT konverzí 48 hodin po dávce VSV.

V případě, že je přítomen IFN v očekávané koncentraci EC50, zaznamenala se ochrana (zobrazeno na obrázku č. 1, absorbance se rovná 0,45. V případě, že nedochází k ochraně hodnota absorbance je 0,0, při úplné ochraně se hodnota absorbance rovná 1,8)). Když se IFNAR2 nebo IFNAR2Ig titrovaly při různých koncentracích, došlo přibližně k 4 násobnému zesílení aktivity IFN β až do koncentrace IFNAR a IFNAR2Ig 32 ng/ml (popisuje se také v příkladu 2 a na obrázku č. 2). Koncentrace IFNAR nebo IFNAR2Ig vyšší jako 32 ng/ml aktivitu IFN β snižuje, jak se očekávalo. Způsobuje to kompetice mezi sIFNAR s membránovým IFNAR o IFN β . Tento experiment tak podporuje účinnost a zvyšuje aktivitu IFN β v komplexu IFNAR2/IFN.

Příklad 2:

Účinek změn koncentrace IFN β na aktivitu komplexu sIFNAR2/IFN se testoval při různých koncentracích IFN β kromě ED50. Jak je možné vidět na obrázku 2, při množství IFN β 4,75 IU/ml, pre-inkubace IFNAR2 po dobu jedné hodiny zvyšuje aktivitu IFN β přibližně dvakrát při maximální koncentraci přibližně 32 ng/ml. Při každé vyšší koncentraci IFN β nebylo možné detekovat zvýšení anti-virové aktivity IFN β , protože aktivita dosáhla už maximální hodnoty. Výsledky podporují teorii, že komplex IFNAR2/ IFN β vykazuje zvýšenou aktivitu IFN.

Příklad 3:

Odhadnutím anti-virové aktivity sub-účinné koncentrace IFN β (0,95 IU/ml) v různých časech pre-inkubace s různými koncentracemi IFNAR2 se testovaly kinetiky tvoření komplexu IFNAR2/ IFN β . Jak je zobrazeno na obrázku č. 3, čtyři hodiny

pre-inkubace jsou nezbytné pro zvýšení anti-virové aktivity IFN β při této sub-účinné dávce. Když se k množství IFN β , které není samotné aktivní, přidá IFNAR2 za vzniku komplexu, vede to k podstatnému zvýšení anti-virové aktivity IFN. Tento experiment podporuje teorii zvýšené aktivity IFN komplexu IFNAR2/ IFN β .

Příklad 4:

Stanovilo se, že bioaktivita IFN β rychle klesá po *in vitro* rekonstituci při teplotě 37 °C (fyziologický roztok pH 7,4). To je alespoň částečně způsobeno tvořením oligomerních struktur IFN β , které vykazují omezenou aktivitu. Za účelem testování, zda IFNAR2 zvyšuje stabilitu IFN β při fyziologickém pH, se provedl experiment, ve kterém se inkuboval samotný IFN β v různých koncentracích (v inkubačním médiu RPMI 1640, Gibco) nebo ve stejném inkubačním médiu v přítomnosti IFNAR2 při konstantním poměru IFNAR2 ku IFN β (2,5 ng/IU).

IFN β (v koncentraci 500 IU/ml) se pre-inkuboval se stejným objemem buď sIFNAR2 (1,25 μ g/ml) nebo pouze RPMI po dobu 3 hodiny při teplotě 37 °C. Titrace obou roztoků IFN β se uskutečnila v médiu vhodném pro test WISH na destičce s 96 prohlubněmi, dříve než se přidaly buňky WISH. VSV se přidal po 24 hodinách inkubace, jak se stanovilo konverzi MTT.

Jak je možné vidět na obrázku č. 4, samotný IFN β vykazuje hodnotu ED50 přibližně 104 IU/ml, zatímco pre-inkubace IFN β s rozpustným IFNAR2 vede k podstatnému zvýšení ED50 na hodnotu 7 IU/ml. Vysoká hodnota ED50 samotného IFN β může být způsobena oligomerizací IFN β v roztoku. Shora uvedené výsledky ukazují zvýšenou stabilitu IFN β , když tvoří komplex s IFNAR2.

Příklad 5:

Za účelem odhadnutí, zda zvýšená aktivita IFN β v přítomnosti IFNAR2 je způsobena specifickou ochranou pomocí sIFNAR, aktivita IFN β se hodnotila vytvořením komplexu s IFNAR2 nebo s jinými nepříbuznými proteiny při stejné koncentraci (lidský IgG, bovinní sérový albumin (BSA)).

Jak ukazuje obrázek č. 5, IFN β (500 IU/ml) se pre-inkubovalo se stejným objemem buď uvedených proteinů (1,25 μ g/ml) nebo pouze s v inkubačním médiu RPMI po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C. Titrace těchto roztoků IFN β v testovacím médiu WISH se uskutečnila před přidáním buněk WISH na destičce s 96 prohlubněmi. Za účelem stanovit účinek pre-inkubace na aktivitu IFN β zahrnulo se také čerstvě připravené IFN β . VSV se přidalo po 24 hodinách a po dalších 24 hodinách inkubace se odhadlo CPE, jak se stanovilo konverzí MTT.

Pre-inkubace IFN β s nespecifickými proteiny (to je BSA nebo lidské IgG) při koncentraci 2,5 ng/IU IFN β nechrání aktivitu IFN β po rekonstituci. Aktivita komplexu IFNAR2/ IFN β v tomto testu je podobná, jako aktivita čerstvě přidaného IFN β . Tento výsledek podporuje zjištění, že sIFNAR2 stabilizuje aktivitu IFN β .

Příklad 6:

Komplex IFNAR2/ IFN β vykazuje značně prodloužený farmakokinetický profil IFN β u myši, což se zjistilo testem ELISA a biologickou analýzou (obrázky č. 6 a 7).

Myším kmene B6D2F1 se aplikovala jediná intravenózní injekce buď s lidským IFN β ($2,5 \times 10^6$ IU/kg) nebo stejná koncentrace IFN β pre-inkubovaná po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C s lidským IFNAR2 (2,5 ng/IU IFN). Séra se získala 0,05 až 48 hodin po aplikaci z retro-orbitálního tkaniva a koncentrace IFN β a anti-virová aktivita IFN β se stanovila testem ELISA (obrázek č. 6) nebo biologickým testem WISH (obrázek č. 7).

Koncentrace séra, která klesla na hodnotu nižší než je citlivost testu (7,55 IU/ml) v testu ELISA nebyla vynesena do grafu.

Nejen, že komplex vykazuje vyšší farmakokinetický profil, ale také anti-virovým testem WISH se zjistilo, že se po celou dobu testu podstatně zvýšila úroveň biologické aktivity IFN β u myši. To naznačuje zvýšenou stabilitu a prodloužený poločas rozpadu komplexu IFNAR2/ IFN β v plazmě ve srovnání se samotným IFN β .

Příklad 7:

Komplex IFNAR2/ IFN β vykazuje značně prodloužený farmakokinetický profil IFN α 2a u myši, což se zjistilo testem ELISA a biologickými testy (Zobrazeno na obrázcích č. 8 a 9).

Myším kmene B6D2F1 se aplikovala jediná intravenózní injekce buď lidského IFN α ($1,25 \times 10^5$ IU/kg) nebo stejná koncentrace IFN α pre-inkubovaného po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C s lidským IFNAR2 (14,9 ng/IU IFN). Séra se shromáždila v označeném čase z retro-orbitálního tkaniva a koncentrace IFN α 2a a anti-virová aktivita se odhadla na základě testu ELISA (obrázek č. 8) nebo biologickým testem WISH (obrázek č. 9).

IFN α se stanovil testem ELISA, který je specifický pro lidský IFN α . Sérové koncentrace nižší než je citlivost testu (30 IU/ml) v testu ELISA se do grafu nevynesla.

Nejen, že komplex vykazuje vyšší farmakokinetický profil, ale také anti-virovým testem WISH se zjistilo, že se po celou dobu testu podstatně zvýšila úroveň biologické aktivity IFN α u myši. To naznačuje zvýšenou stabilitu a prodloužený poločas rozpadu komplexu IFNAR2/ IFN v plazmě ve srovnání se samotným IFN α .

Příklad 8: Navržení fúzních proteinů IFNAR2/IFN

Konstrukce se připravily tak, že C-konec extracelulární oblasti IFNAR2 se fúzuje s N-koncem zralého IFN za použití následujících peptidových linkerů, kde G a S reprezentuje aminokyseliny glycin a serin.

IFNAR2extracelulární (linker) zralý IFN β

...ESEFS(GGGGS)_nMSY..., kde n = 0 (SEQ ID NO: 5), 1 (SEQ ID NO: 7), 2 (SEQ ID NO: 6), 3 (SEQ ID NO: 5), 4 (SEQ ID NO: 4) a 5 (SEQ ID NO: 3).

Celá aminokyselinová sekvence, kde n = 2 fúze IFNAR2/IFN β je zobrazena na obrázku č. 10 (SEQ ID NO: 14).

Expresivní vektor pSVEIF, který obsahoval gen exprimující lidský rekombinantní IFN se použil jako templát pro PCR. Syntetické primery se navrhly tak, že se z templátu mohla amplifikovat pouze kódující oblast zralého proteinu lidského IFN (MSY...). 5'primer zahrnoval sekvence místa štěpení restričním enzymem SmaI, posledních sedm aminokyselin IFNAR2 (GQESEFS) (zbytky 344-349 SEQ ID NO: 14) a (GGGGS)₁ (SEQ ID NO: 1) linker. Do 5'primeru se také zavedla restriční místa BamHI a XhoI, aby bylo možné klonovat jiné kazety. 3'primer obsahoval bezprostředně po stop kodonu TGA hIFN β restriční místo AvrII. PCR obsahoval přibližně 1 gram templátové DNA, 1 g každého primeru pro PCR, 0,2 mM každého dATP, dCTP, dGTP a dTTP, 1x reakční pufr TermoPol (10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, (pH 8,8 při teplotě 25 °C), 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1 % Triton X-100: New England Biolabs, Beverly, MA) a 3 mM MgSO₄ (konečná koncentrace MgSO₄ je 5 mM) v reakčním objemu 100 μ l. Po počáteční inkubaci VENTR® při teplotě 99,9 °C po dobu 30 vteřin se přidaly do reakce 2 jednotky DNA polymerázy VENTR®. PCR zahrnuje 20 cyklů: a) při teplotě 99,9 °C po dobu 30 vteřin, b) při teplotě 65 °C až 55 °C po dobu 30 vteřin, teplota klesá při každém cyklu o 0,5 °C a c) při teplotě 75 °C po dobu 40 vteřin. Dalších 15 cyklů se provedlo se shora uvedeným profilem, přičemž se teplota hybridizace udržovala

na hodnotě 55 °C. Reakce PCR se čistily za použití čistícího systému DNA Wizard™ PCR Preps (Promega, Madison, WI). Po štěpení produktů PCR restriční enzymem AvrII se obsahy reakcí čistily na agarózových gelech s nízkou teplotou tání. Fragment získaný z gelu obsahující sekvenci zralého proteinu hIFN β s 1 GS linkrem se ligoval do expresivního vektoru pCMV-p40 štěpeného restričními enzymy (SmaI + AvrII). Tento vektor obsahuje gen kódující rozpustnou formu lidského rekombinantního IFNAR2. Obsahy ligačních reakcí se použily pro transformaci kompetentních buněk mikroorganismu *E. coli* XL-Blue za použití standardních metod (popisuje se v publikaci Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory manual, 2 nd Ed., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY, 1989, paragraf 6.3 a 6.4 v appendix C a D.)). Správné uspořádání konstrukce, která se nazývá pCMV-IFNAR2/IFN β GS se potvrdilo štěpením restričními endonukleázami a sekvenováním oblasti „interfúze“ vytvořené PCR. Následné konstrukce se vytvořily za použití oligonukleotidových kazet, kdy každá obsahuje BamHI přesah, vhodný linker (GGGGS) n (SEQ ID NO: 1, kdy $n = 1$) a XhoI přesah. Kazety 0 GS obsahují SmaI a XhoI přesah. Po vytvoření vektoru pCMV-IFNAR2/IFN β 1 GS se tento vektor štěpil restričními enzymy BamHI a XhoI a vhodné kazety se ligovaly do uvedeného vektoru. Za účelem vytvořit konstrukci 0 GS se vektor štěpil restričními enzymy SmaI a XhoI, aby se mohla ligovat kazeta.

Celkem se vytvořilo šest vektorů, pCMV-IFNAR2/IFN β n (GS), kde n reprezentuje 0, 1, 2, 3, 4 nebo 5 jednotek linkeru GGGGS (SEQ ID NO: 1). Výsledky štěpení restričními enzymy jsou uvedeny na obrázku č. 11. Sekvenační primery se navrhly tak, že se sekvenovala celá kazeta pro každou konstrukci. Pro každou potvrzenou konstrukci se připravila izolace plazmidové DNA ve velkém měřítku za použití běžně dostupného kitu a podle protokolů doporučených výrobcem (Qiagen, Chatsworth, CA).

Obrázek č. 12 je mapa plazmidu pCMV-IFNAR2/IFN β expresivního plazmidu interfúze. Transkripce fúzního proteinu IFNAR2/IFN β se řídí lidským časným promotorem CMV. Za účelem 3'zpracování transkriptů IFNAR2/IFN β se použila sekvence polyadenylačního signálu lidského růstového hormonu.

Seznam vektorů:

číslo	název	Exp.vektor	Linker GGGGS (SEQ ID NO: 1)
1	pCMV-IFNAR2-IFN β , 0GS	PCMV.PA4	N/A
2	pCMV-IFNAR2-IFN β , 1GS	PCMV.PA4	Jeden
3	pCMV-IFNAR2-IFN β , 2GS	PCMV.PA4	Dva
4	pCMV-IFNAR2-IFN β , 3GS	PCMV.PA4	Tři
5	pCMV-IFNAR2-IFN β , 4GS	PCMV.PA5	Čtyři
6	pCMV-IFNAR2-IFN β , 5GS	PCMV.PA4	Pět

Sekvenční data se získala z oblastí vytvořených PCR fúze IFNAR2/IFN β 1GS. Tato data ukazují, že sekvence byla předem předpovězena. Sekvenční data se získala v případě oblasti peptidového linkeru jiných konstrukcí. Sekvence byla také předem určena.

Analýza northenovým přenosem se provedla v případě buněk transfekovaných každou konstrukcí. Ve všech drahách obsahující vzorky IFNAR2/IFN β n GS se objevil pruh o přibližné velikosti 1,4 kb v případě obou sond IFNAR2 a v případě sondy IFN β . V případě sondy IFN β se pozoroval další pruh o velikosti 0,9 kb. Pruh uvedené velikosti odpovídá transkriptu s alternativním sestřihem, který obsahuje alespoň 6 aminokyselin IFNAR2, (n) GS peptidový linker a sekvenci kódující zralý protein hIFN. To se potvrdilo sekvenováním cDNA, která se připravila z celkové izolované RNA z dočasně transfekovaných buněk CHO popsanych v příkladu 9.

Příklad 9:

Dočasná transfekce.

Buňky CHO-DUKX jsou klonální mutanti buněk vaječníků čínských křečků, které postrádají aktivitu dihydrofylátové reduktázy (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220 (1980), Graff et al. Mol. Cell. Biol. 2: 93-96 (1982)). Tyto buňky se udržovaly v kultivačním médiu α MEM s ribonukleozidy a deoxyribonukleozidy, doplněném 10 % fetálním bovinním sérem (FBS) a 1% L-glutaminem (úplné médium). Dočasná tranfekce se provedla za použití činidla Lipofectamin PLUSTM (GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) a podle protokolu dodaného výrobcem. Přibližně 24 hodin před transfekcí se buňky nanasly na plotnu o průměru 100 mm při hustotě 2×10^6 buněk na jedné plotně. V případě transfekce se použily 4 μ g dvoušroubovicové vektorové plazmidové DNA (pCMV-IFNAR2/IFN n GS, kde n = 0, 1, 2, 3, 4 nebo 5). K ředění DNA a činidla PLUS se použilo médium bez séra, které doporučuje výrobce. Po inkubaci při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin v úplném médiu se shromáždily buněčné supernatanty za účelem testu ELISA (IFNAR2, IFN β) a westernovy analýzy.

Extrakce RNA a northernova analýza

Z dočasně transfekovaných buněk CHO-DUKX se extrahovala celková buněčná RNA (Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162: 156-159 (1987)). 10 g celkové RNA v každé dráze se rozdělilo podle velikosti na agarózových gelech, které obsahovaly jako denaturační činidlo formaldehyd. Vzorky se nanasly ve dvou sadách. RNA se přenesla na nylonovou membránu GeneScreen Plus (DuPont/NEW Medical Products, Boston, MA) kapilárním přenosem pomocí 10 x SSC (1,5 M chlorid sodný, 0,15 M citrát sodný). Imobilizovaná RNA se hybridizovala s PCR fragmenty hIFNAR2 a hIFN β značenými ³²P. Hybridizace proběhla v modifikovaném roztoku podle Church et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:

1991-1995 (1984). Pufr obsahoval 0,25 M fosforečnan sodný s hodnotou pH 7,2, 0,25 M chlorid sodný, 7 % dodecylsulfát sodný (SDS), 1 mM etylylendiamintetraoctová kyselina a 100 µg/ml tRNA z mikroorganismu *E. coli*. Sondy značené ^{32}P se vytvořily za použití běžně dostupných sad („High Prime“ Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) a zde popsaných postupů. Nezačleněná radioaktivita se odstranila chromatografií na kolonách Sephadex G-50. Po hybridizaci se bloty promyly. Nejprísnejší používané podmínky jsou 0,2 x SSC, 0,1 % SDS při teplotě 65 °C. Bloty se vystavily autoradiografii.

Expresie interfúzních proteinů

V supernatantech z interfúzních konstrukcí dočasně transfekované do buněk CHO se analyzovala síla exprese IFNAR2 a IFNβ za použití IFNAR2 specifického testu ELISA a IFNβ

ELISA (Toray). Výsledky této analýzy jsou uvedeny v tabulce č. IV.

Tabulka č. IV: Interfúzní konstrukce dočasně transfekované do buněk CHO

Identifi kace vzorku	hIFNβ* U/ml	hIFNAR2+ ng/ml	hIFNβ# µg/ml	hIFNβ## pmol	hIFNAR2◆ pmol	IFN/IFNA R
0GS	29 175	1094	0,146	6,571	31,802	0,207
1GS	24 906	994	0,125	5,602	28,890	0,194
2GS	13 597	600	0,068	3,063	17,442	0,175
3GS	14 998	718	0,075	3,378	20,857	0,162
4GS	9 998	535	0,050	2,251	15,538	0,145
5GS	9 597	540	0,048	2,161	15,698	0,138
IFNAR2	Nezjistilo se	1176			34,200	
Kultivač	Nezjistilo se	0				

ní	lo se					
médium						

- * stanovilo se za použití kitu TORAY
- + stanovilo se za použití hIFNAR2 ELISA
- # založeno na specifické aktivitě $2,0 \times 10^5$ U/mg (2×10^8 /mg)
- ## založeno na molekulové hmotnosti 22 200 (průměrná molekulová hmotnost hIFN β stanoveno analýzou MALDI-TOF)
- ♦ založeno na molekulové hmotnosti 34 400 (průměrná molekulová hmotnost stanovena analýzou MALDI-TOF).

Se zvyšující se délkou linkeru je možné pozorovat snižuje množství detekovatelného IFNAR2 a IFN β . V této době není možné stanovit, zda je to způsobeno snižujícím se množstvím interfúzního proteinu exprimovaného jak se prodlužuje délka linkeru nebo zda se vzrůstající délkou linkeru se IFN β může vázat na vazebné místo IFNAR2 a proto není zcela detekovatelný testy ELISA. Je známo, že test IFN β detekuje pouze IFN β , který netvoří komplex.

Analýza westernovým přenosem fúzního proteinu IFNAR2/IFN β

Za účelem stanovit, že se interfúzní proteiny exprimují ve vhodné molekulové hmotnosti a že se neexprimuje volný IFN β , se analyzovaly supernatanty z transfekovaných buněk westernovým přenosem za použití protilátek ant-IFN β za účelem detekovat interfúzi. Výsledky uvedené analýzy jsou zobrazeny na obrázku č. 13.

S 15 μ l supernatantů z buněk CHO se dočasně transfekovaly konstrukcí IFNAR2/IFN β (dráha 1 až 6) nebo konstrukcí IFNAR2 (dráha 7), kultivačním médiem (dráha 8) nebo IFN β (dráha 9) se provedl test SDS-PAGE za neredukčních podmínek. Pak následoval elektrický přenos na membránu PVDF. Membrána se testovala

sondou s králičiimi protilátkami proti-IFN β a vyvijela se alkalickou fosfatázou spojenou kozími anti-králičiimi protilátkami za použití kitu detekující luminiscenci Western-Star.

V supernatantech libovolných volných konstrukcí se nedetekoval žádný volný IFN β . Každá konstrukce exprimovala protein, který vhodnou molekulovou hmotností odpovídal interfúzní konstrukcí. Molekulová hmotnost se zjistila testem westernova přenosu.

Příklad 10:

Anti-virová aktivita interfúzních molekul

U každého supernatantu kultury obsahující interfúzi se testovala anti-virová aktivita pomocí testu cytopaticity, při kterém se buňky WISH (lidské amniotické buňky) vystavily působení VSV, což následuje po přidání buď IFN β (kontrola) nebo interfúzí. Výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 14.

Supernatanty buněk CHO, které obsahují exprimované rekombinantní proteiny (jak detekuje test ELISA a westernův přenos) nebo samotné kultivační médium kultury buněk CHO se přidalo ve dvou kopiích do horní řady destiček s 96 prohlubněmi s rovným dnem vhodných pro kultivaci tkáňových kultur v objemu 75 μ l/prohlubeň. Do zbývajících prohlubních na destičce se přidalo 50 μ l testovacího média buněk WISH. Každý vzorek se ředil v třínásobném postupném ředění tak, že se z prohlubní, které obsahují supernatanty (horní řada), odstranilo 25 μ l a přenesly se do vedlejší řady, která obsahuje 50 μ l m testovacího média WISH. V prohlubních, které obsahují pozitivní kontroly se supernatant v horní řadě nahradil testovacím médiem WISH, které obsahuje 1 000 IU/ml lidského IFN β , který byl sériově třínásobně ředěn podél délky destičky. Do každé prohlubně se pak přidalo 50 μ l buněčné suspenze WISH ($0,6 \times 10^6$ buněk /ml v testovacím médiu WISH) tak, že konečná

koncentrace v horní řadě obsahující REBIF® je 500 IU/ml a počáteční ředění supernatantů buněk CHO je 1:2. Po 24 hodinách inkubace v atmosféře 5 % CO₂ při teplotě 37 °C se do každé prohlubně (mimo těch, označených jako neinfikované kontrolní prohlubně) přidalo 50 µl testovacího média WISH, které obsahuje virus vesikulární stomatitidy (1:10). Po 48 hodinách kultivace se stanovila konverzí MTT životaschopnost buněk WISH.

Anti-virová aktivita zprostředkovaná interfúzními molekulami se stanovila normalizací ředícího faktoru supernatantů nezbytných pro dosažení EC₅₀ ku EC₅₀ stanovené pro čištěný standard lidského IFNβ. Jak roste délka linkeru roste také anti-virová aktivita interfúzních konstrukcí.

Příklad 11:

Tento příklad je farmakokinetická studie lidského komplexu IFNβ/sIFNAR2 u myši po intravenózní aplikaci. Porovnávají se předem vytvořené komponenty komplexů a odděleně injektované komponenty komplexů. 36 myši kmene D2F1 (6 až 8 týdnů starých) (hmotnost každého je 20 g) se oddělily do čtyř skupin:

Skupina 1 obsahuje devět myší, kterým se injekcí aplikovala intravenózně jedna dávka roztoku o objemu 200 µl, přičemž roztok obsahuje 50 000 IU/ml lidského IFNβ (konečná dávka je 10 000 IU/ myš).

Skupině 2 (devět myší) se aplikovalo 200 µl roztoku, který obsahuje 50 000 IU/ml lidského IFNβ a 125 mg/ml sIFNAR2 (poměr 2,5 ng/IU).

Skupině 3 (devět myší) se aplikovalo (1) 200 µl roztoku obsahujícího 125 mg/ml pak (2) 200 ml roztoku obsahujícího 50 000 IU/ml lidského IFNβ)poměr 2,5 ng/IU).

Skupině 4 (devět myší) se aplikovalo (1) 200 µl roztoku obsahujícího 625 mg/ml a pak (2) 200 ml roztoku obsahujícího 50 000 IU/ml lidského IFNβ (poměr 10 ng/IU).

Ve specifikovaném čase se shromáždily krevní vzorky (objem jednoho vzorku je přibližně 200 μ l) tak, že se poruší retro-orbitální venózní tkanivo kapilárou. U tří myší z každé skupiny se odebíraly vzorky krve 0,05, 2 a 12 hodin po aplikaci. U tří myší z každé skupiny se vzorky krve odebíraly 0,54 a 24 hodin po aplikaci a u tří myší v každé skupině se vzorky krve odebíraly 1, 8 a 48 hodin po aplikaci. Vzorky krve se nechaly srážet po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti a provedla se mikrocetrifugace. Séra se uskladnila při teplotě -70°C až do doby, kdy se sebraly všechny vzorky. V sérech se testovala přítomnost lidského IFN β testem ELISA specifickým pro IFN β za použití kitu Toray pro test ELISA lidského IFN β (TBF, Inc.) a bioaktivita za použití antivirového testu WISH.

Výsledky testu ELISA specifického pro IFN β jsou zobrazeny na obrázku č. 15A a výsledky antivirového testu WISH jsou zobrazeny na obrázku č. 15B.

Je možné vidět, že poločas rozpadu IFN β injektovaného jako komplex IFNAR2 je podobný jako poločas rozpadu injektovaný IFN β následující separovanou injekcí IFNAR. Tyto výsledky jsou konzistentní s *in vivo* tvorbou komplexu IFN β /IFNAR2 s prodlouženým poločasem rozpadu.

Příklad 12:

Myši C57BL/6 se ošetřily komplexem „univerzální“ IFN (lidský IFN α A/D) a sIFNAR2. Měřil se ochranný účinek, co se týká cytotoxicity, a porovnával se s aplikací různých dávek samotného univerzálního IFN nebo s kontrolou. První skupině se aplikovalo 5×10^3 IU univerzálního IFN v komplexu s 5 ng/IU sIFNAR. Druhé skupině se aplikovalo 5×10^3 IU univerzálního IFN. Třetí skupině se aplikovalo 5×10^4 IU univerzálního IFN a čtvrté skupině se aplikovalo PBS/2 % NMS. V případě každé z těchto myší se NK aktivita měřila jako cytotoxicita slezinných buněk proti NK cílovým buňkám YAC-1. Výsledky jsou

uvedeny na obrázku č. 16. NK aktivita je podstatně vyšší u myši ošetřených komplexem univerzální IFN/sIFNAR2 ve srovnání s myšima ošetřenými pouze univerzálním IFN.

Příklad 13:

Jak se uvádí shora v textu, farmakokinetická studie ukázala dramatické prodloužení poločasu rozpadu IFN typu I v séru, když se aplikoval jako komplex s sIFNAR2, což je rozpustná forma podjednotek receptoru IFN. Výsledky *in vitro* naznačují, že fyzikální spojení s IFNAR2 vede ke stabilizaci v normálním případě labilního IFN. Za účelem stanovení zda zesílený profil PK a stabilizační účinek IFNAR2 způsobuje zesílení a prodloužení účinnosti zprostředkované IFN *in vivo*, se vyvinul model, ve kterém se myším s těžkým kombinovaným deficitem imunity (*scid/scid*) aplikuje letální dávka buněčné linie lymfomu Daudiho lidských B buněk citlivé na IFN (popisuje se v publikaci Ghetie et al., Cancer Research 51: 5876 (1991), Ghetie et al., Blood 80: 2315 (1990)). U těchto myši došlo k paralýze mezi 14 až 20 dnem po injekci nádorových buněk ve spojení s histologickým důkazem rozptýleného lymfomu. Je nutné poznamenat, že přežití těchto myši je možné prodloužit v závislosti na dávce denní podkožní aplikací lidského IFN β . Tento model se používá pro hodnocení IFNAR2 jako činidla, které zesiluje biologickou aktivitu spojenou s IFN typ 1 *in vivo*.

Za účelem stanovit vztah mezi průměrným časem paralýzy a dávkou IFN β v Daudiho modelu *scid*, pěti skupinám myši 5 BALB/cByJSmn-*scid/scid*, 4 až 5 týdnů starých, pohlaví ženského se aplikovalo podkožně 200 μ l lidského IFN β na jednu myš a den každý den, ode dne 0 do dne 30. Standardní dávka Daudiho buněk získaná ze zmrazené zásobní suspenze je 5×10^6 buněk na jednu myš v PBS. Aplikuje se podkožní injekcí do zátylku v den 0. Skupinám myši se aplikovalo následující množství IFN.

Skupina 1: 135×10^4 IU/myš (675×10^4 IU/ml)

Skupina 2: 45×10^4 IU/myš (225×10^4 IU/ml)

Skupina 3: 15×10^4 IU/myš (75×10^4 IU/ml)

Skupina 4: 5×10^4 IU/myš (25×10^4 IU/ml)

Skupina 5: PBS s 2% NMS.

Čas paralýzy jako jednotlivé a průměrné hodnoty jsou zobrazeny v tabulce č. V.

Tabulka č. V

	Dny paralýzy	Průměr ($\pm$ SD)
Skupina 1	26, 31, 35, 37, 40	33,8 (5,4)
Skupina 2	20, 23, 23, 23, 26	23,0 (2,1)
Skupina 3	20, 20, 22, 22, 23	21,4 (1,3)
Skupina 4	17, 18, 18, 18, 18	17,8 (0,5)
Skupina 5	14, 14, 15, 15, 15	14,6 (0,6)

Je možné vidět, že průměrný čas paralýzy v xenoimplantátovém modelu Daudi/scid je možné prodloužit denní aplikací lidského IFN β podkožní injekcí. Tento způsob je závislý na dávce.

Příklad 14:

Za účelem stanovit, zda protinádorový účinek IFN β se může zesílit vytvořením komplexu s IFNAR2 v poměru 2,5 ng/IU se sedm skupin po pěti myších ošetřilo podle stejného protokolu uvedeného v příkladu 13 s tou výjimkou, že testované materiály se aplikovaly každé skupině jsou následující:

Pouze IFN β /myš	IFN β plus sIFNAR2/myš
Skupina 1 2×10^2 IU	Skupina 4 2×10^2 IU plus 0,5 μ g
Skupina 2 2×10^3 IU	Skupina 5 2×10^3 IU plus 5,0 μ g
Skupina 3 2×10^4 IU	Skupina 6 2×10^4 IU plus 50,0

	µg
Skupině 7 se aplikovaly Daudiho buňky, ošetření je pouze ředěné	

Čas paralýzy se uvádí jako jednotlivé a průměrné hodnoty v následující tabulce:

Tabulka č. VI:

	Dny paralýzy	Průměr (±SD)
Skupina 1	16, 16, 17, 18, 19	17,2 (1,3)
Skupina 2	17, 18, 18, 19, 19	18,2 (0,8)
Skupina 3	17, 17, 17, 18, 18	17,6 (0,9)
Skupina 4	17, 17, 18, 18, 19	17,8 (0,8)
Skupina 5	17, 18, 19, 20, 20	18,8 (1,3)
Skupina 6	21, 22, 22, 23, 26	22,8 (1,9)*
Skupina 7	16, 16, 17, 17, 17	16,6 (0,6)

* Podstatně odlišný (hodnota p je menší nebo rovno 0,05) ve srovnání se stejnou koncentrací IFNβ, který není ve formě komplexu, párové porovnání skupin se provedlo způsobem ANOVA.

Je možné vidět, že anti-nádorová aktivita nízké dávky IFNβ 2×10^4 IU/myš/den a Daudi/scid xenoimplantátový model podstatně zesílil vznikem komplexu s IFNAR2.

V dalším experimentu (není uveden) se studoval účinek frekvence injekcí na průměrnou dobu paralýzy. Stanovilo se, že podstatně zvýšená protinádorová aktivita v Daudi/scid xenoimplantátovém modelu se může získat ošetřením komplexem IFNβ/IFNAR G2, když se zavádí injekcí pouze jednou za týden. To se porovnává s účinkem volného IFNβ, který se aplikuje jednou za den. Dále v dalším experimentu (není ukázán) se testoval optimální poměr IFNAR ku IFNβ. Zjistilo se, že optimální poměr IFNAR2 ku IFNβ při zesílení anti-nádorové aktivity při jedné

koncentraci IFN β (2×10^4 /IU/myš/den) bylo 2,5 ng IFNAR2 na pg IFN β .

Ve druhém experimentu se zjistilo, že optimální poměr IFNAR2 ku IFN β při zesílení anti-nádorové aktivity při koncentraci IFN β 5×10^4 IU/myš/den byl 0,3 ng IFNAR2 na pg IFN β . Tyto dva experimenty indikují, že optimální poměr závisí na koncentraci IFN β a zdá se, že čím vyšší koncentrace IFN β , tím je nutný nižší poměr.

V jiném experimentu za použití stejného modelu se stanovilo, že aplikace samotného IFNAR2 nezvyšuje počet přežitých myší.

Příklad 15:

Tento příklad je farmakokinetická studie, která se provedla za účelem stanovení poločasu rozpadu interfúzní molekuly 5GS v séru myši po jedné dávce pomocí intravenózní injekce. 21 myší, samic, kmen B6D2F1 (6 až 8 týdnů) (každá má hmotnost 20 g) se rozdělily do tří skupin následujícím způsobem:

Skupina 1: obsahuje devět myší, kterým se intravenózní injekcí zavedlo v jedné dávce 200 μ l roztoku obsahující 100 000 IU/ml interfúze 5GS (konečná dávka je 20 000 IU/myš nebo 5×10^6 IU/kg).

Skupina 2: devíti myším se aplikovalo 200 μ l roztoku obsahující 100 000 IU/ml lidského IFN β .

Skupina 3: obsahuje tři myši, kterým se neaplikovala žádná injekce a které slouží jako negativní kontrola.

Za předpokladu, že objem krve je přibližně 2 ml/myš teoretická hodnota C_{max} a T_{max} je 10 000 IU/ml v případě skupiny 1 a 2. Krev třech myší z každé skupiny 1 a 2 se testovala 0,05, 2 a 12 hodin po aplikaci. Krev třech myší z každé skupiny 1 a 2 se testovala 0,5, 4 a 24 hodin po aplikaci a krev třech myší z každé skupiny 1 a 2 se testovala

1, 8 a 48 hodin po aplikaci. V séru se testovala přítomnost bioaktivního lidského IFN β za použití testu WISH.

Výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 17. Zatímco IFN β je odstraněna prakticky bezprostředně, interfúzní molekula přetrvává v séru dlouho po injekci. To naznačuje, že fúzní protein má požadovaný stabilizační účinek.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Molekula obsahující komplex interferonu typu I (IFN) a podjednotky receptoru lidského interferonu α/β (IFNAR), který je schopen se vázat na IFN typ I komplexu, ve kterém se uvedený IFN typ I váže na uvedený IFNAR kovalentní vazbou nebo peptidovou vazbou,

kde IFN typ I má sekvenci v podstatě obsahující sekvenci

a) přirozeného IFN typ I,
b) fragmentu látky popsané v odstavci a), který vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I,

c) varianty látky popsané v odstavci a) nebo b), která vykazuje alespoň 70 % sekvenční identitu s látkou popsanou v odstavci a) nebo b) a která vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I,

d) varianty látky popsané v odstavci a) nebo b), kterou kóduje sekvence DNA, jenž hybridizuje s komplementem přirozené sekvence DNA kódující látky popsanou v odstavci a) nebo b) za středně přísných podmínek a která vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I nebo

e) sole nebo funkčního derivátu látky popsané v odstavci a), b), c) nebo d), která vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I a

kde uvedený IFNAR vykazuje sekvenci v podstatě obsahující sekvenci

f) polypeptidového řetězce přirozeného lidského IFNAR,

g) fragmentu látky popsané v odstavci f), který vykazuje biologickou aktivitu IFNAR,

h) varianty látky popsané v odstavci f) nebo g), která vykazuje alespoň 70 % sekvenční identity s látkou popsanou v odstavci a) nebo b) a která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR,

i) varianty látky popsané v odstavci f) nebo g), kterou kóduje DNA sekvence, jenž hybridizuje s komplementem přirozené DNA sekvence kódující látku popsanou v odstavci f) nebo g) za středně přísných podmínek a která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR nebo

j) sole nebo funkčního derivátu látky popsané v odstavci f), g), h) nebo i), která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR.

2. Molekula podle nároku 1, kde uvedený IFN typ I se váže na uvedený IFNAR kovalentní vazbou.

3. Molekula podle nároku 1, kde uvedený IFN typu I se váže na uvedený IFNAR peptidovou vazbou.

4. Molekula podle nároku 3, kde uvedený IFN typ I je spojen s uvedeným IFNAR pomocí peptidového linkeru.

5. Molekula podle nároku 4, kde uvedený peptidový linker je (GGGGS) n , kde $n = 1$ až 5.

6. Molekula podle nároku 1, kde IFN typ I je IFN α , IFN β nebo IFN ω .

7. Molekula podle nároku 6, kde uvedený IFN typ I je IFN β .

8. Molekula podle nároku 1, kde uvedený IFNAR je beta podjednotka receptoru lidského interferonu α/β (IFNAR2).

9. DNA kódující fúzní protein, kterým je molekula podle nároku 3.

10. Hostitelská buňka, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se transformovala vektorem nesoucím DNA podle

nároku 9 takovým způsobem, který umožňuje expresi uvedeného fúzního proteinu.

11. Způsob přípravy fúzního proteinu, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kultivaci hostitelské buňky podle nároku 10 a získání exprimovaného fúzního proteinu.

12. Způsob zlepšení doby skladování interferonu typu I, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se zahrnuje skladování uvedeného interferonu ve formě komplexu podle nároku 1 nebo komplexu, kde uvedený IFN se váže na uvedený IFNAR nekovalentní vazbou.

13. Farmaceutická kompozice obsahující farmaceuticky přijatelný nosič a komplex interferonu typu I (IFN) a podjednotku receptoru lidského interferonu α/β (IFNAR), který je schopen se vázat na IFN typ I komplexu, kde

uvedený IFN typu I má sekvenci v podstatě obsahující sekvenci

a) přirozeného IFN typu I

b) fragmentu látky popsané v odstavci a), který vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I,

c) varianty látky popsané v odstavci a) nebo b), která vykazuje alespoň 70 % sekvenční identitu s látkou popsanou v odstavci a) nebo b) a která vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I,

d) varianty látky popsané v odstavci a) nebo b), kterou kóduje sekvence DNA, jenž hybridizuje s komplementem přirozené sekvence DNA kódující látku popsanou v odstavci a) nebo b) za středně přísných podmínek a která vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I nebo

e) sole nebo funkčního derivátu látky popsané v odstavci a), b), c) nebo d), která vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I a

kde uvedený IFNAR vykazuje sekvenci v podstatě obsahující sekvenci

f) polypeptidového řetězce přirozeného lidského IFNAR,

g) fragmentu látky popsané v odstavci f), který vykazuje biologickou aktivitu IFNAR,

h) varianty látky popsané v odstavci f) nebo g), která vykazuje alespoň 70 % sekvenční identity s látkou popsanou v odstavci f) nebo g) a která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR,

i) varianty látky popsané v odstavci f) nebo g), kterou kóduje DNA sekvence, jenž hybridizuje s komplementem přirozené DNA sekvence kódující látku popsanou v odstavci f) nebo g) za středně přísných podmínek a která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR nebo

j) sole nebo funkčního derivátu látky popsané v odstavci f), g), h) nebo i), která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR.

14) Použití receptoru lidského interferonu α/β (IFNAR) při výrobě medikamentu pro zesílení biologických účinků interferonu typu I (IFN), kde uvedený IFNAR má sekvenci v podstatě obsahující sekvenci

a) přirozeného IFN typu I,

b) fragmentu látky popsané v odstavci a), který vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I,

c) varianty látky popsané v odstavci a) nebo b), která vykazuje alespoň 70 % sekvenční identitu s látkou popsanou v odstavci a) nebo b) a která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR,

d) varianty látky popsané v odstavci a) nebo b), kterou kóduje sekvence DNA, jenž hybridizuje s komplementem přirozené sekvence DNA kódující látku popsanou v odstavci a) nebo b) za

středně přísných podmínek a která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR nebo

e) sole nebo funkčního derivátu látky popsané v odstavci a), b), c) nebo d), která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR.

15. Použití komplexu interferonu typu I (IFN) a podjednotky receptoru lidského intereferonu α/β (IFNAR), který je schopen se vázat na IFN typ I komplexu, při výrobě medikamentu pro prodloužení účinku IFN typ I *in vivo*,

kde uvedený IFN typ I má sekvenci v podstatě obsahující sekvenci

a) přirozeného IFN typu I

b) fragmentu látky popsané v odstavci a), který vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I,

c) varianty látky popsané v odstavci a) nebo b), která vykazuje alespoň 70 % sekvenční identitu s látkou popsanou v odstavci a) nebo b) a která vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I,

d) varianty látky popsané v odstavci a) nebo b), kterou kóduje sekvence DNA, jenž hybridizuje s komplementem přirozené sekvence DNA kódující látku popsanou v odstavci a) nebo b) za středně přísných podmínek a která vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I nebo

e) sole nebo funkčního derivátu látky popsané v odstavci a), b), c) nebo d), která vykazuje biologickou aktivitu IFN typu I a

kde uvedený IFNAR vykazuje sekvenci v podstatě obsahující sekvenci

f) polypeptidového řetězce přirozeného lidského IFNAR,

g) fragmentu látky popsané v odstavci f), který vykazuje biologickou aktivitu IFNAR,

h) varianty látky popsané v odstavci f) nebo g), která vykazuje alespoň 70 % sekvenční identity s látkou popsanou

v odstavci f) nebo g) a která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR,

i) varianty látky popsané v odstavci f) nebo g), kterou kóduje DNA sekvence, jenž hybridizuje s komplementem přirozené DNA sekvence kódující látku popsanou v odstavci f) nebo g) za středně přísných podmínek a která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR nebo

j) sole nebo funkčního derivátu látky popsané v odstavci f), g), h) nebo i), která vykazuje biologickou aktivitu IFNAR.

16. Molekula podle nároku 1, která se používá jako medikament.

17. Použití podle nároku 15, kde uvedený komplex obsahuje nekovalentní komplex uvedeného IFN typu I a uvedený IFNAR.

18. Použití podle nároku 16, kde uvedený IFN typu I a uvedený IFNAR se aplikovaly odděleně a uvedený komplex se vytvořil *in vivo*.

19. Použití podle nároku 15, kde uvedený komplex obsahuje komplex, ve kterém uvedený IFN typu I se váže na uvedený IFNAR kovalentní vazbou.

20. Použití podle nároku 15, kde uvedený komplex obsahuje fúzní protein, ve kterém uvedený IFN typu I se váže na uvedený IFNAR peptidovou vazbou.

21. Použití podle nároku 20, kde uvedený IFN typ 1 je spojen s uvedeným IFNAR pomocí peptidového linkeru.

22. Použití podle nároku 15, kde uvedený IFN typ I je IFN α , IFN β nebo IFN ω .

23 Použití podle nároku 22, kde uvedený IFN typu I je IFN β .

24. Použití podle nároku 15, kde uvedený IFNAR je beta podjednotka receptoru lidského interferonu α/β (IFNAR2).

20.11.00

2000-2287

1/17

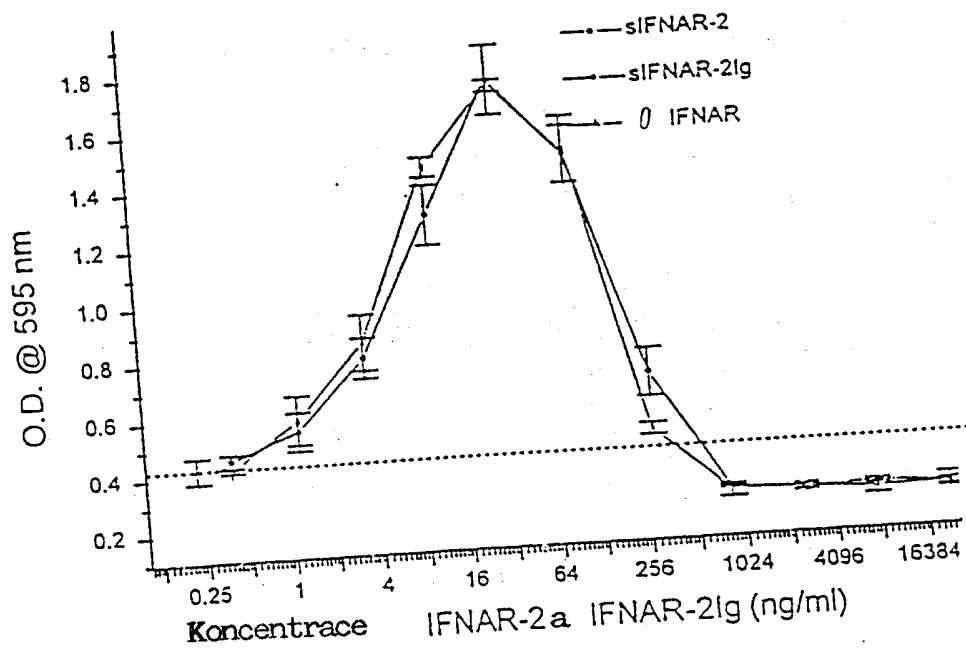


Fig. 1

22.11.00

2000-2297

2/17

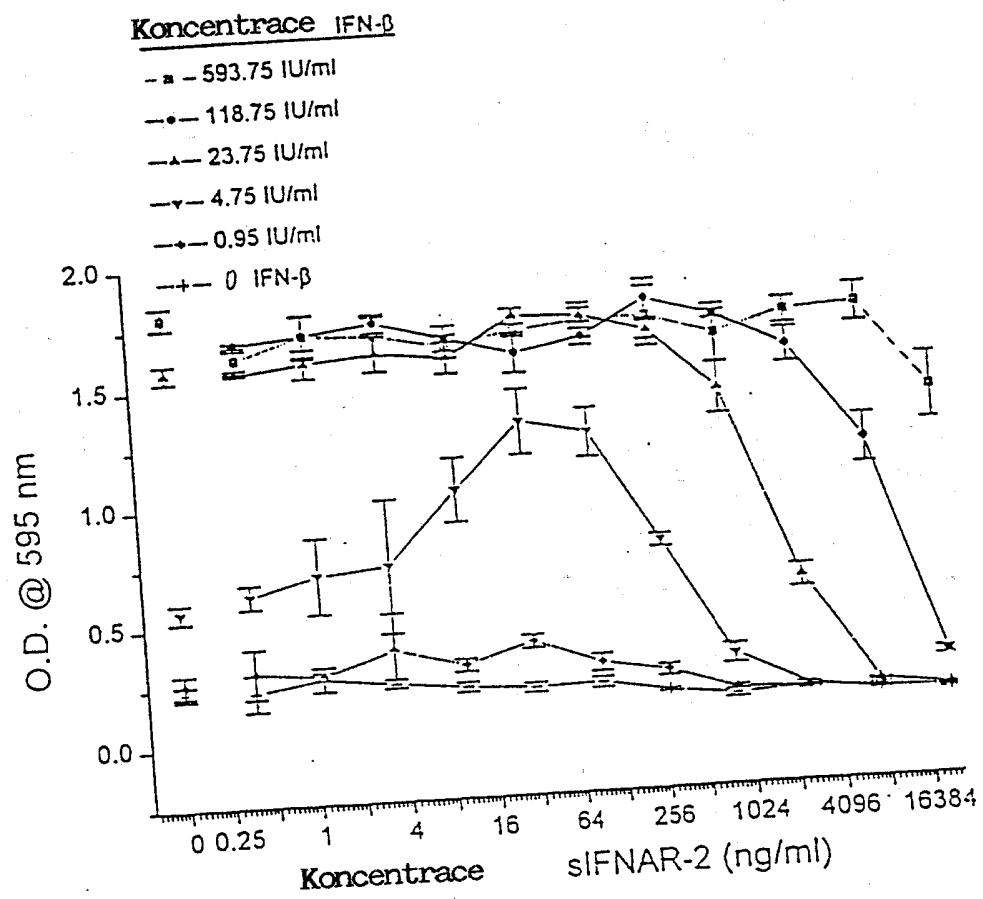


Fig. 2

22.11.00

2000-2287

8/17

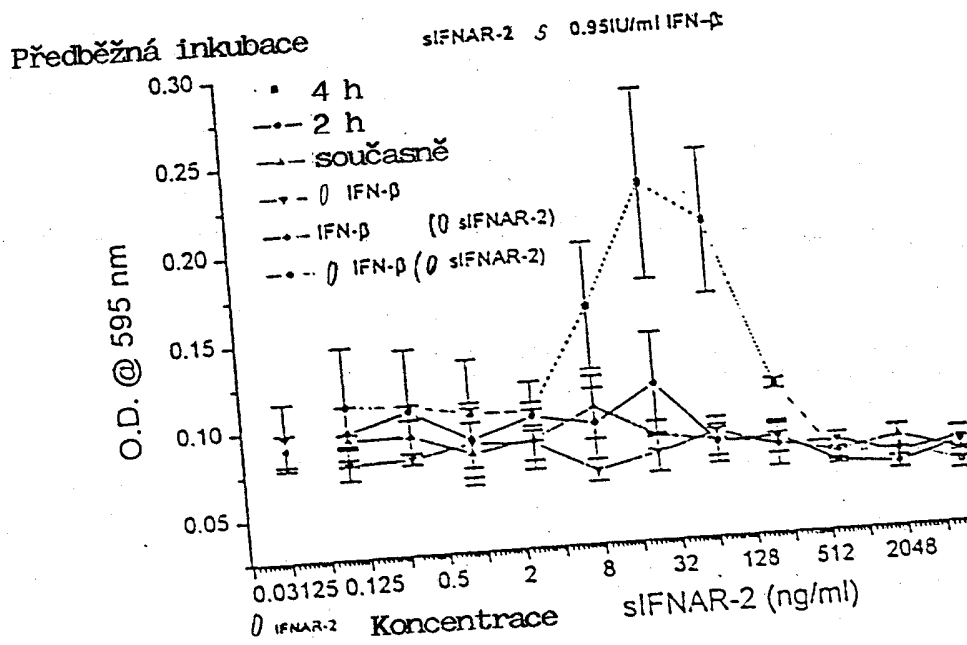


Fig. 3

20.11.00

2000-2287

4/17

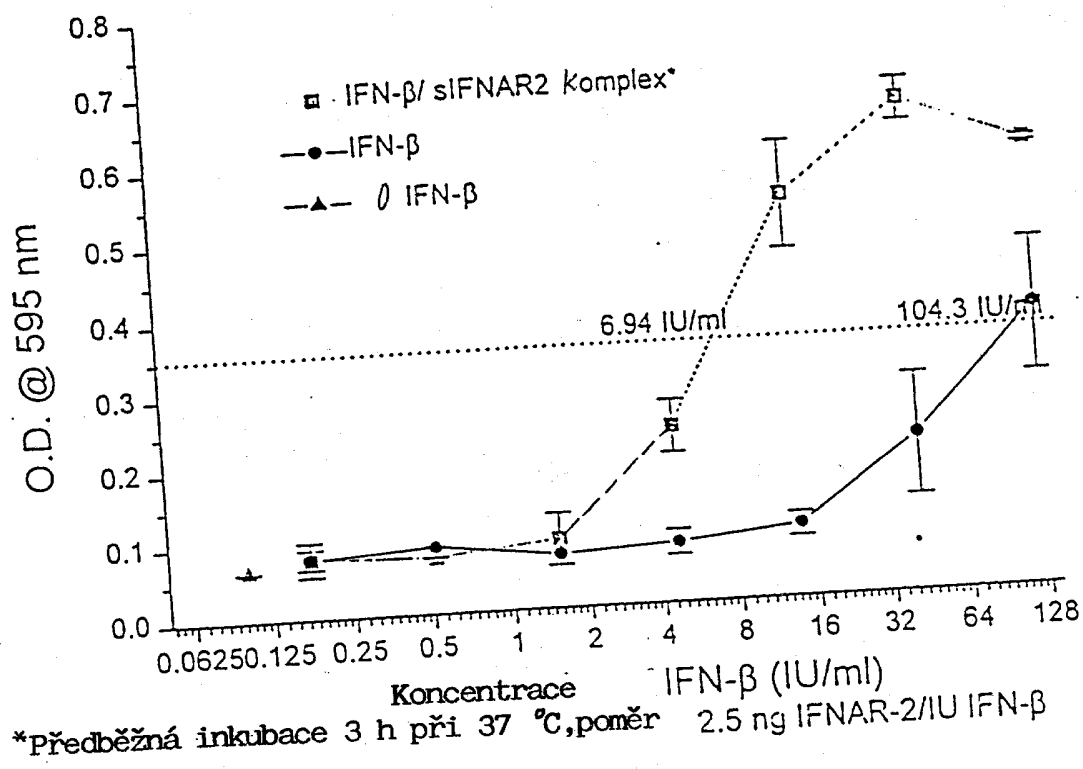


Fig. 4

22.11.00

2000-2287

5/17

Předběžná inkubace IFN- β 4 h při 37°C s
2.5 ng protein/1U IFN- β

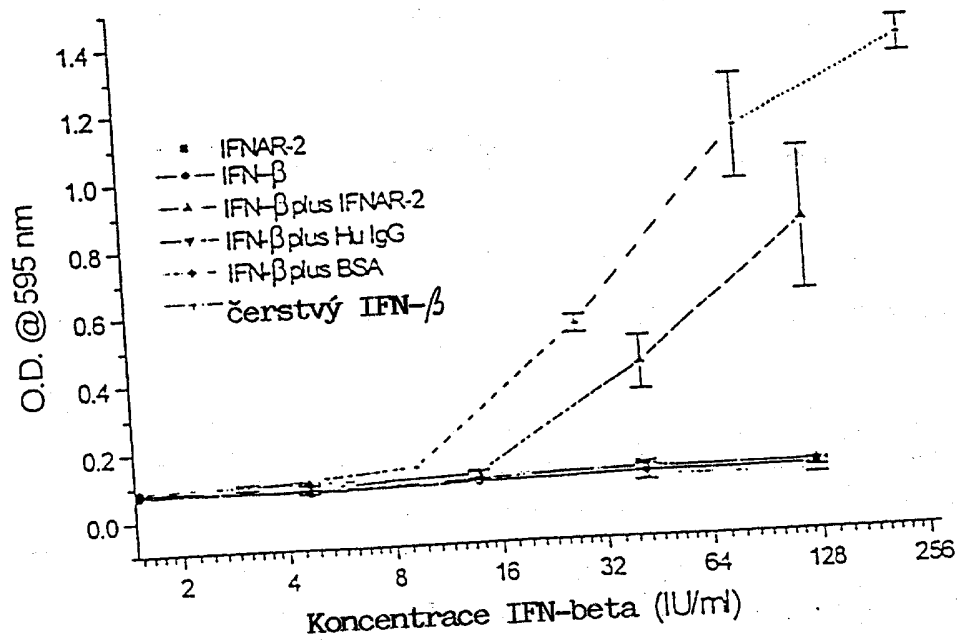


Fig. 5

22.11.00

2000-2287

6/17

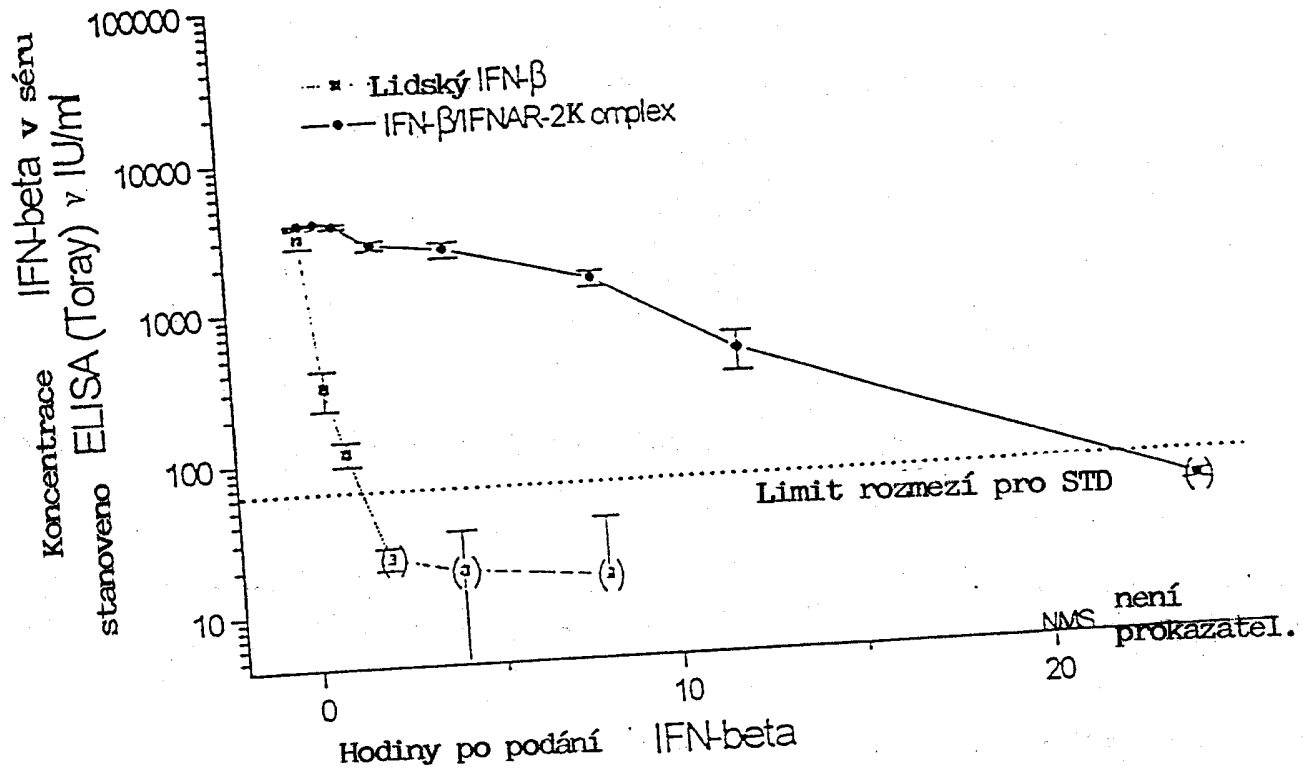


Fig. 6

22.11.00

7/17

2000-2287

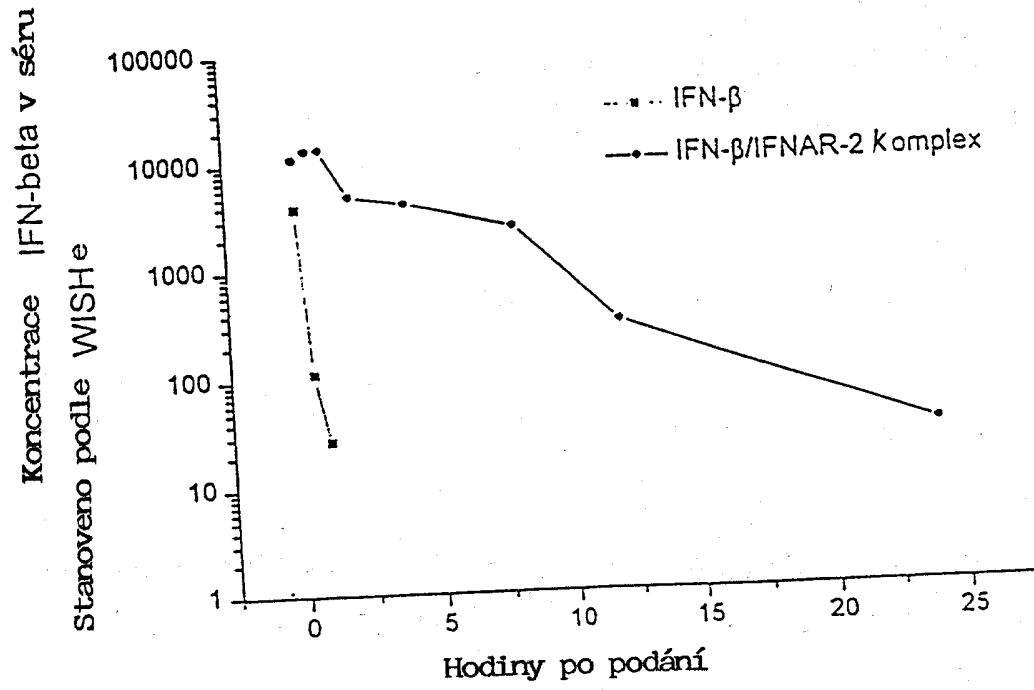


Fig. 7

22.11.00

8/17

2000-2287

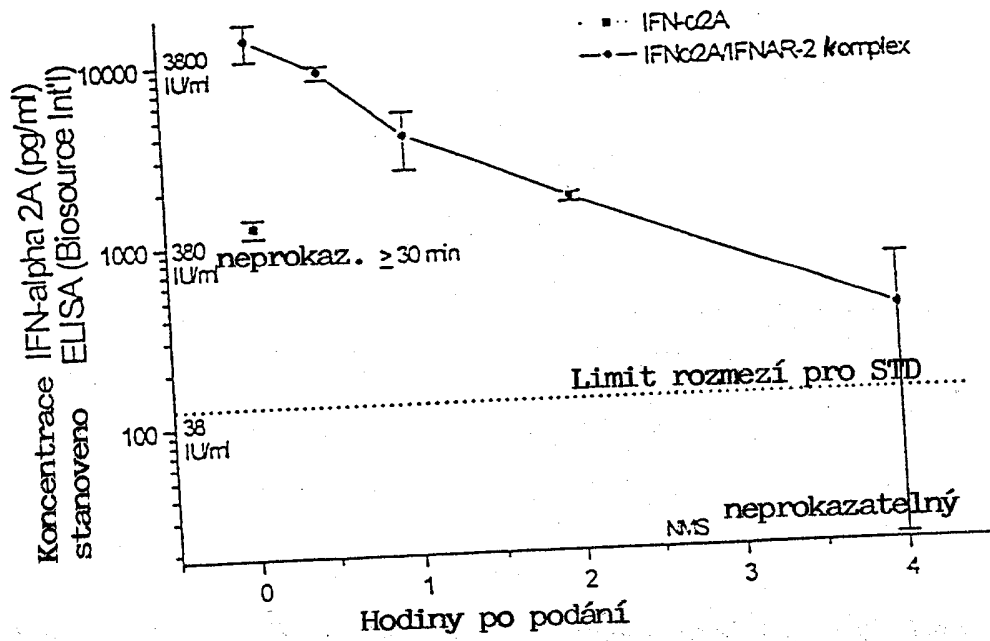


Fig. 8

22.11.00

9/17

2000-2297

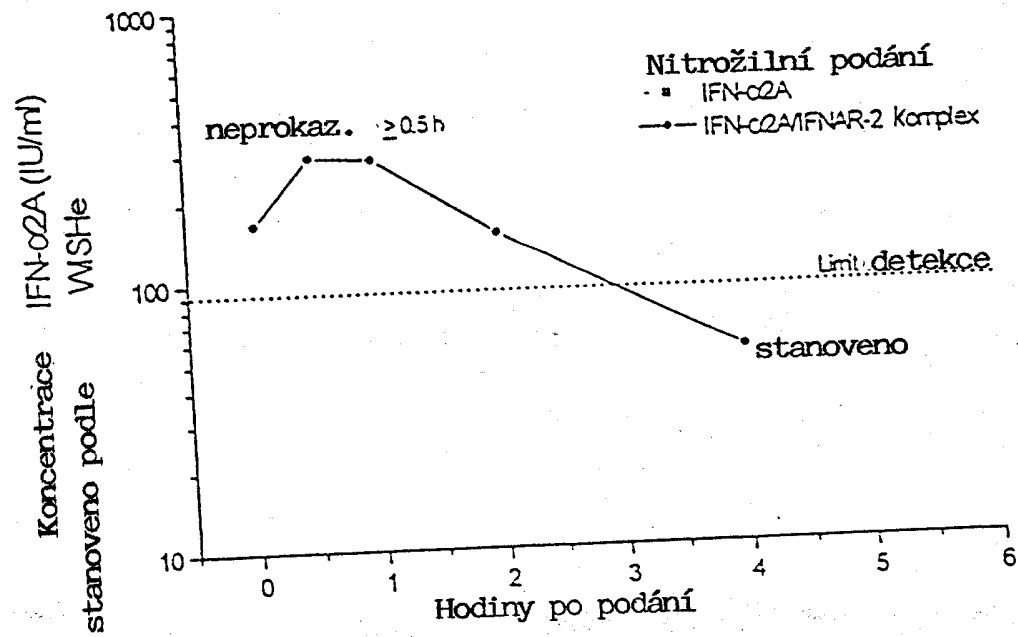


Fig. 9

22.11.00

10/17

2000-2287

-29 Signální peptid 1 hIFNAR2
 MLLSQNAFIV RSLNLVLMVY ISLVFGISYD SPDYTDESCCT
 FKISLRNFRS
 22
 ILSWELKNHS IVPHTHYTLLY TIMSKPEDLK VVKNCANTTR
 SFCDLTDEWR
 72
 STHEAYVTVL EGFSGNTTLF SCSHNFWLAI DMSFEPPEFE
 IVGFTNHINV
 122
 MVKFPSIVEE ELQFDLSLVI EEQSEGIVKK HKPEIKGNMS
 GNFTYIIDKL
 172 210/211 GS linker
 IPNTNYCVSV YLEHSDEQAV IKSPLKCTLL PPGQESEFSG
 GGGSGGGGSM
 221 hIFN β
 SYNLLGFLQR SSNFQCQKLL WQLNGRLEYC LKDRMNFDP
 EEIKQLQQFQ
 272
 KEDAALTIYE MLQNIFAIFR QDSSSTGWNE TIVENLLANV
 YHQINHLKTV
 322
 LEEKLEKEDF TRGKLMSSLH LKRYYGRILH YLKAKEYSHC
 AWTIVRVEIL
 372 386
 RNFYFINRLT GYLRN

Aminokyseliny: -29.-1, signální sekvence
 +1-210, lidský IFNAR2
 211-220, 2X Gly4Ser linker
 221-386, lidský IFN β

22.11.00

11/17

2000-2287

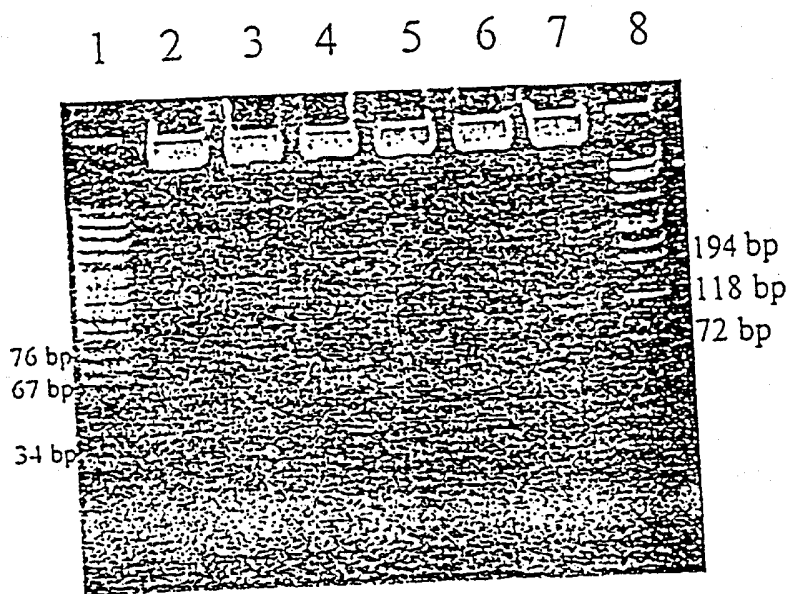


Fig. 11

22:11:00

12/17

2000-2287

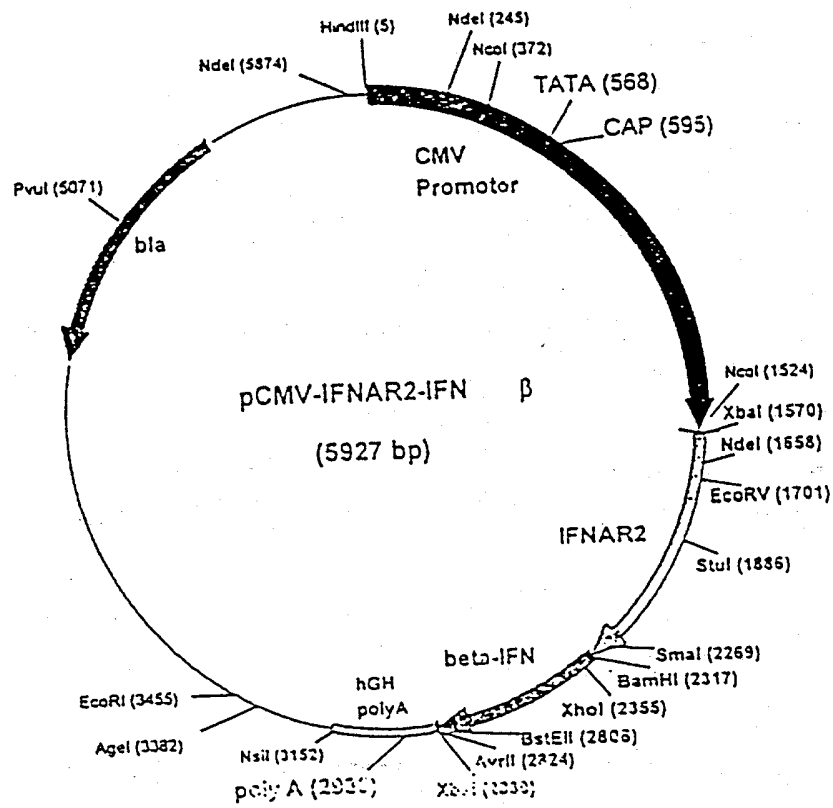


Fig. 12

22.11.00

13/17

2000-2287

k jednotky

78→

49→

28→

19→

1 2 3 4 5 6 7 8 9

Fig. 13.

22.11.00

14/17

2000-2287

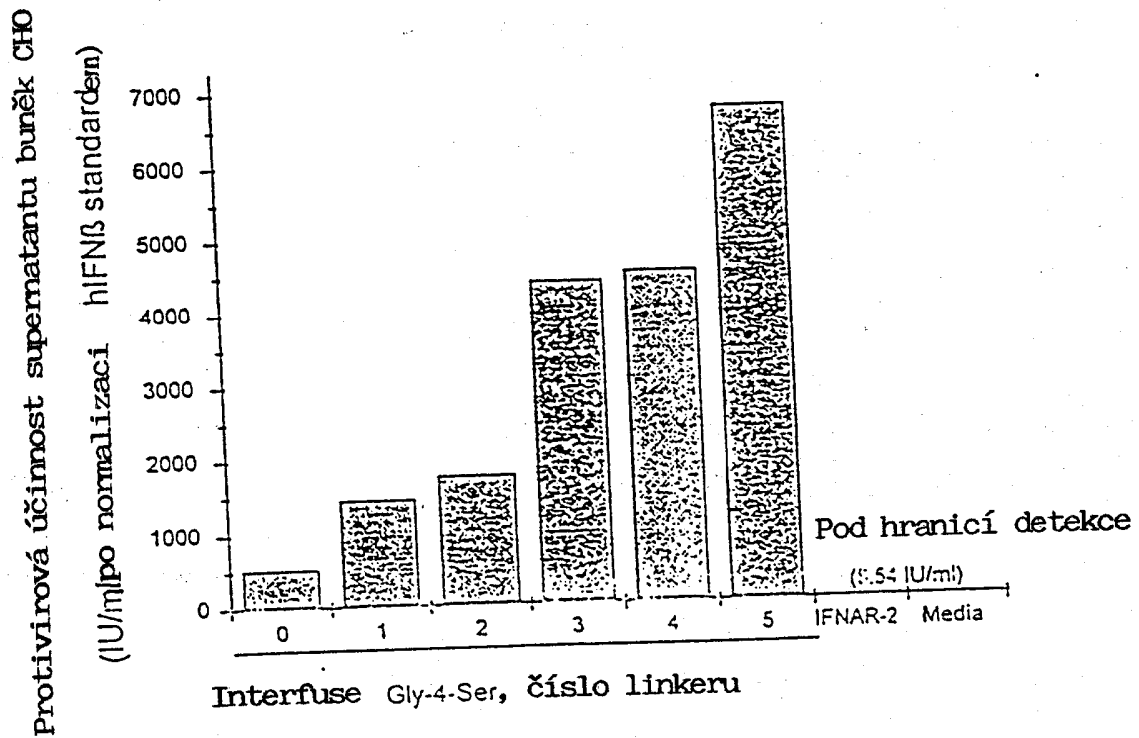


Fig. 14

22.11.00

15/11

2000-2287

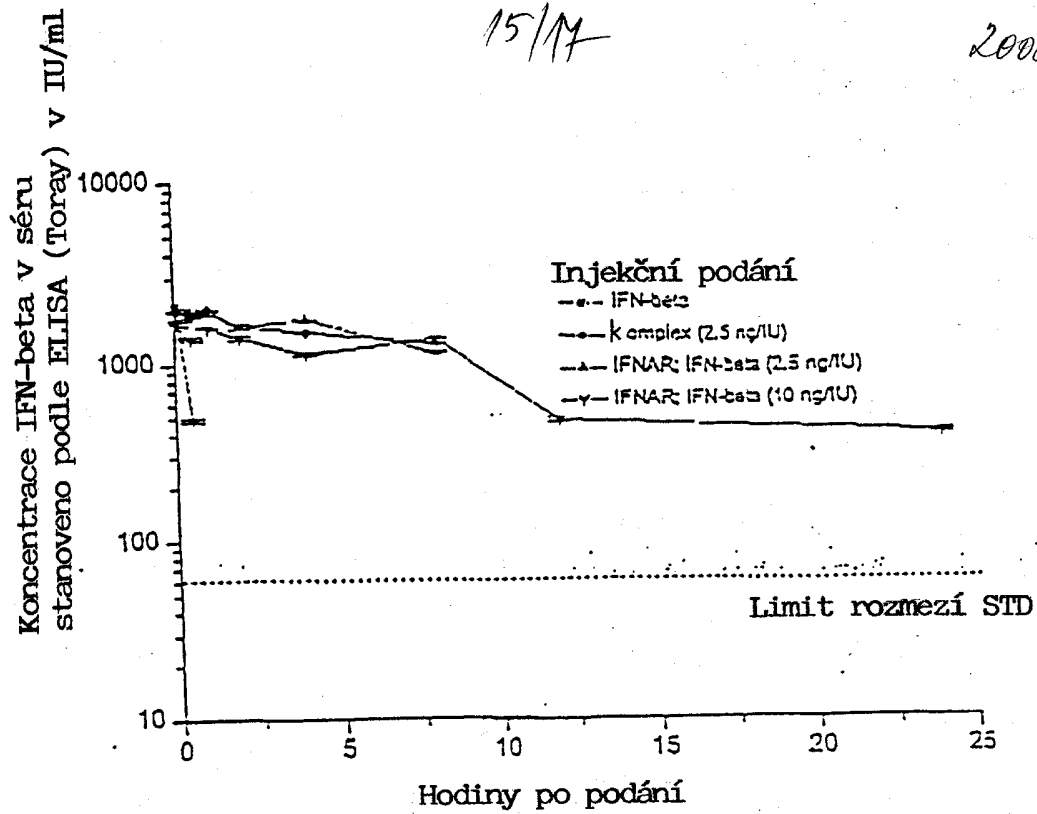


Fig. 15A

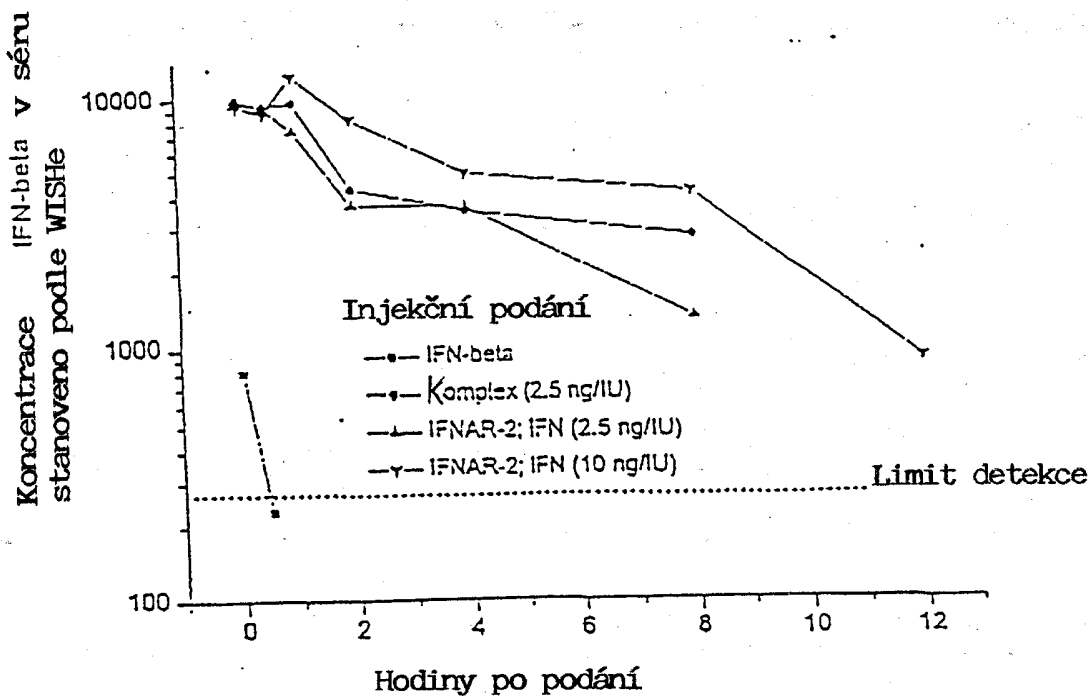


Fig. 15B

16/17

22.11.00

2000-2287

YAC-1 cfile

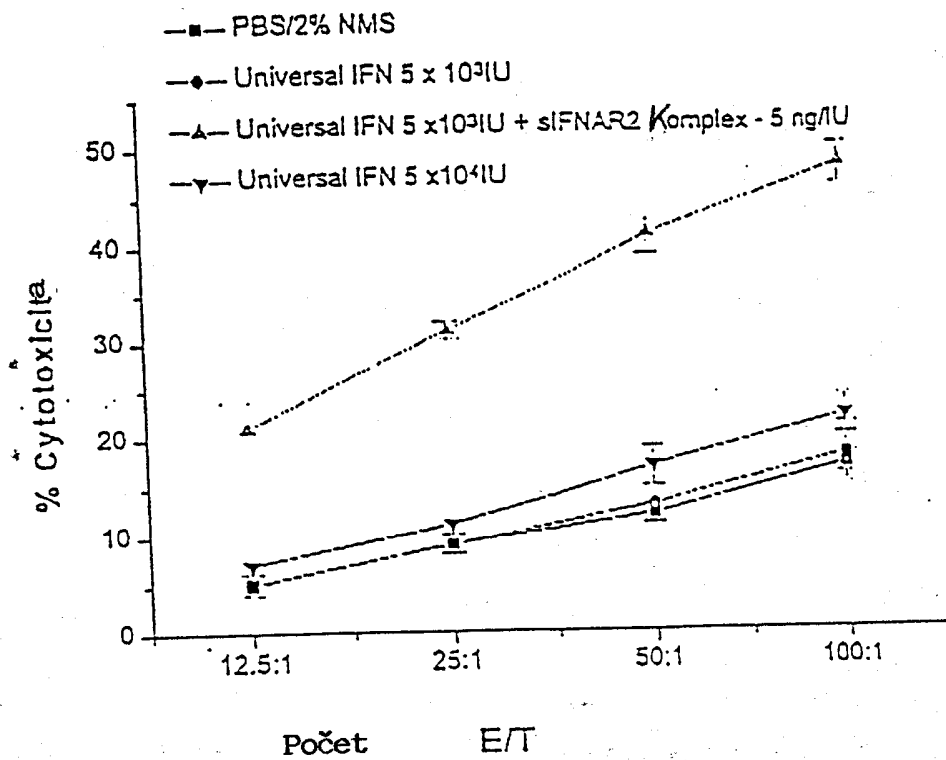


Fig. 16

22.11.00

17/17

2000-2287

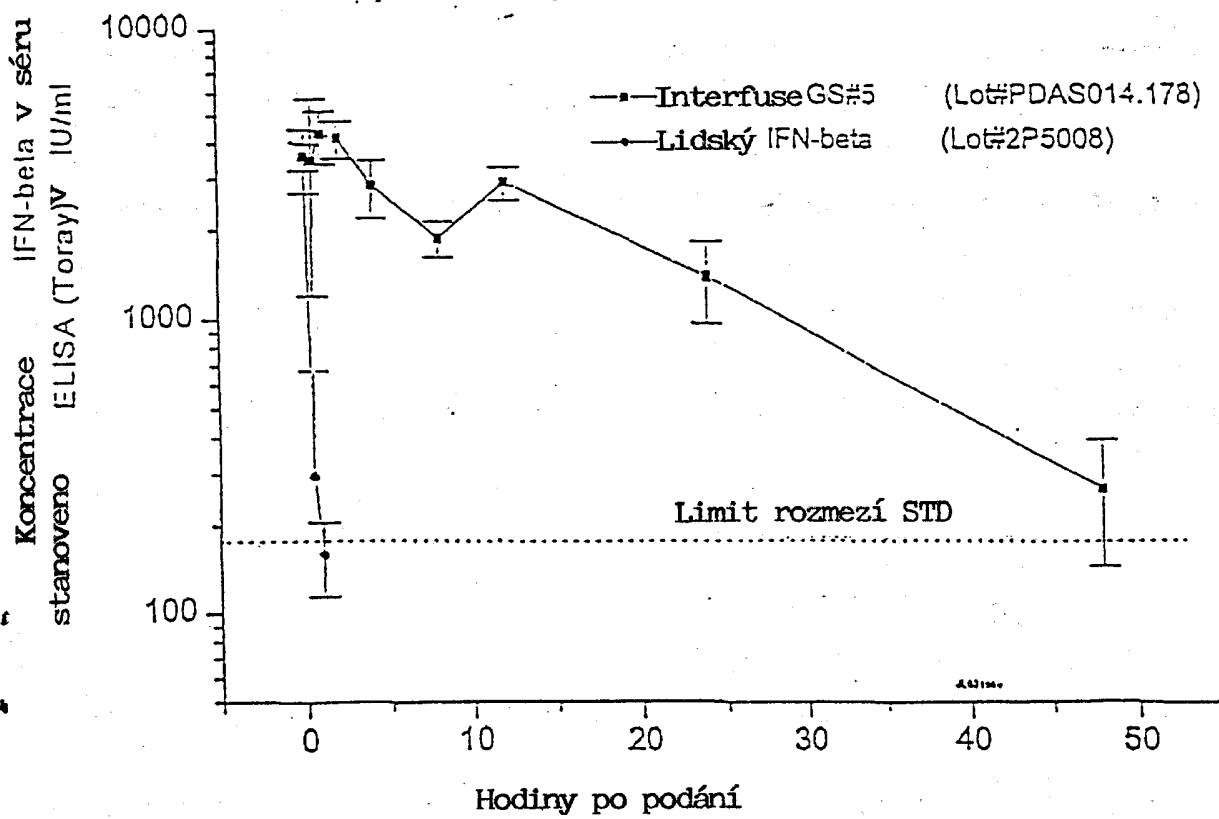


Fig. 17