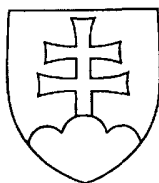


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287491

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2010):

C07K 14/435

C12N 15/62

C07K 19/00

- (21) Číslo prihlášky: **510-2001**
(22) Dátum podania prihlášky: **15. 10. 1999**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **8. 11. 2010**
Vestník ÚPV SR č.: **11/2010**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/104 491 60/120 237**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **16. 10. 1998 16. 2. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 3. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **3/2003**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **2. 11. 2010**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US99/24200**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/23472**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(73) Majiteľ: **Biogen Idec MA Inc., Cambridge, MA, US;**

(72) Pôvodca: **Whitty Adrian, Hopkinton, MA, US;**
Runkel Laura, Cambridge, MA, US;
Brickelmaier Margot, Boxford, MA, US;
Hochman Paula, Newton, MA, US;

(74) Zástupca: **Dagmar Čechvalová, Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Fúzne proteíny interferónu-beta-1a a ich použitie**

(57) Anotácia:
Je opísaný polypeptid obsahujúci mutant interferónu-beta-1a (IFN- β) a kľbovú oblasť, doménu CH2 a doménu CH3 imunoglobulínu, spôsob jeho výroby a jeho farmaceutické použitie na liečenie alebo prevenciu zápalového, autoimúnneho, angiogenetického, nádorového alebo vírusového ochorenia.

SK 287491 B6

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka fúzneho polypeptidu, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu X-Y-Z alebo aspoň jej časť, sekvencia obsahuje aminokyselinovú sekvenciu glykozylovaného interferónu-beta (X), pričom Y je voliteľná spojovacia časť a Z je polypeptid obsahujúci aspoň časť polypeptidu iného, než je glykozylovaný interferón-beta. Výhodne je X ľudský interferón-beta-1a. Vynález sa tiež týka mutantov interferónu-beta-1a.

Doterajší stav techniky

Použitie polypeptidov a proteínov na systémové liečenie špecifických ochorení je teraz bežne prijímanou lekárskou praxou. Úloha, akú hrajú látky tohto typu v terapii, je taká dôležitá, že mnohé výskumy sú zamerané na syntézu veľkého množstva týchto látok technológiou rekombinantnej DNA. Mnohé z týchto molekúl sú endogénne molekuly, ktoré sú veľmi účinné a špecifické vo svojom biologickom účinku.

Hlavným faktorom, ktorý obmedzuje užitočnosť látok proteínového charakteru na ich zamýšľané aplikácie, je to, že pri parentálnom podávaní sú z tela za veľmi krátky čas eliminované. K tomu dochádza preto, že sú metabolizované proteázami, lebo sa na ich eliminácii podieľa bežná clearancia metabolickými cestami eliminácie proteínov, ako je napr. filtrácia v obličkách. Problémy spojené s uvedenými spôsobmi podávania proteínov sú vo farmaceutickom priemysle dobre známe a boli preto použité rôzne stratégie, ako ich riešiť.

Peptidová rodina, ktorá je cieľom klinického výskumu a mnohých snáh o zlepšenie podávania a biostimulácie, je rodina interferónov. Interferóny boli testované pri mnohých ochoreniach. Použitie humánneho interferónu beta, jedného člena tejto rodiny, je už zavedené na liečenie roztrúsenej mozgovo-miechovej sklerózy (*sclerosis multiplex*). Dve formy rekombinantného interferónu beta boli povolené v Európe a v USA na liečenie tejto choroby. Jedna forma je interferón-beta-1a (ochranná známka AVONEX[®], výrobca Biogen, Inc., Cambridge, MA). Termíny „interferón-beta-1a“ alebo „INF-beta-1a alebo INF-β-1a“ alebo „interferón-β-1a“ sú v opise vynálezu používané celkom zameniteľne. Inou formou je interferón-beta-1b (ochranná známka BETASERON[®], Berlex, Richmond, CA), ďalej označovaný ako „interferón-beta-1b“. Interferón beta-1a je produkovaný v cicavčích bunkách pomocou prirodzenej sekvencie ľudského génu a je glykozylovaný, zatiaľ čo interferón beta-1b je produkovaný v bunkách *E. coli* pomocou modifikovanej sekvencie ľudského génu, ktorý obsahuje substitúciu, kde cysteín je nahradený serínom v pozícii 17 a nie je glykozylovaný.

Už skôr bola priamym spôsobom porovnaná relatívna aktivita *in vitro* interferónu beta-1a a interferónu beta-1b vo funkčnom teste a bolo ukázané, že špecifická aktivita interferónu beta-1a je približne 10x vyššia než špecifická aktivita interferónu beta-1b (Runkel et al., 1998, Pharm. Res. 15: 641-649). V štúdiách, ktorých cieľom bolo zistiť štrukturálne príčiny rozdielných aktivít, bola identifikovaná glykozylácia ako jediný známy štrukturálny rozdiel medzi uvedenými dvoma produktmi, ktorý ovplyvňuje špecifickú aktivitu. Vplyv sacharidov sa prejavoval najmä účinkom na stabilizáciu štruktúry. Stabilizujúci účinok sacharidov na štruktúru bol evidentný pri experimentoch s tepelnou denaturáciou a v analýze SEC. Neprítomnosť glykozylácie tiež korelovala so zvýšenou agregáciou a zvýšenou citlivosťou na tepelnú denaturáciu. Enzymatické odstránenie sacharidov z interferónu beta-1a pomocou PNGázy F viedlo k extenzívnej precipitácii deglykozylovaného produktu.

Tieto štúdie ukazujú, že aj napriek konzervatívnej aminokyselinovej sekvenci interferónu beta-1a a interferónu beta-1b ide o odlišné biochemické jednotky a väčšina poznatkov o interferóne beta-1b nemôže byť aplikovaná na interferón beta-1a a naopak.

Podstata vynálezu

Vynález využíva výhody glykozylovaného interferónu-beta v porovnaní s neglykozylovanou formou. Najmä bola vyvinutá kompozícia obsahujúca interferón-beta-1a so zvýšenou aktivitou vzhľadom na interferón beta-1b, ktorý má tiež užitočné vlastnosti fúzneho proteínu všeobecne bez toho, aby došlo k strate aktivity v porovnaní s formami interferónu beta-1a, ktoré nie sú vo forme fúzneho proteínu. Teda boli uskutočnené také modifikácie, že produkty (t. j. fúzne proteíny interferónu-beta-1a) si uchovávajú celú alebo väčšinu svojej biologickej aktivity a pritom boli dosiahnuté nasledujúce vlastnosti: zmenená farmakokinetika a farmakodynamika vedúca k dlhšiemu biologickému polčasu a zmenám tkanivovej distribúcie (napr. schopnosť zostať dlhší čas v cievach). Takáto kompozícia predstavuje podstatný pokrok v odbore medicíny a farmácie a bola by významným príspevkom na liečenie ochorení, kde interferón preukázal svoju užitočnosť, ako je napr. skleróza multiplex, fibróza a ďalšie zápalové a autoimunitné ochorenia, rôzne druhy rakovín, hepatitída a ďalšie vírusové ochorenia a ochorenia charakterizované neovaskularizáciou. Najmä schopnosť zostať

dlhší čas v cievnom systéme umožňuje, aby bol interferón-beta 1a použitý na inhibíciu angiogenézy a potenciálne tiež na prestúpenie hematoencefalickej bariéry.

Predkladaný vynález sa najmä týka izolovaného polypeptidu, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu X-Y-Z, kde X je polypeptid majúci aminokyselinovú sekvenciu, alebo aspoň jej časť, zodpovedajúca aminokyselinovému interferónu-beta, Y je voliteľná spojovacia časť a Z je polypeptid obsahujúci aspoň časť polypeptidu iného než je interferón-beta. Voliteľná časť (skupina) Y a nutná časť Z sú naviazané buď na N- alebo C-koniec interferónu-beta (X). Výhodný je X ľudský interferón-beta-1a.

Vo výhodných uskutočneniach Z je aspoň časť konštantného úseku imunoglobulínu a môže pochádzať z imunoglobulínu vybraného z triedy IgM, IgG, IgA a IgE. Pokiaľ je imunoglobulín z triedy IgG, potom ide o jeden z IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4. Konštantný úsek ľudského IgM a IgE obsahuje 4 konštantné úseky a sice CH1 (klb), CH2, CH3 a CH4, zatiaľ čo konštantný úsek ľudského IgG, IgA a IgD obsahuje len 3 konštantné úseky a sice CH1 (klb), CH2 a CH3. V najvýhodnejšom fúznom proteíne podľa vynálezu obsahuje konštantný úsek aspoň úsek klbu a domény CH2 a CH3.

V inom uskutočnení je časť Z aspoň časť polypeptidu, ktorý obsahuje domény podobné imunoglobulínu. K príkladom takýchto polypeptidov patrí CD1, CD2, CD4 a členovia hlavných histokompatibilných antigénov I. a II. triedy.

Ďalším uskutočnením vynálezu je fúzny proteín majúci amino-koncový úsek, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu interferónu-beta alebo jej časť a karboxy-koncový úsek, ktorý obsahuje aspoň časť proteínu, iného než je interferón-beta. Karboxy-koncový úsek je výhodný aspoň časťou konštantného úseku imunoglobulínu pochádzajúceho z triedy imunoglobulínov IgM, IgG, IgD, IgA alebo IgE. V najvýhodnejšom fúznom proteíne konštantný úsek obsahuje aspoň klbový úsek a domény CH2 a CH3.

Ďalším uskutočnením vynálezu je fúzny proteín, ktorého interferón-beta časť (t. j. X v uvedenom vzorci) bola mutovaná, čím vznikli muteíny so selektívne zvýšenou antivírusovou a/alebo antiproliferačnou aktivitou alebo s inými výhodnými vlastnosťami v porovnaní s nemutovanými formami interferónu-beta-1a.

Ešte ďalším uskutočnením predkladaného vynálezu je izolovaná DNA kódujúca fúzny proteín opísaný skôr. Vynález sa týka tiež rekombinantnej DNA, ktorá obsahuje izolovanú DNA kódujúcu opísaný fúzny proteín a expresnú kontrolnú sekvenciu (t. j. sekvenciu riadiacu expresiu), kde expresná kontrolná sekvencia je operatívne spojená s DNA. Vynález zahŕňa tiež hostiteľské bunky transformované rekombinantnou DNA podľa vynálezu.

Predkladaný vynález sa ďalej týka spôsobu prípravy rekombinantného polypeptidu, ktorý spočíva v tom, že sa poskytne populácia hostiteľských buniek podľa vynálezu, táto populácia hostiteľských buniek sa kultivuje v podmienkach, kde je exprimovaný polypeptid kódovaný rekombinantnou DNA a nakoniec sa tento rekombinantný polypeptid izoluje.

Ďalší aspekt vynálezu sa týka fúzneho proteínu interferónu-beta-1a, ktorý obsahuje interferón-beta-1a a ďalší polypeptid, s ktorým nie je v prírode asociovaný, v podstate čistej forme, pričom fúzny proteín (skrátene fúzia) má antivírusovú aktivitu, ktorá je približná s antivírusovou aktivitou interferónu-beta-1a postrádajúceho ďalší polypeptid.

Ďalším aspektom predkladaného vynálezu je farmaceutická kompozícia obsahujúca terapeuticky účinné množstvo fúzneho proteínu interferónu-beta-1a.

Ešte ďalší aspekt vynálezu sa týka inhibície angiogenézy a neovaskularizácie použitím polypeptidov podľa vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

45

Obr. 1. cDNA sekvencia a dedukovaná aminokyselinová sekvencia fúzie interferónu-beta s histidínovou značkou (tiež označované ako „his INF-beta“ alebo „His₆-značený“ (6x His opísaný ako SEQ ID NO: 63))

Na obrázku sú uvedené úplná DNA sekvencia (SEQ ID NO: 3) a proteínová sekvencia (SEQ ID NO: 4) histidínom značeného IFN-beta-1a. Štiepená signálna sekvencia VCAM-1 zanechá 3 zvyšky amino-konca (SerGlyGly) „upstream“ od histidínovej značky (His₆ (SEQ ID NO: 63), pozícia 4 až 9). Sekvencia enterokinázovej spojky (linkera) (AspAspAspAspLys) (SEQ ID NO: 62) je od histidínovej značky oddelená oddeľujúcou sekvenciou (spacerom) (SerSerGly, pozície 10 až 12). Prírodná sekvencia proteínu IFN-beta-1a predstavuje sekvenciu Met18 až Asn183.

55

Obr. 2. cDNA sekvencia a dedukovaná aminokyselinová sekvencia fúzie interferónu-beta-1a/Fc

Na obrázku sú uvedené úplná DNA sekvencia (SEQ ID NO: 1) a proteínová sekvencia (SEQ ID NO: 2) fúzie „ľudský IFN-beta-1a/myš Fc“. Sekvencia ľudského IFN-beta-1a proteínu predstavuje zvyšky 1 až 166 (pozície DNA sekvencií 1 až 498). Sekvencia enterokinázovej spojky (linkera) (AspAspAspAspLys) zaujíma aminokyselinové zvyšky 167 až 171 (pozície DNA sekvencií 499 až 513). Sekvencia ťažkého reťazca myšieho IgG2a zaujíma aminokyselinové zvyšky 172 až 399 (pozícia DNA sekvencie 514 až 437).

Obr. 3. Vázba mutantov interferónu-beta so substituovaným alanínom na dimérny fúzny proteín obsahujúci extracelulárnu doménu receptora interferónu typu I, IFNAR2/Fc

Väzbové afinity alanínom substituovaných mutantov IFN (A1 až E) na receptor IFNAR2 boli stanovené postupom, ako je opísané v príklade 1 (časť D). Histogram predstavuje väzobné afinity v teste v porovnaní s väzobnými afinitami divého typu his-IFN-beta (v % d. t., divého typu). Hodnoty % d. t. boli vypočítané nasledovne: (afinita divého typu his-IFN-beta/afinita mutovaného IFN-beta) x 100. Sú uvedené hodnoty % d. t. (O) pre jednotlivé experimenty (n=3) a priemerné hodnoty % d. t. (x) pre experimentálny súbor. Mutanty A2, AB1, AB2 a E neviažu IFNAR2/Fc v koncentrácii 500 x vyššej, ako je EC50 divého typu (d. t.) his-IFN-beta (*).

Obr. 4. Vázba mutantov interferónu-beta-1 so substituovaným alanínom na povrchový komplex receptora interferónu typu I (komplex IFNAR1/2) exprimovaný na bunkách Daudi z Burkittovho lymfómu

Receptorové väzbové vlastnosti mutantov so substituovaným alanínom (A1-E) boli stanovené pomocou väzbového testu na povrchový bunkový receptor založeného na analýze FACS, ako bol opísaný v príklade 1 (časť D). Histogram predstavuje väzbové afinity v teste v porovnaní s väzbovými afinitami divého typu his-IFN-beta (v % d. t., divého typu). Hodnoty % d. t. na každý mutant boli vypočítané nasledovne: (afinita divého typu his-IFN-beta/afinita mutovaného IFN-beta) x 100. Sú uvedené hodnoty % d. t. (O) na jednotlivé experimenty a priemerné hodnoty % d. t. (X) na experimentálny súbor.

Obr. 5. Antivírusové aktivity mutantov interferónu-beta so substituovaným alanínom

Antivírusové aktivity mutantov so substituovaným alanínom (A1-E) boli stanovené na ľudských bunkách A549 infikovaných EMC vírusom ako bolo opísané v príklade 1 (časť E). Histogram predstavuje aktivitu v teste v porovnaní s aktivitou divého typu his-IFN-beta (v % d. t., divého typu). Hodnoty % d. t. pre každý mutant boli vypočítané nasledovne: (koncentrácia divého typu his-IFN-beta (50 % cpe)/koncentrácia mutovaného IFN-beta (50 % cpe) x 100. Sú uvedené hodnoty % d. t. (O) pre viacnásobné pokusy a priemerné hodnoty z pokusného súboru (x).

Obr. 6. Antiproliferačné aktivity mutantov interferónu-beta so substituovaným alanínom

Antiproliferačné aktivity mutantov so substituovaným alanínom (A1-E) boli stanovené na Daudiho bunkách Burkittovho lymfómu, ako bolo opísané v príklade 1 (časť E). Histogram predstavuje aktivity v teste v porovnaní s aktivitou divého typu his-IFN-beta (v % d. t., divého typu). Hodnoty % d. t. pre každý mutant boli vypočítané nasledovne: (koncentrácia divého typu his-IFN-beta (50 % inhibície rastu/ koncentrácia mutovaného IFN-beta (50 % inhibície rastu) x 100. Sú uvedené hodnoty % d. t. (O) na viacnásobné experimenty a priemerné hodnoty % d. t. (x) pre experimentálny súbor.

Obr. 7. Relatívne antivírusové a antiproliferačné aktivity mutantov interferónu-beta so substituovaným alanínom

Relatívne aktivity mutantov so substituovaným alanínom (A1-E) boli porovnané v teste antivírusovej (os x) a antiproliferačnej (os y) aktivity. Na toto porovnanie boli použité hodnoty priemerného % divého typu his-IFN-beta (% d. t., x) uvedené na obr. 5 a 6. Mutanty, ktoré vykazujú koordinované zmeny v oboch aktivitách, sa objavujú priamo na vertikálnej línii alebo v jej blízkosti. Mutanty vykazujúce stratu/prírastok antivírusovej aktivity, ktorá nie je úmerná zmene v antiproliferačnej aktivite, sa objavujú výrazne mimo diagonály (DE1, D, C1). Významnosť bola stanovená na základe smerodajných odchýlok príslušných k použitej priemernej hodnote % d. t.

Obr. 8. Antivírusová aktivita fúzie interferónu-beta-1a/Ig

Aktivita interferónu-beta-1a (bol použitý AVONEX^R), lebo fúzia interferón-beta-1a/myši Ig2a v koncentráciách uvedených na osi x boli hodnotené v antivírusovom teste použitím buniek ľudského pľúcneho karcinómu (A549) infikovaných vírusom EMC. Po dvojdennej inkubácii za prítomnosti vírusu boli živé bunky zafarbené MTT a misky boli vyhodnotené na čítacom zariadení pri 450 nm a absorbancia, ktorá je odrazom životnosti buniek je uvedená na osi y. Smerodajné odchýlky sú uvedené ako súvislé úsečky. Koncentrácia interferónu-beta-1a (bol použitý ako surový medziprodukt AVONEX^R), ktorá poskytla 50 % maxima pri 450 nm a teda pri ktorej došlo k 50 % usmrteniu buniek vírusom („50 % cytopatický účinok“) bola 0,4 pM a 50 % cytopatický účinok na fúzovaný interferón-beta-1a bol približne 0,15 pM.

Obr. 9. Meranie antivírusovej aktivity interferónu-beta v plazme myši ošetrovaných fúziou interferónu-beta-1a/Fc alebo interferónom-beta-1a

Myšiam bolo injikované buď 50 000 jednotiek interferónu-beta-1a (surový medziprodukt AVONEX^R), alebo 50 000 jednotiek fúzie interferónu-beta-1a/Fc. Krv z týchto zvierat sa získala retroorbitálnym odberom v rôznych časoch po injekcii, ako ukazuje os x. Na každý časový bod bola odobraná krv aspoň z troch myši,

bola pripravená plazma a zamrazená až do stanovenia aktivity interferónu-beta v antivírusovom teste s bunkami ľudského pľúcneho karcinómu (A549) po infekcii vírusom encefalomyokarditídy. Živé bunky sa zafarbili roztokom MTT, doštičky sa potom zmerali pri 450 nm na stanovenie absorbancie, ktorá je odrazom životnosti buniek a aktivity interferónu-beta. Na každej doštičke sa tiež pripravili štandardné (kalibračné) krivky použitím interferónu-beta-1a ako AVONEX^R a použili sa na kvantitatívne stanovenie aktivity interferónu-beta v každej vzorke. Na grafe sú zobrazené dáta jednotlivých zvierat.

Obr. 10. Úplná sekvencia a proteínová sekvencia otvorených čítacích rámcov priamej fúzie ľudského IFN-beta a ľudského IgG1Fc (ZL5107).

Obr. 11. Úplná DNA sekvencia a proteínová sekvencia otvoreného čítacieho rámca fúzneho proteínu „ľudský IFN-beta/G4S linker/ľudský IgG1Fc (ZL6206).

Obr. 12. Schematické znázornenie celkovej klonovacej a expresnej stratégie.

Úplná odborná literatúra citovaná v opise je formou odkazu zahrnutá do opisu, pokiaľ nie je uvedené inak.

V opise vynálezu sú používané nasledujúce termíny:

I. Definície

„Interferón“ (skrátene označovaný ako IFN) je malý, druhovo špecifický, jednoreťazcový polypeptid, ktorý sa tvorí v bunkách cicavcov ako reakcia na expozíciu rôznych induktorov, ako sú napr. vírusy, polypeptidy, mitogény a pod. Najvýhodnejší interferón podľa vynálezu je glykozylovaný ľudský interferón-beta, ktorý je glykozylovaný na 80. zvyšku (Asn80) a výhodne je pripravený technikami rekombinantnej DNA. Výhodný glykozylovaný interferón je označovaný „interferón beta-1a“ (alebo tiež „IFN-beta-1a“, „IFN-β-1a“, „interferón beta 1a“ alebo „interferón-β-1a“, pričom všetky uvedené názvy sú používané zameniteľne). Termín „interferón-beta-1a“ podľa vynálezu zahŕňa aj mutované formy interferónu (pozri príklad 1) za predpokladu, že aj tieto mutanty sú glykozylované na 80. zvyšku (Asn80). Metódy prípravy proteínov technikami rekombinantnej DNA sú známe vrátane prípravy rôznych interferónov pozri napr. patenty US č. 4 399 216, 5 149 636 a 5 179 017 (Axel et al.) a 4 470 461 (Kaufman).

Výhodné interferón-beta-1a polynukleotidy, ktoré možno použiť podľa predkladaného vynálezu, boli odvodené zo sekvencií interferónu divého typu rôznych stavovcov výhodne cicavcov a boli získané metódami, ktoré sú odborníkovi známe a boli opísané, pozri napr. patent US 5 641 656 (udelený 24. júna 1997, DNA kódujúci vtáčí interferónový pro-proteín typu I a zrelý vtáčí interferón typu I), patent US 5 605 688 (25. februára 1997 - rekombinantné psie a konské interferóny typu I), patent US 5 231 176 (27. júla 1993, DNA molekula kódujúca ľudský leukocytárny interferón), patent US 5 071 761 (10. decembra 1991, DNA sekvencia kódujúca subsekvencie ľudských lymfoblastoidných interferónov LyIFN-alfa-2 a LyIFN-alfa-3), patent US 4 970 161 (13. novembra 1990, DNA sekvencia kódujúca ľudský interferón gama). Patent US 4 738 931 (19. apríla 1988, DNA sekvencia obsahujúca gén ľudského interferónu beta), patent US 4 695 543 (22. septembra 1987, ľudský gén alfa-interferónu Gx-1) a US 4 456 748 (26. júna 1984, DNA sekvencia kódujúca subsekvenciu rôznych prirodzene sa vyskytujúcich leukocytových interferónov).

Vo vynáleze sa môžu použiť tiež mutanty interferónu-beta-1a. Mutácie sa pripravujú v odbore známymi metódami cielenej mutagenézy. Okrem toho vynález poskytuje funkčne ekvivalentné polynukleotidy interferónu-beta-1a, ktoré kódujú funkčne ekvivalentné polypeptidy interferónu-beta-1a.

Prvý polynukleotid interferónu-beta-1a je „funkčne ekvivalentný“ v porovnaní s druhým polynukleotidom interferónu-beta-1a, pokiaľ spĺňa aspoň jednu z nasledujúcich podmienok:

- a) „funkčne ekvivalentný“ je prvý polynukleotid, ktorý hybridizuje s druhým polynukleotidom za štandardných hybridizačných podmienok a/alebo je degenerovanou sekvenciou vzhľadom na sekvenciu druhého polynukleotidu, najvýhodnejšie kóduje mutant interferónu majúci (terapeutickú) aktivitu interferónu-beta-1a,
- b) „funkčne ekvivalentný“ je prvý polynukleotid, ktorý kóduje expresiu aminokyselinovej sekvencie kódovanej druhým polynukleotidom.

Možno zhrnúť, že všeobecný termín „interferón“ zahŕňa, ale nie je obmedzený iba na ne, všetky agensy uvedené v predchádzajúcom texte a tiež ich funkčné ekvivalenty. Termín „funkčný ekvivalent“ v opise vynálezu sa týka proteínu interferónu-beta-1a alebo polynukleotidu kódujúceho interferón-beta-1a, ktorý má rovnaký alebo lepší prospešný účinok na cicavčieho príjemcu ako pôvodný interferón, na ktorý sa funkčný ekvivalent vzťahuje. Odborníkovi je zrejmé, že funkčne ekvivalentný proteín môže byť pripravený rekombinantnou technikou, t. j. expresiou „funkčne ekvivalentnej“ DNA. Teda predmetom predkladaného vynálezu sú tiež interferóny kódované prirodzene sa vyskytujúcou DNA a tiež kódované DNA, ktorá sa prirodzene nevyskytuje, ale kóduje rovnaký proteín, ako je kódovaný prirodzene sa vyskytujúcou DNA. Vďaka degenerácii nukleotidových kódujúcich sekvencií sa môžu použiť iné polynukleotidy na kódovanie interferónov. K nim patria celé alebo časti uvedených sekvencií, ktoré boli zmenené substitúciou rôznych kodónov, ktoré kódujú rovnaký aminokyselinový zvyšok v sekvencii, ide teda o umlčanú zámenu. Takéto zmenené sekvencie sa

považujú za ekvivalenty týchto sekvencií. Tak napr. Phe (F) je kódovaný dvoma kodónmi a sice TTC alebo TTT, Tyr (T) je kódovaný TAC alebo TAT a His (H) je kódovaný CAC alebo CAT. Na druhej strane Trp (W) je kódovaný jediným kodónom TGG. Teda je jasné, že pre danú sekvenciu DNA kódujúcu konkrétny interferón existuje mnoho degenerovaných DNA sekvencií, ktoré ho kódujú. Tieto degenerované sekvencie sú tiež predmetom predkladaného vynálezu.

„Fúzia“ (tiež fúzny polypeptid alebo fúzny proteín) označuje kolineárne spojenie dvoch alebo viac proteínov alebo ich fragmentov prostredníctvom peptidovej kostry, a to výhodne tak, že sa exprimuje polynukleotidová molekula kódujúca tieto proteíny. K výhodným fúznym proteínom patrí interferón-beta-1a alebo jeho fragment kovalentne spojený s druhou časťou, ktorá je odlišná od interferónu. Špecificky fúzny proteín alebo fúzia „interferón-beta/Ig“ je proteín obsahujúci molekulu interferónu-beta podľa predkladaného vynálezu (t. j. interferónu-beta-1a) alebo jej fragment, ktorej N-koniec alebo C-koniec je naviazaný na N-koniec imunoglobulinového reťazca, pričom časť N-konca imunoglobulínu je nahradená interferónom-beta-1a. Druhom interferón-beta/Ig fúzneho proteínu je fúzny proteín „interferón-beta/Fc“, čo je proteín obsahujúci molekulu interferónu-beta podľa predkladaného vynálezu (t. j. interferón-beta-1a) spojenú s aspoň časťou konštantnej domény imunoglobulínu. Výhodná Fc fúzia obsahuje obsahujúcu molekulu interferónu-beta podľa vynálezu spojenú s fragmentom protilátky obsahujúcim C-koncovú doménu ťažkého imunoglobulinového reťazca.

Termín „fúzny proteín“ znamená tiež proteín interferónu-beta chemicky viazaný prostredníctvom mono- alebo heterofunkčnej molekuly na druhú časť, ktorá je odlišná od proteínu interferónu-beta a je pripravený *de novo* z purifikovaného proteínu, ako bude ďalej opísané.

Termín „rekombinantný“ znamená v opise vynálezu proteín pochádzajúci z rekombinantných cicavčích expresných systémov. Proteín exprimovaný vo väčšine bakteriálnych kultúr, ako je napr. *E. coli*, bude bez glykánov a preto takýto expresný systém nie je výhodný. Proteín exprimovaný v kvasinkách môže obsahovať oligosacharidové štruktúry, ktoré sú odlišné od štruktúr exprimovaných v cicavčích bunkách.

Termín „biologicky aktívny“ používaný v predkladanom opise ako charakteristika interferónu-beta-1a znamená, že príslušná molekula má s opísanými uskutočneniami vynálezu homológiu v sekvencii aminokyselín dostatočnú na to, že vykazuje antivírusovú aktivitu pri meraní *in vitro* antivírusovým testom rovnakého typu, aký je v príklade 1 (pozri opis ďalej).

Termín „terapeutická kompozícia“ v opise vynálezu označuje kompozície obsahujúce proteíny podľa vynálezu a ďalšie fyziologicky kompatibilné prísady. Terapeutická kompozícia ďalej obsahuje expicijenty, ako je napr. voda, minerály a nosiče ako napr. proteíny.

Termín „účinné množstvo“ činidla alebo prípravku označuje také množstvo, ktoré poskytuje požadovaný výsledok alebo prejavuje vplyv na určité ochorenie, ktoré je liečené.

„Aminokyselina“ je monomérna jednotka peptidu, polypeptidu alebo proteínu. Existuje dvadsať aminokyselín, ktoré sa nachádzajú v prirodzene sa vyskytujúcich peptidoch, polypeptidoch alebo proteínoch a všetky sú L-izoméry. Vynález zahŕňa tiež analógy aminokyselín a D-izoméry aminokyselín tvoriacich proteíny a ich analógy.

„Derivovaná“ aminokyselina je prírodná aminokyselina alebo aminokyselina nevyskytujúca sa v prírode, kde normálne sa vyskytujúci postranný reťazec alebo koncové skupiny (alebo cukrová časť v prípade interferónu-beta-1a) sú modifikované chemickou reakciou. K takýmto modifikáciám patrí napr. gama-karboxylácia, beta-karboxylácia, PEGylácia, sulfatácia, sulfonácia, fosforylácia, amidizácia, esterifikácia, N-acetylácia, karbobenzylácia, tosylácia a ďalšie modifikácie, ktoré sú odborníkom známe. Takže „derivovaný polypeptid“ je polypeptid obsahujúci jednu alebo viac derivovaných aminokyselín a/alebo jeden alebo viac derivovaných cukrov, pokiaľ ide o glykozylovaný polypeptid.

„Proteín“ je polymér zložený v podstate z ktorýchkoľvek z dvadsiatich proteínových aminokyselín. Aj keď termín „polypeptid“ sa často používa na označenie relatívne veľkých polypeptidov a termín „peptid“ sa často používa na označenie relatívne malých polypeptidov, použitie týchto termínov v odbore sa často prekrýva a je premenné. V tomto texte sa používa termín „proteín“ na označenie peptidov, proteínov aj polypeptidov, pokiaľ nie je výslovne uvedené inak.

„Funkčný ekvivalent“ aminokyselinového zvyšku je aminokyselina, ktorá má podobné fyzikálno-chemické vlastnosti, ako aminokyselinový zvyšok, ktorý bol nahradený funkčným ekvivalentom.

Termín „mutant“ (prípadne „mutácia“) označuje akúkoľvek zmenu v genetickom materiáli organizmu, konkrétne je to akákoľvek zmena (t. j. delécia, substitúcia, adícia alebo alternácia) v polynukleotidovej sekvencii divého typu alebo akákoľvek zmena v proteíne divého typu. Termín „muteín“ sa používa zameniteľne s termínom mutant.

Termín „divý typ“ označuje prirodzene sa vyskytujúcu polynukleotidovú sekvenciu exónu proteínu alebo jej časť alebo aminokyselinovú sekvenciu proteínu alebo jej časť, tak ako sa normálne vyskytuje *in vivo*.

„Štandardné hybridizačné podmienky“ sú podmienky definované koncentráciou solí a teplotou v podstate zhodnej s podmienkami 0,5 x SSC až 5 x SSC a 65 °C, a to tak na vlastnú hybridizáciu ako aj premývanie. Používaný termín „štandardné hybridizačné podmienky“ je preto operačná definícia zahŕňajúca celý rad rôznych hybridizačných podmienok. Podmienky s vysokou stringenciou znamenajú napr. hybridizáciu v pufri na

skrining plakov (0,2 % polyvinylpyrrolidón, 0,2 % Ficoll 400TM, 0,2 % hovädzí sérový albumín (BSA), 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1M NaCl, 0,1 % hydrogenfosforečnan sodný, 1 % SDS) s 10 % dextránsulfátom a 100 µg/ml denaturovanej sonifikovanej DNA lososích spermii pri 65 °C po 12 až 20 hodín a premývanie v 75 mM NaCl/7,5 mM citrát sodný (0,5 x SSC)/1 % SDS pri 65 °C. Podmienky s nízkou stringenciou sú napr.

5 hybridizácia v pufri na skrining plakov s 10 % dextránsulfátom a 110 µg/ml denaturovanej sonifikovanej DNA lososích spermii pri 55 °C po 12 až 20 hodín a premývanie v 300 mM NaCl/30 mM citrát sodný (2,0 x x SSC/1 % SDS pri 55 °C (pozri Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., New York, 6.3.1 - 6.3.6, 1989).

„Expresná kontrolná sekvencia“ je polynukleotidová sekvencia, ktorá riadi a reguluje expresiu génov, keď je s týmito génmi operatívne spojená.

„Operatívne spojená“ znamená v prípade polynukleotidovej sekvencie (DNA, RNA), že je „operatívne spojená“ s expresnou kontrolnou sekvenciou, keď expresná kontrolná sekvencia riadi a reguluje transkripciu a transláciu tejto polynukleotidovej sekvencie. Termín „operatívne spojená“ znamená, že pred polynukleotidovou sekvenciou, ktorá má byť exprimovaná, je vhodný štartovací signál (napr. ATG) a že sekvencia je v správnom čítacom rámci, ktorý dovoľuje expresiu polynukleotidovej sekvencie pod kontrolou expresnej kontrolnej sekvencie a teda produkciu požadovaného polypeptidu kódovaného izolovanou polynukleotidovou sekvenciou.

„Expresný vektor“ je polynukleotid, väčšinou DNA plazmid alebo fág (ako najbežnejšie príklady z ďalších), ktorý dovoľuje expresii aspoň jedného génu, keď je vektor vnesený do hostiteľskej bunky. Vektor môže, ale nemusí byť schopný replikácie v hostiteľskej bunke.

Termín „izolovaný“ (používaný v predkladanej prihláške zameniteľne s termínom „v podstate čistý“), pokiaľ sa týka nukleových kyselín, t. j. polynukleotidových sekvencií, ktoré kódujú polypeptidy, znamená RNA alebo DNA polynukleotid, časť genómového polynukleotidu, cDNA alebo syntetický polynukleotid, ktorý v dôsledku svojho pôvodu alebo zachádzania s ním: i) nie je spojený so všetkými polynukleotidmi, s ktorými je spojený v prírode (napr. je prítomný v hostiteľskej bunke ako expresný vektor alebo jeho časť), ii) je spojený s nukleovou kyselinou alebo inou chemickou skupinou, ktoré sa odlišujú od tých, s ktorými je spojený v prírode, alebo iii) nevyskytuje sa v prírode. Ako „izolovaná“ sa ďalej označuje polynukleotidová sekvencia, ktorá je : i) amplifikovaná *in vitro* napr. metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), ii) syntetizovaná chemicky, iii) rekombinantne pripravená klonovaním alebo IV) purifikovaná, napr. štiepením a gélovou separáciou.

Takže „v podstate čistá nukleová kyselina“ je nukleová kyselina, ktorá nie je bezprostredne súvislo spojená s jednou alebo oboma sekvenciami, s ktorými je normálne súvislo spojená v prírode sa vyskytujúcim genómom organizmu, z ktorého je izolovaná. V podstate čistá DNA je tiež rekombinantná DNA, ktorá je časťou hybridného génu kódujúceho ďalšiu sekvenciu.

Termín „izolovaný“ (používaný v predkladanej prihláške zameniteľne s termínom „v podstate čistý“), pokiaľ ide o polypeptidy, znamená polypeptid alebo jeho časť, ktorý v dôsledku svojho pôvodu alebo zachádzania s ním: i) je prítomný v hostiteľskej bunke ako expresný produkt úseku expresného vektora, alebo ii) je spojený s inými proteínmi alebo chemickými skupinami, než s tými, s ktorými je spojený v prírode, alebo iii) nevyskytuje sa v prírode. Ako „izolovaný“ sa ďalej označuje polypeptid, ktorý i) bol chemicky syntetizovaný, ii) bol exprimovaný v hostiteľskej bunke a purifikovaný od asociovaných proteínov. Výhodne je izolovaný polypeptid purifikovaný tiež od ďalších látok, ako sú napr. protilátky alebo gélový matrix (polyakrylamid), ktoré sa používajú na purifikáciu.

„Heterológny promótor“ je promótor, ktorý v prírode nie je spojený s génom alebo purifikovanou nukleovou kyselinou.

Termín „homológny“ je používaný ako synonymum pre „identický“ a týka sa sekvenčnej podobnosti dvoch polypeptidov alebo molekúl alebo dvoch nukleových kyselín. Keď je jedna určitá pozícia v dvoch porovnávaných sekvenciách obsadená rovnakou bázou alebo aminokyselinou (napr. pozícia v dvoch molekulách DNA je obsadená adenínom alebo pozícia v dvoch polypeptidoch je obsadená lyzínom), potom dve porovnávané molekuly sú v tejto pozícii homologické. Percento homológie medzi dvoma sekvenciami je funkciou počtu zhodných alebo homologických pozícií, ktoré majú dve sekvencie delený celkovým počtom pozícií a vynásobený 100. Tak napr. ak 6 z 10 pozícií je zhodných alebo homologických, potom tieto sekvencie sú zo 60 % homologické. Alebo napr. DNA sekvencie CTGACT a CAGGTT majú 50 % homológiu (3 pozície zo 6 sú zhodné). Všeobecne sa porovnávanie uskutočňuje, keď sú sekvencie vzájomne priradené tak, aby bolo dosiahnuté maximálnej homológie. Takéto priradenie a porovnanie je možné uskutočniť metódou, ktorú publikoval Needleman et al. (J. Mol. Biol. 48: 443-453, 1970), a ktorá je štandardne implementovaná v príslušných počítačových programoch, ako je napr. program „Align“ (DNASTar, Inc.). Homologické sekvencie majú zhodné alebo podobné zvyšky aminokyselín, kde podobné aminokyselinové zvyšky sú konzervatívne substitúcie alebo tzv. „povolené“ bodové mutácie zodpovedajúcich aminokyselinových zvyškov vzhľadom na zodpovedajúce priradené referenčné sekvencie. V tomto zmysle „konzervatívne substitúcie“ aminokyselinového zvyšku v referenčnej sekvencii znamenajú substitúciu aminokyselinou, ktorá je fyzikálne alebo funk-

čne podobná zodpovedajúcemu zvyšku v referenčnej sekvencii, teda napr. má podobnú veľkosť, tvar, elektrický náboj, chemické vlastnosti vrátane schopnosti vytvárať kovalentné alebo vodíkové väzby a pod. Zvlášť výhodné sú kovalentné substitúcie, ktoré spĺňajú kritéria definované ako „priateľné bodové mutácie“ v publikácii Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure 5, Suppl. 3, Chapter 22: 352-354, Nat. Bio-med. Res. Foundation, Washington D. C., 1978.

Termíny „polynukleotidová sekvencia“ a „nukleotidová sekvencia“ sú používané v opise zameniteľne.

Termíny „angiogenéza“ a „neovaskularizácia“ sú používané v najširšom význame a znamenajú vytváranie nových krvných ciev.

Najmä angiogenéza sa týka tiež vytvárania nových krvných ciev.

Termíny „IFNAR2“, „IFNAR1“ a „IFNAR1/2“ označujú proteíny, ktoré tvoria interferónový receptor typu I na povrchu buniek. Extracelulárna časť (ektodoména) receptora IFNAR2 sama môže viazať interferón beta alebo alfa.

Pri uskutočňovaní predkladaného vynálezu boli použité štandardné metódy bunkovej biológie, bunkových kultúr, molekulárnej biológie, mikrobiológie, rekombinantnej DNA, proteínovej chémie a imunológie, ktoré sú odborníkom známe. Tieto metódy boli publikované v odbornej literatúre. Pozri napr. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. (Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover, ed.), 1985, Oligonukleotide Synthesis, (M. J. Gait, ed.), 1984; U.S. Patent No. 4 683 195 (Mullis et al.); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames and S. J. Higgins, eds.), 1984; Transcription and Translation (B. D. Hames and S. J. Higgins, eds.), 1984; Culture of Animal Cells (R. I. Freshney, ed.) Alan R. Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1986; A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal), 1984; Methods in Enzymology, Volumes 154 and 155 (Wu et al., eds), Academic Press, New York; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds.), Academic Press. London, 1987; Handbook of Experiment Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.), 1986; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

II. Produkcia a expresia fúzných proteínov

Predkladaný vynález sa týka systému vytvárania fúzných proteínov interferónu-beta-1a. Vynález sa najmä týka týchto proteínov a tiež molekúl rekombinantnej DNA používaných na jej produkciu.

Polypeptidy podľa vynálezu možno produkovať rôznymi metódami, ktoré sú odborníkom známe. Tak napr. interferón-beta-1a úplnej dĺžky alebo skrátený interferón-beta-1a sa môžu pripraviť známymi metódami rekombinantnej DNA použitím cDNA (pozri ďalej).

Gén kódujúci požadovaný polypeptid interferónu-beta-1a sa môže konštruovať na základe aminokyselinovej sekvencie požadovaného polypeptidu. Na syntézu génu sa potom použijú štandardné metódy. Tak napr. aminokyselinová sekvencia sa použije na konštrukciu „spätne preloženého“ génu. Oligomér DNA obsahujúci nukleotidovú sekvenciu kódujúcu interferón-beta-1a sa môže syntetizovať v jedinom kroku. Alternatívne môže byť pripravených niekoľko menších oligonukleotidov kódujúcich časti požadovaného interferónu-beta-1a a tie sa potom ligáciou spoja dohromady. Výhodne sa DNA sekvencia kódujúca interferón-beta-1a pripraví ako niekoľko samostatných oligonukleotidov, ktoré sa následne navzájom pospájajú (pozri príklad 2). Jednotlivé nukleotidy typicky obsahujú 5'- alebo 3'-presahy (presahujúce úseky), ktoré umožňujú spojenie na základe komplementarity.

Po zostavení výhodné gény budú charakteristické tým, že budú rozpoznávané restriktívnymi endonukleázami (vrátane jedinečných restriktívnych miest na priame vkladanie do kolonovacích alebo expresných vektorov), preferovaných využitím kodónov vzhľadom na hostiteľský expresný organizmus, ktorý sa bude používať (výhodne cicavčie bunky) a tým, že po transkripcii produkujú stabilne a účinne translátovanú RNA. Správne zostavenie možno overiť sekvenovaním, restriktívnym mapovaním a/alebo expresiou biologicky aktívneho polypeptidu vo vhodnom hostiteľovi.

Cicavčia cDNA pre interferón-beta môže byť izolovaná pomocou vhodnej DNA sekvencie ľudského interferónu-beta-1a ako sondy na skríning konkrétnej cicavčej DNA knižnice medzidruhovou hybridizáciou. V predkladanom vynáleze bol použitý interferón-beta z cicavcov, ako sú napr. primáty, človek, myš, pes, mačka, krava, kôň a prasa. Cicavčí interferón-beta možno získať medzidruhovou hybridizáciou a síce použitím jednoreťazcovej cDNA ľudského interferónu-beta ako hybridizačnej sondy na izoláciu cDNA pre interferón-beta z cicavčích cDNA knižníc. K metódam, ktoré sa môžu byť použité na izoláciu a klonovanie sekvencií interferónového génu, patria metódy opísané v citovaných patentoch USA. Relevantný je hlavne patent US 4 738 931 (19. apríl 1988), opisujúci DNA obsahujúci gén ľudského interferónu-beta.

Predkladaný vynález sa tiež týka molekúl rekombinantnej DNA, ktoré obsahujú uvedené sekvencie DNA.

Molekuly rekombinantnej DNA podľa vynálezu sú schopné riadiť expresiu polypeptidu podľa vynálezu v hostiteľovi, ktorý je nimi transformovaný. Aby bolo dosiahnuté expresie, musí sekvencia DNA kódujúca fúzny polypeptid podľa vynálezu byť operatívne spojená s expresnou kontrolnou sekvenciou. Aby bolo do-

siahnuté zodpovedajúcej transkripcie rekombinantného konštruktu podľa vynálezu, do rekombinantného vektora sa výhodne vloží vhodná sekvencia promótor/enhanceru, za predpokladu, že sekvencia promótor/enhancer je schopná riadiť transkripciu sekvencie nukleovej kyseliny kódujúcej glykozylovaný interferón-beta. K promótorom, ktoré sa môžu použiť na riadenie exprese fúzných proteínov založených na imunoglobulíne patrí bez toho, aby tento výpočet bol obmedzujúci, skorý promótor SV40 (Benoist a Chambon, 1981, Nature 290: 304-310), promótor obsiahnutý v 3'-koncovej dlhej terminálnej repetícii (LRT) vírusu Rousovho sarkómu (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22: 787-797), thymidín-kinázový promótor z herpes vírusu (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 144-1445), regulačná sekvencia metalotionínového génu (Brinster et al., 1982, Nature 296: 39-42), rastlinné expresné vektory obsahujúce promótor nopalínsyntetázy (Herrera-Estrella et al., Nature 303: 209-213) alebo 35S RNA promótor z vírusu mozaiky karfiolu (Gardner, et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9: 2871) a tiež promótor fotosyntetického enzýmu ribulózabisfosfátcarboxylázy (Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310: 115-120); promótorové elementy z kvasiniek alebo iných húb, ako je napr. Gal4 promótor, promótor ADC (alkoholdehydrogenázy), promótor PGK (fosfoglycerolkinázy), promótor alkalické fosfatázy a tiež nasledujúce zvieracie transkripčné kontrolné úseky, ktoré vykazujú tkanivovú špecifitu a boli použité pri transgénnych zvieratách: kontrolný úsek génu elastázy I, ktorý je aktívny v bunkách pankreasu (Swift et al., 1984, Cell 38: 639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425515); zosilňovače (enhancery) alebo promótory génu na inzulín, ktoré sú aktívne v beta-bunkách pankreasu (Hanahan, 1985, Nature 315: 115-122); enhancery alebo promótory imunoglobulínových génov, ktoré sú aktívne v lymfatických bunkách (Grosschedl et al., 1984, Cell 38: 647-658; Adames et al., 1985, Nature 318: 533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444); úsek promótoru a enhancera skorých génov cytomegalovírusu (Boshart et al., 1985, Cell 41: 521530); kontrolný úsek myšieho vírusu nádoru prsnej žľazy, ktorý je aktívny v bunkách semienikov a prs a lymfatických tukových bunkách (Leder et al., 1986, Cell 45: 485-495); kontrolný úsek albumínového génu, ktorý je aktívny v pečeni (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1: 268-267); kontrolný úsek génu na alfa-fetoproteín, ktorý je aktívny v pečeni (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235: 53-58); kontrolný úsek génu alfa 1-antitrypsínu, ktorý je aktívny v pečeni (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161-171); kontrolný úsek beta-globínového génu, ktorý je aktívny v myeloidných bunkách (Mogam et al., 1985, Nature 315: 338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46: 89-94); kontrolný úsek génu na myelinový bázický proteín, ktorý je aktívny v oligodendrocytoch mozgu (Readhead et al., 1987, Cell 48: 703-712); kontrolný úsek ľahkého reťazca 2 myozínu, ktorý je aktívny v kostrovom svalstve (Sani, 1985, Nature 314: 283-286); a kontrolný úsek génu hormónu uvoľňujúceho gonadotropíny, ktorý je aktívny v hypotalame (Mason et al., 1986, Science 234: 1372-1378). Prokaryotické expresné systémy, ako napr. LAC promótor alebo beta-laktamázový promótor (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727-3731) nie sú výhodné na predkladaný vynález, lebo takto exprimovaný interferón-beta by nebol glykozylovaný.

Viacmenej prokaryotické expresné systémy, ktoré umožnia glykozyláciu interferónu-beta buď v prokaryotickom alebo eukaryotickom hostiteľovi, sú tiež predmetom predkladaného vynálezu.

Expresné vektory, ktoré môžu byť použité, sú napríklad bez toho, aby bol však tento výpočet obmedzujúci, nasledujúce vektory alebo ich deriváty: ľudské alebo zvieracie vírusy, ako je vírus vakcínie, vektory založené na adenovírusoch alebo retrovírusoch, hmyzie vírusy alebo bakulovírusy, kvasinkové vektory (napr. lambda) a plazmidové a kozmidové DNA vektory, aby sme menovali aspoň niektoré. Špecificky k užitočným expresným vektorom pre výhodné eukaryotické hostiteľské patria vektory obsahujúce expresné kontrolné sekvencie z SV40, hovädzieho papilloma vírusu a cytomegalovírusu. Vnútri každého špecifického vektora sa vyberú rôzne miesta na vloženie požadovanej DNA sekvencie. Tieto miesta sú väčšinou definované restriktívnymi endonukleázami, ktoré v týchto miestach štiepia DNA. Odborníkovi je to dobre známe. Je tiež jasné, že daný expresný vektor užitočný na vynález nemusí mať restriktčné endonukleázové miesta na inzerciu vybraného fragmentu DNA. Miesto toho sa vektor spojí s fragmentom alternatívnym spôsobom.

Expresný vektor, miesto vybrané na inzerciu vybraného fragmentu DNA a operatívne spojenie na expresnú kontrolnú sekvenciu sú určené mnohými rôznymi faktormi, ako je napr. počet miest štiepiateľných konkrétnym restriktívnym enzýmom, veľkosť polypeptidu, citlivosť polypeptidu na proteolytickú degradáciu a pod. Výber vektora a inzerčných miest pre danú DNA je potom daný bilanciou týchto faktorov.

Rekombinantné konštrukty podľa vynálezu sa vnesú do buniek, ktoré sú schopné exprimovať fúzny proteín, metódami, ktoré sú odborníkom známe. K týmto metódam patrí transformácia (napr. metódou s DEAE-dextránom alebo kalciumfosfátom), transfekcia, mikroinjekcia, infekcia, vstreľovanie do bunky a elektroporácia bunky. Môže byť použitá akákoľvek hostiteľská bunka, za predpokladu, že sekvencia rekombinantnej nukleovej kyseliny bude adekvátne transkribovaná do RNA v bunkách tohto typu a že tieto bunky sú schopné glykozylovať proteín. Okrem toho akékoľvek konštrukty rekombinantnej nukleovej kyseliny podľa vynálezu môžu byť použité na vytvorenie transgénnych zvierat s výnimkou človeka, schopných produkovať fúzne proteíny založené na imunoglobulíne. Vo výhodnom uskutočnení vynálezu sú hostiteľské bunky COS alebo CHO.

Úspešnú inkorporáciu týchto polynukleotidových konštruktov do daného expresného vektora je možné identifikovať všeobecne tromi možnými postupmi: (a) DNA-DNA hybridizáciou, (b) prítomnosťou či absenciou funkcií „markerových“ génov a (c) expresiou vlozenej sekvencie. V prvom z uvedených prípadov sa prítomnosť génu interferónu-beta-1a v expresnom systéme deteguje hybridizáciou DNA-DNA použitím sondy, ktorá obsahuje sekvenciu homologickú s vloženým génom fúzneho proteínu. V druhom prípade sa rekombinantný systém vektor/hostiteľ identifikuje a selektuje na základe prítomnosti alebo neprítomnosti určitej markerovej funkcie (napr. tymidínkinázová aktivita, rezistencia na antibiotiká ako napr. G418, transformovaný fenotyp, vytváranie oklúzných teliesok pri bakulovírusoch a pod.) spôsobené vložením cudzorodého génu do vektora. Tak napr. keď je polynukleotid vložený do vektora tak, že prerušuje sekvenciu markerového génu, rekombinanty obsahujúce inzert sú identifikované na základe absencie funkcie markerového génu. V treťom prípade je rekombinantný expresný vektor identifikovaný testovaním exprese cudzorodého génového produktu z rekombinantného vektora. Takéto testy sú napr. založené na fyzikálnych alebo funkčných vlastnostiach génového produktu v biologických testovacích systémoch.

Treba mať na pamäti, že všetky kombinácie hostiteľ/expresný vektor fungujú s rovnakou účinnosťou pri expresii DNA kódujúcej polypeptid podľa vynálezu. Ale odborník môže uskutočniť konkrétny výber kombinácie hostiteľ/expresný vektor pri uvážení princípov stanovených v predkladanom vynáleze bez toho, aby sa odchýlil od vynálezovskej myšlienky predkladaného vynálezu.

Výhodné uskutočnenie predkladaného vynálezu zahŕňa fúzne proteíny a sekvencie DNA, ktoré tieto proteíny kódujú. Tieto fúzne proteíny majú amino-koncový úsek charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou interferónu-beta-1a a karboxy-koncový úsek obsahujúci doménu proteínu iného, než je interferón-beta-1a. Generický vzorec výhodného fúzneho proteínu je proteín majúci aminokyselinovú sekvenciu X-Y-Z, kde X je polypeptid majúci aminokyselinovú sekvenciu, alebo aspoň jej časť, zodpovedajúci aminokyselinovej sekvencii ľudského interferónu-beta, Y je voliteľná spojovacia časť (linker) a Z je polypeptid obsahujúci aspoň časť polypeptidu iného, než je ľudský interferón-beta. V jednom uskutočnení časť Z je časť polypeptidu, ktorý obsahuje imunoglobulín podobnú doménu. K príkladom takýchto polypeptidov patria CD1, CD2, CD4 a členovia I. a II. triedy antigénov hlavného histokompatibilného systému (na príklady týchto polypeptidov pozri tiež prihlášku US 5 565 335, Capon et al.).

Časť Z obsahuje napr. niekoľko hisitidínových zvyškov, alebo výhodný Fc úsek imunoglobulínu, pričom „Fc“ je definovaný ako fragment protilátky obsahujúci C-koncovú doménu ťažkého reťazca imunoglobulínu.

V najvýhodnejšom uskutočnení fúzneho proteínu podľa vynálezu je polypeptid interferónu-beta-1a fúzovaný prostredníctvom svojho C-konca a aspoň časťou Fc úseku imunoglobulínu. Interferón-beta-1a tak vytvára amino-koncovú časť a Fc vytvára karboxy-koncovú časť fúzneho proteínu. V týchto fúzných proteínoch je výhodne obmedzený na kľbový úsek konštantnej domény a domény CH2 a CH3. Fc fragment týchto fúzných proteínov môže byť tiež obmedzený na časť kľbového úseku, ktorá je schopná tvoriť intermolekulárne disulfidické mostíky a domény CH2 a CH3 alebo zodpovedajúci funkčný ekvivalent. Takéto konštantné úseky môžu pochádzať z akéhokoľvek cicavca (výhodne človeka) a môžu byť získané z akejkolvek triedy a/alebo izotypu protilátky vrátane IgA, IgD, IgM, IgE a IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4.

Molekuly rekombinantnej nukleovej kyseliny kódujúce Ig fúzie možno pripraviť akoukoľvek metódou v odbore známou (pozri Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning; A Laboratory to Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) alebo použitím verejne dostupných klonov. Metódy prípravy génov, ktoré kódujú konštantné úseky ťažkých a ľahkých reťazcov imunoglobulínov, boli opísané napr. v Robinson, R. et al., medzinárodná patentová prihláška PCT publikovaná ako W087/02671. Sekvencia cDNA kódujúca molekulu interferónu alebo jej fragment môže byť priamo spojená s DNA sekvenciou kódujúcou konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu alebo môže byť spojená prostredníctvom spojovacej sekvencie (linkera). V inom uskutočnení vynálezu je rekombinantný expresný systém vytvorený tak, že obsahuje sekvenciu kódujúcu interferón-beta v správnom čítacom rámci so syntetickým úsekom na kľbovú oblasť protilátky. Okrem toho môže byť potrebné vložiť, ako časť rekombinantného vektorového systému, nukleové kyseliny zodpovedajúce 3'-koncovému úseku lemujúcemu imunoglobulínový gén obsahujúci miesta na štiepenie a polyadenyláciu RNA a „downstream“ sekvencie. A ďalej môže byť potrebné vložiť signálnu sekvenciu do polohy „upstream“ od kódujúcej sekvencie imunoglobulínového fúzneho proteínu, aby sa umožnila sekrécia fúznej molekuly z buniek transformovaných rekombinantným vektorom.

Predkladaný vynález poskytuje dimérne fúzne molekuly a tiež monomérne alebo multimérne molekuly obsahujúce fúzne proteíny. Takéto multimérne molekuly môžu byť pripravené použitím takých Fc úsekov Ig molekúl, alebo ich častí, ktoré sú obvykle multivalentné, ako sú napr. pentaméry IgM alebo diméry IgA. Je zrejmé, že polypeptid J reťazca je potrebný na vytvorenie a stabilizáciu pentaméru IgM a diméru IgA. Alternatívne multiméry fúzných proteínov interferónu-beta-1a môžu byť pripravené použitím proteínu s afinitou na Fc úsek Ig molekúl, ako je napr. proteín A. Tak napr. mnohé fúzne proteíny interferón-beta-1a/imunoglobulín môžu byť naviazané na agarózové perličky s proteínom A.

Tieto polyvalentné formy sú užitočné, lebo majú mnoho väzobných miest na receptor interferónu-beta-1a. Napr. bivalentný rozpustný interferón-beta-1a je zložený z dvoch tandémovo sa opakujúcich sekvencií ami-

nokyselín 1 až 166 v sekvencii SEQ ID NO: 2 (alebo kódovaný úsekom 1 až 498 sekvencie SEQ ID NO: 1) (časť X v generickom vzorci) oddelených spojovacím úsekom (časť Y) a táto repetícia je spojená s aspoň časťou konštantnej domény imunoglobulínu (časť Z). Pozmenené polyvalentné formy môžu byť skonštruované, napr. chemickým naviazaním fúzie interferón-beta-1a/Ig na klinicky prijateľnú nosičovú molekulu, polymér vybraný zo skupiny obsahujúci Ficoll, polyetylenglycol alebo dextrán a síce obvyklými metódami konjugácie. Alternatívne môže byť interferón-beta-1a chemicky konjugovaný s biotínom a tento konjugát biotín-interferón-beta-Fc sa potom naviaže na avidín, čím vznikne tetravalentná molekula avidín/biotín/interferón-beta. Fúzia interferón-beta-1a/Ig môže byť tiež kovalentne naviazaná na dinitrofenol (DNP) alebo trinitrofenol (TNP) a výsledný konjugát potom precipitovaný pomocou anti-DNP alebo anti-TNP IgM, čím sa vytvoria dekamérne konjugáty s valenciou 10 na väzobné miesta na receptor interferónu-beta.

Proteíny interferónu-beta-1a a ich fragmenty a fúzne proteíny podľa vynálezu môžu byť izolované a purifikované obvyklými metódami, ako je napr. extrakcia, precipitácia, chromatografia, afinitná chromatografia, elektroforéza a pod. Napr. interferónové proteíny a ich fragmenty sa môžu purifikovať tak, že sa ich roztok nanesie na kolónu obsahujúcu imobilizované receptory interferónu (pozri napr. patent US 4 725 669). Naviazané molekuly interferónu sa potom eluujú použitím chaotropnej soli alebo použitím vodného roztoku kyseliny octovej. Imunoglobulínové fúzne proteíny môžu byť purifikované tak, že prechádzajú cez obsahujúci imobilizovaný proteín A alebo proteín G, ktoré selektívne viažu úsek Fc fúzneho proteínu (pozri napr. Reis, K. J., et al., J. Immunol. 132: 30983102 (1984); PCT prihláška publikovaná ako WO87/00329). Chimérická protilátka sa potom eluje použitím chaotropnej soli alebo použitím vodného roztoku kyseliny octovej.

Alternatívne sa molekuly fúzneho proteínu interferónu a imunoglobulínu na získanie v podstate čistého proteínu purifikujú na kolóne s anti-interferónovou protilátkou alebo na kolóne s anti-imunoglobulínovou protilátkou.

Termínom „v podstate čistý“ je mienený proteín zbavený nečistôt, ktoré sú s ním v prirodzenom stave spojené. V podstate čistý stav je možné dokázať výskytom jedného pásu na elektroforéze.

Príkladom užitočného fúzneho proteínu interferón-beta-1a/Ig podľa vynálezu je proteín sekvencie SEQ ID NO: 2, ktorý je secernovaný v bunkovej kultúre eukaryotických buniek obsahujúcich expresný plazmid pCMG261 (pozri príklad 2). Tento proteín sa skladá zo zrelého ľudského interferónu-beta-1a fúzovaného s časťou kľbového úseku a konštantnými doménami CH2 a CH3 myšieho Ig. Pritom obsahuje úsek myšieho imunoglobulínu dostatočný na to, aby bol rozpoznávaný Fc väzbovým proteínom a síce proteínom A.

Ďalšie fúzne proteíny podľa vynálezu obsahujúce ľudský interferón-beta-1 sú uvedené: (a) ako sekvencie SEQ ID NO: 3 a 4, ukazujúce cDNA a dedukovanú aminokyselinovú sekvenciu his-označenej fúzie interferónu-beta-1a (tiež ukázaná na obr. 1) a (b) sekvencia SEQ ID NO: 1 pre cDNA kódujúcu fúzny proteín interferón-beta-1a/Ig so sekvenciou SEQ ID NO: 2 (ukázaný tiež na obr. 2).

Výhodné proteíny interferónu-beta-1a podľa vynálezu obsahujúce novú „spojovaciu“ sekvenciu DNA SEQ ID NO: 5 a aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 6 predstavujúcu kodóny 11 tripletov na oboch stranách spoja medzi DNA ľudského interferónu -beta a DNA kódujúcou konštantný úsek ľudského imunoglobulínu (pozri príklad 5: sekvencia SEQ ID NO: 41 a 42).

Špecificky, sekvencia SEQ ID NO: 5 kódujúca ľudský interferón-beta-1a končí nukleotidovým tripletom 568-570 (AAC) a DNA kódujúcou konštantný úsek ľudského IgG1 začína tripletom (GAC) začínajúc nukleotidom č. 574 v sekvencii SEQ ID NO: 41. Zodpovedajúca dedukovaná aminokyselinová „spojovacia“ sekvencia je uvedená ako sekvencia SEQ ID NO: 6 a je založená na sekvencii SEQ ID NO: 42. Bola definovaná aj ďalšia jedinečná „spojovacia“ sekvencia, ktorá zahŕňa linkerovú sekvenciu vo výslednom DNA konštrukte (pozri príklad 5: sekvencia SEQ ID NO: 43 a 44). Táto sekvencia „spojovacej“ DNA a príslušná aminokyselinová sekvencia sú uvedené ako sekvencie SEQ ID NO: 7 a 8, ktoré ukazujú kodóny 11 tripletov na oboch stranách spoja priamo medzi koncom sekvencie interferónu-beta-1a (nukleotid č. 570 v sekvencii SEQ ID NO: 43) a sekvenciou linkera (nukleotidy 571 až 585 v sekvencii SEQ ID NO: 43, GGGGS (SEQ ID NO: 64) v sekvencii SEQ ID NO: 8).

„Spojovacie“ DNA sekvencie môžu byť použité ako DNA sondy a sú to minimálne DNA potrebné na hybridizáciu za štandardých podmienok s akoukoľvek DNA sekvenciou kódujúcou fúzny proteín interferón-beta-1a/Ig. Viacmenej za predpokladu, že celá sonda hybridizuje s oboma stranami spojovacej sekvencie a obe strany spoja interferón-beta/konštantný úsek sa podieľajú na hybridizácii, môžu existovať aj menšie sekvencie. Navyše odborníkovi je zrejmé, že DNA sekvencie väčšie ako sekvencia SEQ ID NO: 7 sú tiež vhodné na hybridizáciu. Odborník môže ľahko otestovať, či konkrétna sonda, ako napr. sekvencia SEQ ID NO: 5 alebo 7, je schopná hybridizácie na oboch stranách spojenia a to tak, že označia 5'-koniec buď jednoreťazcového „sense“ oligonukleotidu, alebo jednoreťazcového „anti-sense“ oligonukleotidu vhodne značeným fosfátom z ATP použitím polynukleotidkinázy. Sekvencie podľa vynálezu musia hybridizovať s oboma a teda označenými oligonukleotidovými sondami. Odborníkovi je tiež zrejmé, že vynález zahŕňa tiež úplne degenerované sekvencie kódujúce spojovaciu sekvenciu SEQ ID NO: 5 alebo 7.

III. Ďalšie varianty interferónových fúzných polypeptidov

K derivátom proteínov podľa vynálezu patria tiež rôzne štruktúrne formy primárnych proteínov, ktoré si uchovávajú biologickú aktivitu. Vďaka prítomnosti ionizovateľnej aminoskupiny a karboxylovej skupiny môžu byť fúzne proteíny interferónu-beta napr. vo forme kyslých alebo bázických solí, alebo môžu byť v neutrálnej forme. Jednotlivé aminokyselinové zvyšky môžu byť modifikované oxidáciou alebo redukciou. A ďalej primárna aminokyselinová štruktúra (vrátane N- a/alebo C- koncových úsekov) alebo glykánová časť interferónu-beta môžu byť modifikované (derivované) vytváraním kovalentných alebo agregovaných konjugátov s inými chemickými skupinami, ako sú napr. glykozylované skupiny, polyalkylenglykolové polyméry ako napr. polyetylén glykol (PEG: pozri súčasne prejednávane prihlášky rovnakého prihlasovateľa č. 60/104,491 a 60/120,237), lipidy, fosfáty, acetylové skupiny a pod., a alebo vytváraním mutácií aminokyselinových sekvencií.

K ďalším derivátom interferónu-beta/Ig patria kovalentné alebo agregované konjugáty interferónu-beta alebo jeho fragmentov s inými proteínmi alebo polypeptidmi, ktoré sú pripojené syntézou v rekombinantnej kultúre ako dodatočné C- alebo N-konce. Tak napr. konjugovaný peptid môže byť signálna (alebo tzv. vedúca) polypeptidová sekvencia v N-koncovom úseku proteínu, ktorá pri translácii (kotranslačne) alebo po translácii (posttranslačne) smeruje prenos proteínu z miesta jeho syntézy do miesta jeho pôsobenia vnútri bunky alebo v bunkovej membráne alebo bunkovej steny (napr. vedúca sekvencia alfa-faktora kvasiniek). Receptorové proteíny interferónu-beta môžu obsahovať peptidy pridané na uľahčenie purifikácie alebo identifikácie interferónu-beta (napr. fúzia histidín/interferón-beta-1a). Aminokyselinová sekvencia interferónu-beta môže byť tiež spojená s peptidom Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 61) (Hopp et al., Bio/Technology 6: 1204, 1988). Táto sekvencia je silno antigénna a poskytuje epitop reverzibilne viazaný špecifickou monoklonálnou protilátkou, čo umožňuje rýchle testovanie a ľahké čistenie exprimovaného rekombinantného proteínu. Táto sekvencia je tiež špecificky štiepená enterokinázou z hovädzej sliznice v mieste zvyšku bezprostredne nasledujúcom po dvojici Asp-Lys.

K ďalším analógom patria fúzne proteíny interferónu-beta s Fc alebo ich biologicky aktívne fragmenty, ich sekvencie interferónu-beta sa líšia od sekvencií uvedených ako sekvencie SEQ ID NO: 2, 4, 6 alebo 8 jednou alebo viacerými konzervatívnymi zámienami aminokyselín alebo jednou či viacerými nekonzervatívnymi zámienami a/alebo deléciami alebo inzerciami, ktoré nenarušujú biologickú aktivitu izolovaného proteínu. Ku konzervatívnym substitúciám typicky patria substitúcie jednej aminokyseliny druhou aminokyselinou s podobnými vlastnosťami, ako sú napr. substitúcia v rámci nasledujúcich skupín: valín, alanín a glycín, leucín a izoleucín; kyselina asparágová a glutámová, asparagín a glutamín; serín a treonín; lyzín a arginín; a fenylalanín a tyrozín. K nepolárnym hydrofóbnym aminokyselinám patrí alanín, leucín, izoleucín, valín, prolín, fenylalanín, tryptofán a metionín. K polárnym neutrálnym aminokyselinám patrí glycín, serín, treonín, cysteín, tyrozín, asparagín a glutamín. K pozitívne nabitým (bázickým) aminokyselinám patrí arginín, lyzín a histidín. K negatívne nabitým (kyslým) aminokyselinám patrí kyselina asparágová a kyselina glutámová. Ďalšie konzervatívne substitúcie sú odborníkovi jasné. Tak napr. na konzervatívnu substitúciu aminokyseliny alanínu je možné vybrať ktorúkoľvek z aminokyselín, ako je D-alanín, glycín, beta-alanín, L-cysteín a D-cysteín. Za lyzín je možné vybrať ako náhradu ktorúkoľvek z aminokyselín D-lyzín, arginín, D-arginín, homo-arginín, metionín, D-metionín, ornitín a D-ornitín. Všeobecné substitúcie, pri ktorých sa dá očakávať, že spôsobia zmeny vo funkčných vlastnostiach izolovaných polypeptidov, sú prípady, keď: i) polárny zvyšok, napr. serín alebo treonín, je nahradený (alebo sa použije na nahradenie) hydrofóbnym zvyškom, napr. leucínom, izoleucínom, fenylalanínom alebo alanínom, ii) cysteínový zvyšok je nahradený (alebo sa použije na nahradenie) iným zvyškom a alebo iii) zvyšok majúci elektropozitívny vedľajší reťazec napr. lyzín, arginín alebo histidín, je nahradený (alebo sa použije na nahradenie) zvyškom majúcim elektronegatívny vedľajší reťazec, ako je napr. kyselina glutámová alebo asparágová, alebo iv) zvyšok majúci objemný vedľajší reťazec, ako je napr. fenylalanín, je nahradený (alebo sa použije na nahradenie) zvyškom, ktorý nemá taký vedľajší reťazec, napr. glycínom. Vynález tiež zahŕňa izolované molekuly, ktoré sú alelickými variantami, prirodzenými mutantmi, indukovanými mutantmi alebo proteínmi, ktoré sú kódované DNA hybridizujúcou za podmienok vysokej či nízkej stringencie s nukleovými kyselinami kódujúcimi polypeptid so sekvenciami SEQ ID NO: 2, 4, 6 alebo 8.

Pôvodcovia pripravili ďalšie mutanty interferónu-beta-1a, ktoré sú ďalšími variantmi časti interferónu-beta-1a v proteíne podľa vynálezu. Tieto interferón-beta-1a časti môžu byť zvlášť užitočné, pokiaľ prejavujú nové vlastnosti, ktoré nemá interferón-beta-1a divého typu (pozri príklad 1). Stručne zhrnuté, uskutočnila sa mutačná analýza ľudského interferónu-beta-1a s cieľom mapovať aminokyselinové zvyšky nutné na aktivitu a väzbu receptora. Dostupnosť trojrozmernej kryštálovej štruktúry ľudského interferónu-beta-1a (pozri Karpus et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 11813-11818) umožnila identifikovať, na alanínové (alebo serínové) substitúcie zvyšky, ktoré sú vystavené rozpúšťadlu a sú dostupné na interakcie s receptorom interferónu-beta a pritom zachovať aminokyselinové zvyšky podieľajúce sa na vytváraní intramolekulárnych väzieb. Pripravil sa panel 15 alanínových „skenovacích“ mutantov, kde sa nahradilo 2 až 8 zvyškov v určitých oblas-

tiach závitníc (A, B, C, D, E) a slučiek (AB1, AB2, AB3, CD1, CD2, DE1, DE2) interferónu-beta-1a (pozri príklad 1).

Amino-koncová histidínová značka („his“ tag) bola vložená na afinitnú purifikáciu mutantov exprimovaných v cicavčích bunkách (sekvencia SEQ ID NO: 2, obr. 1). Funkčné dôsledky týchto mutácií boli vyhodnotené pomocou antivírusových a antiproliferačných testov. Vyvinul sa tiež nerádioaktívny väzobný test na analýzu schopností mutantov viazať sa na receptor interferónu-beta na povrchu buniek (Bunkový povrchový receptor IFNAR1/2). Navyše sa použil test založený na ELISA-teste používajúci fúzny proteín „ektodoména IFNAR2/Fc“ na naviazanie interferónu na mapovanie povrchových interakcií medzi interferónom-beta-1a a IFNAR2 (pozri príklad 2). Tieto mutačné analýzy ukázali, že N- a C-konce ležia v časti molekuly interferónu-beta, ktorá nie je dôležitá na väzbu receptora alebo na biologickú funkciu.

Identifikovali sa tri druhy účinkov, ktoré boli spôsobené cieľenou mutagenézou. Tieto účinky môžu byť za určitých okolností výhodné pri vývoji interferónových liečiv. Tieto tri účinky sú nasledujúce: a) mutanty s vyššou antivírusovou aktivitou než interferón-beta-1a divého typu s his-značkou (napr. mutant C1), b) mutanty aktívne tak v antivírusovom, ako aj antiproliferačnom teste, ale ich antiproliferačná aktivita bola neúmerne nízka v porovnaní s antivírusovou aktivitou, vzhľadom na interferón-beta-1a divého typu s his-značkou (napr. mutanty C1, D a DE1) a c) funkčne antagonistické mutanty (napr. A1, B2, CD2 a DE1), ktoré vykazujú antivírusovú aj antiproliferačnú aktivitu, ktorá bola neúmerne nízka v porovnaní s väzbovou aktivitou na receptor, vzhľadom na interferón-beta-1a divého typu.

Okrem toho aj spojenie medzi interferónovou časťou (X) a druhou časťou (Z), ktorá je odlišná od interferónu-beta-1a (napr. Fc fragment imunoglobulínu) môže byť spôsobené chemickou reakciou, ktorá bude viazať obe molekuly tak dlho, pokiaľ si imunoglobulín a interferón-beta-1a zachovávajú svoje aktivity. K takýmto chemickým spojeniam patrí napr. kovalentná väzba, afinitná väzba, interkalácia, koordinačná väzba a vytvorenie komplexu. Príkladom spojovacích činidiel (t. j. linkera Y v generickom vzorci), ktorá vytvorí kovalentné väzby medzi interferónovou a imunoglobulínovou časťou, patria organické zlúčeniny ako napr. tioestery, karbodiimidy, sukcinimidestery, diizokyanáty, ako je tolyén-2,6-diizokyanát, glutaraldehydy, diazobenzény a hexametyldiamíny, ako je napr. bis-(p-diazóniumbenzoyl)-etyléndiamín, bifunkčné deriváty imidoesterov, ako je dimetyladipimidát a biaktívne zlúčeniny flóru ako je 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzén. Tento výpočet nie je samozrejme vyčerpávajúcim zoznamom rôznych tried chemických väzobných činidiel v odbore známych. Mnohé z nich sú tiež komerčne dostupné ako napr. N-sukcinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionát (SPDP), hydrochlorid 1-etyl-3-(3-dimetyl-aminopropyl)karbodiimidu (EDC); 4-sukcinimidylloxykarbonyl-alfa-metyl-al-fa-(2-pyridylditio)-toulén (SMPT; Pierce Chem. Co., katalóg. č. 21558G).

IV. Využitie vynálezu

Fúzne proteíny podľa vynálezu sa môžu využiť v terapeutických kompozíciách tam, kde je potreba použiť liečenie interferónom. Tieto molekuly majú výhody fúzných proteínov, hlavne fúzných proteínov s Ig, ide hlavne o zmenenú farmakokinetiku a farmakodynamiku, ktorá vedie k predĺženému biologickému polčasu a predĺženému času zotrvania v cievnom systéme. Okrem toho zvlášť výhodné proteíny glykozylovaného interferónu-beta-1a, hoci sú štruktúrne podobné interferónu-beta-1b, majú mnohonásobne vyššiu biologickú aktivitu než neglykozylovaný interferón-beta-1b (pozri Runkel et al., 1998, Pharm. Res. 15: 641-649).

Dokázalo sa, že produkty podľa vynálezu boli užitočné na udržanie biologického polčasu terapeutického interferónu-beta-1a a môžu byť na terapeutické podávanie upravené napr. rozpustením vo vode alebo v inom vhodnom kvapalnóm médiu. Podávanie sa uskutočňuje parentálnym alebo perorálnym spôsobom alebo vo forme aerosólu. Na perorálne podávanie môžu byť pripravené jemné koloidné suspenzie na dosiahnutie depotného účinku pri parentálnom podávaní alebo pri perorálnom podávaní, zatiaľ čo aerosólové prípravky sú povahou kvapalné prípravky alebo vo forme suchého prášku. Fúzie interferónu-beta-1a podľa predkladaného vynálezu by mali mať dobrú stabilitu pri skladovaní v suchom lyofilizovanom stave alebo ako kvapalné prípravky.

Terapeutické proteíny podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité na profylaxiu alebo na liečenie akéhokoľvek ochorenia alebo poruchy, pre ktoré je účinnou zložkou interferónu-beta-1a. Okrem toho fúzne proteíny podľa vynálezu sa môžu použiť na diagnózu zložiek, stavov alebo ochorení v biologických systémoch alebo vzorcoch, rovnako ako na diagnostiku v iných než fyziologických systémoch.

Pri terapeutickom využití predkladaný vynález predpokladá využitie na liečenie zvieratá, ktoré buď už trpí alebo je latentne náchylné na ochorenie a vyžaduje teda také liečenie, ktoré spočíva v tom, že sa zvieratú podáva účinné množstvo fúzneho proteínu podľa vynálezu, ktoré je terapeuticky účinné na dané ochorenie alebo poruchu. K subjektom, ktoré budú liečené fúznymi proteínmi podľa vynálezu patria zvieratá a predovšetkým človek. V závislosti od ochorenia alebo stavu, ktoré majú byť liečené, zvieratú sa podáva fúzny proteín interferónu-beta-1a podľa vynálezu v akejkoľvek terapeuticky účinnej a bezpečnej dávke, ktorú odborník ľahko stanoví bez nutnosti nadmerného experimentovania. Vzhľadom na medzidruhovú bariéru na interferónny typ I je nevyhnutné pripraviť fúzne proteíny interferónu-beta-1a podľa vynálezu vždy s interferónmi zo zodpovedajúceho biologického druhu.

Antiproliferačná bunková aktivita interferónu-beta-1a je dobre známa. Konkrétne niektoré fúzie interferónu-beta-1a opísané v predkladanej prihláške sú užitočné na liečenie nádorových a rakovinových ochorení, ako je napr. osteogénny sarkóm, lymfóm, akútna lymfocytárna leukémia, karcinóm prsníka, melanóm a nasofaryngeálny karcinóm a tiež autoimunitných ochorení, ako je napr. fibróza, lupus a roztrúsená mozgovomiechová skleróza. Tiež sa dá očakávať, že antivírusová aktivita, ktorú prejavujú fúzne proteíny podľa vynálezu, sa využije na liečenie vírusových ochorení, ako je napr. infekcia ECM, chrípka a ďalšia infekcia respiračného traktu, hepatitída a besnota. Tiež sa dá očakávať, že imunomodulačná aktivita, ktorú prejavujú fúzne proteíny podľa vynálezu sa využije na liečenie autoimunitných a zápalových ochorení, ako je napr. fibróza a roztrúsená mozgovomiechová skleróza. Schopnosť interferónu-beta-1a inhibovať vytváranie nových krvných ciev (t. j. inhibovať angiogenézu a neovaskularizáciu) predurčuje fúzne proteíny podľa vynálezu na použitie pri liečení angiogénnych ochorení, ako je napr. diabetická retinopatia, retinopatia predčasne narodených, makulárna degenerácia, odvrhnutie štepu rohovky, neovaskulárny glaukóm, retrolentálna fibroplázia, rubeóza a Osler-Weberov syndróm. Okrem toho antiendotelová aktivita interferónu je už nejaký čas známa a jeden z možných mechanizmov pôsobenia interferónu môže byť narušenie aktivity endotelových buniek tým, že inhibuje produkciu alebo aktivitu angiogénnych faktorov produkovaných nádorovými bunkami. Niektoré cievne nádory, ako napr. hemangiómy, sú zvlášť citlivé na liečenie interferónom. Liečenie interferónom alfa je zatiaľ jediným doloženým spôsobom liečenia tohto ochorenia. Možno očakávať, že liečenie fúznymi proteínmi interferónu-beta-1a podľa vynálezu poskytne značný farmaceutický prospech v zmysle zlepšenej farmakokinetiky a farmakodynamiky lebo konjugáty zostávajú v cievach po dlhší čas než nekonjugované interferóny, čo umožňuje oveľa účinnejšiu terapiu použitím konjugátov ako antiangiogénneho liečiva (pozri príklad 9).

Fúzie polymér-interferón-beta-1a podľa vynálezu môžu byť podávané samotné alebo vo forme farmaceuticky prijateľných esterov, solí alebo iných fyziologicky aktívnych derivátov. V týchto farmaceutických prípravkoch je interferón-beta-1a výhodne používaný spoločne s jedným alebo viac farmaceuticky prijateľnými nosičmi a voliteľne akýmkoľvek ďalšími terapeutickými zložkami. Nosič musí byť farmaceuticky prijateľný v tom zmysle, že musí byť kompatibilný s ostatnými zložkami v prípravku a nesmie byť nadmerne škodlivý pre príjemcu. Prípravok interferónu-beta-1a sa podáva v množstve účinnom na dosiahnutie požadovaného farmakologického účinku, ako už bolo opísané a takýchto čiastočných množstvá, aby bolo dosiahnuté požadovanej dennej dávky.

K vhodným liekovým formám patria formy na parentálne a iné podávanie, k vhodným špecifickým spôsobom podávania patria napr. podávanie perorálne, rektálne, bukálne, topické, nazálne, oftalmické, subkutánne, intramuskulárne, intravenózne, transdermálne, intratekálne, intraartikulárne, intraarteriálne, subarachoidálne, bronchiálne, lymfatické, vaginálne a intrauterne. Výhodné sú liekové formy na perorálne, nazálne a parentálne podávanie.

Pokiaľ je interferón-beta-1a použitý v prípravku, ktorý obsahuje tekutý roztok, prípravok sa výhodne podáva perorálne alebo parentálne. Pokiaľ je interferón-beta-1a použitý v prípravku, ktorý je vo forme tekutej suspenzie alebo suchého prášku formulovaný spoločne s biologicky kompatibilným nosičom, potom sa môže výhodne podávať perorálne, rektálne alebo bronchiálne.

Pokiaľ je interferón-beta-1a použitý v prípravku priamo ako pevná látka vo forme prášku, výhodne sa môže podávať perorálne. Alternatívne sa môže podávať nazálne alebo bronchiálne, pomocou nebulizácie prášku v nosičovom plyne, keď sa vytvára disperzia prášku v plyne, ktorú pacient vdychuje a síce použitím vhodného nebulizačného zariadenia.

Prípravky obsahujúce fúzne proteíny podľa predkladaného vynálezu sa výhodne formulujú do jednotkových liekových foriem a síce akýmkoľvek metódami, ktoré sú odborníkom vo farmácii známe. Tieto metódy všeobecne obsahujú krok, keď sa účinná zložka zmieša s nosičom a prípadne ďalšími pomocnými zložkami. Typicky sa prípravky pripravujú uniformným a dokonalým zmiešaním účinnej zložky (či viac účinných zložiek) s kvapalným nosičom, jemne rozotretým pevným nosičom alebo oboma a potom sa produkt podľa potreby formuluje do požadovaných liekových foriem.

Prípravky podľa vynálezu vhodné na perorálne podávanie sú v podobe diskretných jednotiek, ako sú napr. tobolky, oplátky, tablety alebo pastilky, kde každá takáto forma obsahuje predom stanovené množstvo účinnej zložky v podobe prášku alebo granulátu alebo v tekutej forme, vodnej alebo bezvodnej, ako je napr. sirup, elixír, emulzia alebo pena.

Tablety sa pripravujú lisovaním alebo odlieváním, prípadne s jednou alebo viac pomocnými zložkami. Lisované tablety sa pripravujú lisovaním na vhodných zariadeniach, kde sa používa účinná zložka vo voľnej sypkej forme, ako je prášok alebo granulát, ktorá sa prípadne miesi s nápojmi, uvoľňujúcimi činidlami, lubrikantmi a inertnými riedidlami, povrchovo aktívnymi činidlami a uvoľňovacími činidlami, odlievané tablety obsahujú zmes práškoveho polymérového konjugátu s vhodným nosičom a pripravujú sa odlieváním pomocou vhodného zariadenia.

Sirup sa pripraví pridaním účinnej látky do koncentrovaného vodného roztoku cukru, napr. sacharózy, ku ktorému sa pridajú ešte ďalšie pomocné prísady. K takýmto prísadám patria príchute, konzervačné činidlá,

čínidla spomaľujúce kryštalizáciu cukru a čínidla zvyšujúce rozpustnosť ostatných zložiek, ako sú napr. polyhydroxyalkoholy, ako je glycerol alebo sorbitol.

Liekové formy vhodné na parentálne podávanie výhodne obsahujú sterilné vodné prípravky aktívneho proteínu, ktoré sú výhodne izotonické s krvou príjemcu (napr. fyziologický soľný roztok). Takéto prípravky obsahujú tiež suspendujúce čínidla a zahusťovadlá alebo iné mikročasticové systémy, ktoré sú určené na zacielenie zlučiny na krvné zložky alebo do jedného či viac orgánov. Prípravky sú buď v jednodávkovej alebo viacdávkovej liekovej forme.

Prípravky vo forme nosného spreja obsahujú purifikované vodné roztoky aktívneho konjugátu s konzervačnými a izotonickými čínidlami. Tieto prípravky majú obvykle pH a tonicitu upravené tak, aby boli kompatibilné s nosnou sliznicou.

Liekové formy na rektálne podávanie sú obvykle čapíky, kde vhodným nosičom je kakaové maslo, hydrogenované tuky alebo hydrogenované mastné karboxylové kyseliny.

Oftalmické prípravky ako napr. očné kvapky sú pripravené podobne ako nosné spreje, s tým rozdielom, že pH a tonicita sú nastavené kompatibilne na oko.

Topické prípravky obsahujú konjugáty podľa vynálezu rozpustené alebo suspendované v jednom alebo viac mediách, ako je napr. minerálny olej, vazelína, polyhydroxyalkoholy alebo iná farmaceutická báza na topické prípravky.

Okrem uvedených zložiek môžu prípravky podľa vynálezu ešte ďalej obsahovať jednu alebo viac doplnkových zložiek, ako sú napr. riedidlá, pufre, príchute, rozvoľňujúce čínidla, povrchovo aktívne látky, zahusťovadlá, lubrikanty, konzervačné látky (vrátane antioxidantov) a ďalšie.

Teda predkladaný vynález poskytuje fúzne proteíny vhodné na *in vitro* stabilizáciu interferónu-beta-1a v roztoku, čo je príklad výhodnej inej než terapeutickú aplikáciu vynálezu. Fúzne proteíny môžu byť tiež využité na zvýšenie tepelnej stability a odolnosti proti enzymatickej degradácii interferónu-beta-1a a poskytujú tak spôsob, ako zvýšiť čas skladovateľnosti, stabilitu pri teplote miestnosti a trvanlivosť reagentov a súprav používaných na výskum.

Nasledujúce príklady slúžia na ilustráciu vynálezu a nijako jeho predmet neobmedzujú. Je zrejmé, že najmä tu opísané *in vivo* experimenty so zvieratami sa môžu uskutočniť rôznymi spôsobmi, takže sú možné rôzne modifikácie a variácie základných opísaných metód. Tak napr. v príklade 7 môže odborník použiť iný neopterinový test alebo môže zmeniť druh či počet primátov v pokuse. Všetky takéto modifikácie a variácie patria do rozsahu predkladaného vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Štúdie štruktúry/aktivity ľudského interferónu-beta-1a s použitím substitučných mutácií alanín/serín: analýza väzobných miest receptora a funkčných domén.

Prehľad

Uskutočnila sa obsiahla mutačná analýza ľudského interferónu-beta-1a (INF-beta-1a) s cieľom mapovať zvyšky nutné na aktivitu a väzbu receptora. Dostupnosť trojrozmernej (3-D) kryštálovej štruktúry ľudského IFN-beta (Karpusas, M. Et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 11813-11818) umožnila pôvodcom identifikovať substitúciu alanínu (alebo serínu) zvyškov vystavených rozpúšťadlu dostupných na receptorové interakcie a ponechať aminokyseliny zapojené do intramolekulárnych väzieb. Navrhol sa panel 15 alanínových substitúcií, ktoré nahradili 2 až 8 zvyškov v priebehu rozdielných oblastí každého helixu (A, B, C, D) a slučiek (AB, CD2, DE). Na účely afinitnej purifikácie bola začlenená aminokoncová histidínová značka obsahujúca 6 histidínových zvyškov, ako aj enterokinázová spojovacia sekvencia (linker) na odstránenie aminokoncovej extenzie. Výsledné interferóny sú nazývané ako „interferón(IFN)-beta so značkou his“ alebo „His-interferón-beta“ alebo „His₆-interferón-beta“ a pod.

Skonštruovali sa rôzne mutácie expresných plazmidov IFN-beta so značkou his s použitím génového konštruktu s divým typom IFN-beta ako templátu na mutagenézu. Stratégia mutagenézy vyžadovala najskôr vnesenie štiepneho miesta jedinečného restriktívneho enzýmu prostredníctvom génu IFN-beta so značkou his a potom nahradenie presných sekvencií DNA medzi vybranými restriktívnymi miestami syntetickými oligonukleotidovými duplexmi, ktoré kodovali alanínové (alebo serínové) substitučné mutácie. Nakoniec sa mutované gény IFB subklonovali do plazmidu, ktorý riadil expresiu cicavčích buniek v bunkovej línii 293 z ľudských obličiek.

Funkčné následky týchto mutácií sa hodnotili antivírusovými a antiproliferačnými testami. Bol vyvinutý nerádioaktívny väzbový test na IFN, ktorý analyzoval väzbu týchto mutantov na povrchový receptor („IFNAR1/2 komplex) buniek Daudi ľudského Burkittovho lymfómu. Navyše bol vyvinutý test na mapovanie povrchov pri interakciách medzi mutantmi his-IFN-beta a IFNAR2, ktorý používal fúzny proteín

IFNAR2/-Fc, zložený z extracelulárnej domény proteínu IFNAR2 receptora IFN fúzovanej na kľbovú doménu, doménam CH2 a CH3 ľudského IgG1.

1. Vytvorenie génu interferónu-beta ako templátu na mutagenézu

Pri stratégii pôvodcov na tvorenie mutantov IFN-beta substituovaných alanínom (alebo serínom) najskôr vznikol modifikovaný gén IFN-beta, ktorý kodoval proteín divého typu, ale ktorý niesol štiepne miesta jedinečných restriktčných enzýmov v géne. Jedinečné miesta boli použité na zmenu sekvencií divého typu syntetickými oligonukleotidovými duplexami, ktoré kodovali mutované kodóny. Aby sa získala expresná kazeta ľudského IFN-beta-1a vhodná na tvorbu mutovaných génov, bola cDNA IFN-beta (GenBank prístupové č. E00029) amplifikovaná pomocou PCR. Bolo nevyhnutné počiatočné klonovanie génu IFN-beta do plazmidu pMJB107, derivátu pACYC184, (pozri Rose, et. al., 1988, Nucleic Acids Res., 16(1), 355), aby sa mohla uskutočňovať miestne cielená mutagenéza génu v plazmide, ktorému chýbali špecifické restriktčné miesta vytvárané počas mutagenézy.

Priméry na PCR použité na subklonovanie kódujúcich sekvencií génu ľudského IFN-beta tiež umožnili pôvodcom zaviesť enterokinázovú spojovaciu sekvenciu v protismere a v rámci s génom IFN-beta:

5'-PCR primér:

5'-TTCTCCGGAGACGATGATGACAAGATGAGCTACAACCTGCTTGGATTCTACAAAGAAGC-3'
(sekvencia SEQ ID NO: 9: „BET-021“), a

3'-PCR primér:

5'-GCCGCTCGAGTTATCAGTTTCGGAGGTAACCTGTAAGTC-3'
(sekvencia SEQ ID NO: 10: „BET-022“)

A hraničnej oblasti miest restriktčných enzýmov (*BspEI* a *XhoI*) užitočné na klonovanie do miest plazmidu pMJB107. Výsledná DNA bola nazvaná PCR fragment A.

Výkonná signálna sekvencia z ľudskej adhézne molekuly cievej bunky-1 (VCAM-1) a značka („tag“) šiestich histidínov boli vnesené do konečného konštruktu z druhého fragmentu DNA vytvoreného z pDSW247 (fragment B). Plazmid pDSW247 je derivát pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), z ktorého bol odstránený gén EBNA-1, a ktorý nesie signálnu sekvenciu VCAM-1 (VCAMss) fúzovanú v protismere a v rámci so značkou šiestich histidínov. Priméry PCR, ktoré boli použité na vytvorenie kazetovej skupiny VCAMss-1/histidínová značka, boli KID-369 (5' PCR primér):

5'-AGCTTCCGGGGGCCATCATCATCATCATAGCT-3'

(sekvencia SEQ ID NO: 11) a KID-421 (3' PCR primér):

5'-CCGGAGCTATGATGATGATGATGGCCCCCGGA-3'

(sekvencia SEQ ID NO: 12) začleňujúce hraničné štiepne miesta restriktčných enzýmov (*NotI* a *BspEI*), ktorá umožnila excíziu fragmentu B DNA.

Na vytvorenie plazmidového vektora, ktorý niesol signálnu sekvenciu VCAM-1, značku his a gén interferón-beta, uskutočňovali pôvodcovia trojcestnú ligáciu s použitím DNA fragmentov purifikovaných cez gél z plazmidového vektora pMJB107 (štiepeného *NotI* a *XhoI*), PCR fragmentu A (štiepeného *BspEI* a *XhoI*) a fragmentu B (štiepeného *NotI* a *BspEI*). Ligovaný plazmid bol použitý na transformáciu buniek *E. coli* buď JA221 alebo XL1-Blue a boli vybrané kolónie rezistentné na ampicilín a testované na výskyt inzertov analýzou restriktčných máp. Bola izolovaná DNA pomocou Maxiprepu a sekvencia inzertu bola overená sekvenovaním DNA. Výsledný konštrukt bol nazvaný pCMG260.

2. Príprava mutantov ľudského interferónu-beta v pCMG260 substitúciou alanínu

Plazmid pCMG260 sa použil ako templát na niekoľkokrát opakovanú mutagenézu (U.S.E. Site Directed Mutagenesis Kit (Boehringer-Mannheim), ktorá zaviedla jedinečné restriktčné štiepne miesta do pozícií v priebehu kódujúcej sekvencie proteínu IFN-beta, ale nezmenila výslednú sekvenciu proteínu. Mutované plazmidy boli použité na transformáciu buď JA221 alebo XL1-Blue kmeňa *E. coli* a rekombinantné kolónie boli vybrané podľa rezistencie na chloramfenikol. Kolónie rezistentné na chloramfenikol sa ďalej testovali na výskyt požadovaného miesta jedinečného restriktčného enzýmu pomocou analýzy restriktčných máp DNA. Výsledný plazmid IFN-beta, pCMG275.8, obsahoval úplnú sadu jedinečných štiepných miest restriktčných enzýmov a DNA overila sa sekvencia génu. Kompletná sekvencia DNA modifikovaného génu interferón-beta so značkou his, spoločne s kódujúcou sekvenciou proteínu divého typu, sú uvedené na obrázku 1.

Kompletný súbor alanínových substitučných mutácií je uvedený v tabuľke 1 (SEQ ID NO: 60 a 45-59). Názvy mutantov špecifikujú štrukturálne oblasti (helixy a slučky), do ktorých boli vnesené mutácie. Panel všetkých mutácií alanínových (serínových) substitúcií má za následok mutácie 65 až 165 aminokyselín ľudského IFN-beta.

Panel mutantov bol vytvorený z pCMG275.8 nahradením segmentov DNA medzi jedinečnými restriktčnými miestami syntetickými oligonukleotidovými duplexami, ktoré niesli genetickú kódujúcu informáciu uvedenú v tabuľke 2. Aby sa vytvorili plazmidy s rôznymi alanínovými substitučnými mutantmi, ligovali sa

spolu vektor pCMG275.8 purifikovaný cez gél (štiepený príslušným restriktóznym enzýmom, ako je uvedené na zozname ďalej v texte, na každú štruktúrnu oblasť IFN- β) a oligonukleotidové duplexy (kódujúce sekvencie vlákien sú uvedené v tabuľke 2). Ligačné zmesi sa použili na transformáciu JA221 kmeňa *E. coli* a rekombinantné kolónie sa vybrali podľa rezistencie na ampicilín. Kolónie rezistentné na ampicilín boli testované na výskyt inzertov s mutáciami prostredníctvom skríningu na príslušné miesta restriktózných enzýmov. Na dva mutanty (A2 a CD2) stratégia klonovania vyžadovala použitie dvoch duplexov syntetických oligonukleotidov (uvedených v tabuľke 2), ktoré niesli komplementárne presahujúce konce, aby bolo možné ligovať ich k sebe navzájom a na kosť vektora IFN- β v trojcestnej ligácii. Nasledujúci zoznam ukazuje miesta, ktoré boli použité na klonovanie mutovaných oligonukleotidov z tabuľky 2. Schéma klonovania (pododiel B) ukazuje pozície týchto jedinečných miest v gène interferónu beta.

A helix *BspEI* až *MunI* alebo *BglII* až *PstI*
 Slučka AB *MunI* až *PstI* alebo *MunI* až *BsaHI*
 B helix *BspHI* až *BsaI* alebo *BsaHI* až *BsaI*
 C helix *BsaI* až *XbaI*
 Slučka CD2 *XbaI* až *BspHI* alebo *XbaI* až *DraIII*
 D helix *BspHI* až *DraIII*
 Slučka DE *BspHI* až *PvuI*
 E helix *PvuI* až *BstEII*

Tabuľka 1

Pozície alanínových substitučných mutácií ^{HU}IFN- β

	1	10	20	30	40	50
IFN- β	MSYNLLGFLQ	RSSNFQ	CKLLWQLNGR	LEYCLKDR	MNFDP	EEIKQLQ
A1	-A-AA--A--A					
A2			AA-AA-AA			
AB1				AAA-AA		
AB2					AA-A--A	
AB3						AAAAA-AAA
	helix A			AB loop		
	60	70	80	90	100	
IFN- β	DAALTIYEM	LQNLFAIF	RQDSSSTG	WNETTIVEN	LLANVYHQ	INHLKT
B1		-A-AS-				
B2			AAA-			
C1				AS-AA-S		
C2					A--A-AA	
CD1						AA-AAA
	helix B			CD loop		
	110	120	130	140	150	160
IFN- β	DFTRGALM	SSSLHLK	RYGRILHY	LKAKEYSH	CAWTTVR	VEILRN
CD2	AA-A--A--A					
D			A-AA--A			
DE1				AA		
DE2					AA	
E					A--A--A--A	
	CD loop		helix D		helix E	

K tab. 1: Riadok označený IFN- β ukazuje divý typ sekvencie ľudského IFN- β alanínové alebo serínové substitúcie zvyškov IFN- β sú ukázané pre každý mutant a čiarky, pod relevantnými oblasťami, označujú sekvencie divého typu. Štruktúry helixov a slučiek sú uvedené ako plné čiary pod mutantmi. Slučka DE preklenuje medzeru medzi helixmi D a E. Boli vytvorené dva ďalšie alanínové substitučné mutanty (H93A, H97A a H121A) a analyzovali sa v antivírusových testoch na stanovenie účinku mutácií týchto histidínov, ktoré tvoria cheláty so zinkom v kryštálovej štruktúre diméru. Oba tieto mutanty si podržali plnú aktivitu divého typu v antivírusových testoch, čo svedčí o tom, že zinkom sprostredkovaná tvorba diméru nie je dôležitá na aktivitu IFN- β .

Tabul'ka 2

A1	SEQ ID NO: 13 BET-053	CCGGAGACGATGATGACAAGATGGCTTACGCCGCTCTTGGAGCCCTACAAG CTTCTAGCAATTTTCAGTGTGAGAAGCTCCCTGTGGC
A2	SEQ ID NO: 14 BET-039	GATCTAGCAATGCTGCCTGTGCTGCCCTCCTGGCTGCCTTGAATGGGAGGC TTGAATACT
	SEQ ID NO: 15 BET-041	GCCTCAAGGACAGGATGAACCTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCA
AB1	SEQ ID NO: 16 BET-080	AATTGAATGGGAGGGCTGCAGCTTGCCTGCAGACAGGATGAACCTTGACAT CCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCA
AB2	SEQ ID NO: 17 BET-082	AATTGAATGGGAGGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGGCTGCATTTCCTAT CCCTGCAGGATTAAGCAGCTGCA
AB3	SEQ ID NO: 18 BET-084	AATTGAATGGGAGGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATGAACCTTGACA
	SEQ ID NO: 19 BET-086	TCCTTSAGGAGATTGCTGCAGCTGCAGCTTTCGCTGCAGCTGA
B1	SEQ ID NO: 20 BET-110	CGCCCGCTTGACCATCTATGAGATGCTGGCTAACATCGCTAGCATTTCAGA CAAGATTCTATGCACTGGCTGGAA
B2	SEQ ID NO: 21 BET-112	CGCCCGCTTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTGTCTATTTTCGCT GCAGCTTCTATGCACTGGCTGGAA
C1	SEQ ID NO: 22 BET-114	GGAAATGCTTCAATTGTTGCTGCAGCTCCTGAGCAATGCTATCATCAGATAAA CCATCTCAAGACAGTTCTAG
C2	SEQ ID NO: 23 BET-092	GGAAATGAGACCATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCGCTCATCAGATAGC ACATCTGGCTGCAGTTCTAG
CD1	SEQ ID NO: 24 BET-094	CTAGCTGCAGAACTGGCTGCAGCTGATTTACACAGGGGAAAACT
CD2	SEQ ID NO: 25 BET-096	CTAGAAGAAAACTGGAGAAGAAGCAGCTACCGCTGGAAAAGCAATGAGCG CGCTGCACCTGAAAAGA
	SEQ ID NO: 26 BET-106	TATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGAGTACTCAGACTGT
D1	SEQ ID NO: 27 BET-108	CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGGCAATTGCTGCATACCT GGCAGCCAAGGAGTACTCAGACTGT
DE1	SEQ ID NO: 28 BET-116	CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCT GAAGGCCGCTGCATACTCAGACTGTGCTGGACGAT
DE2	SEQ ID NO: 29 BET-118	CATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTG AAGGCCAAGGAGTACGCTGCATGTGCTGGACGAT
E1	SEQ ID NO: 30 BET-104	CGTCAGAGCTGAAATCCTAGCAAACTTTCATTTCATTGCAAGACTTACAG

B. konštrukcia expresných plazmidov EBNA 293

Gén divého typu a mutovaný gén IFN-beta, fúzované so signálnou sekvenciou VCAM-1, značkou his a enterokinázovou spojovacíou sekvenciou, boli purifikované cez gél ako restriktčné fragmenty *NotI* a *BamHI* s veľkosťou 761 bázových párov. Purifikované gény boli subklonované do plazmidového vektora pDSW247, čo je derivát pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), štiepeného *NotI* a *BamHI*, ako je ukázané v schéme. Plazmid pDSW247 je expresný vektor na prechodnú expresiu proteínu v bunkách EBNA 293 z ľudských obličiek (Invitrogen, Carlsbad, CA). Obsahuje cytomegalovírusový promótor skorého génu a EBV regulačné prvky, ktoré sú nevyhnutné na vysokú hladinu génovej expzie v tomto systéme, ako aj markery selekcie na *E. coli* (rezistencia na ampicilín) a na bunky EBNA 293 (rezistencia na hygromycín). Ligované plazmidy boli použité na transformáciu buď JA221 alebo XL1-Blue kmeňov *E. coli* a kolónie rezistentné na ampicilín boli vybrané a testované na výskyt inzertov analýzou restriktčných máp. Izolovala sa DNA pomocou maxiprepu a sekvencie inzertov sa overili sekvenovaním DNA. Pozitívne klony prejavujúce požadované mutované sekvencie boli použité na transfekciu buniek EBNA 293 ľudských obličiek tak, ako je opísané ďalej.

Všeobecné klonovacie a expresné stratégie sú uvedené na obrázku 12.

C. Expresia a kvantifikácia IFN-beta-1a alanínových substitučných mutantov

Ľudské bunky EBNA 293 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Chittenden, T. 1989, J. Virol. 63, 3016-3025) boli udržiavané ako subkonfluentné kultúry v Eagleho médiu modifikovanom podľa Dulbecca doplnenom 10 % fetálnym bovinným sérom, 2 mM glutamínom a 250 g/ml geneticínu (Life technologies, Gaithersburg, MD). Expresné plazmidy pDSW247 boli prechodne transfekované do buniek EBNA 293 s použitím protokolu s lipofektamínom (Gibco/BRL, Life Technologies). Kondicionované médiá sa odobrali 3 - 4 dni po transfekcii, zvyšky buniek sa odstránili centrifugáciou a koncentrácia his-IFN-beta bola kvantifikovaná testom ELISA.

ELISA sa uskutočnila použitím polyklonálnych králičích protilátok (metódou proteínu A purifikovanej IgG, protilátky boli pestované proti purifikovanému ľudskému IFN-beta-1a) na naviazanie na 96-jamkové doštičky na testy ELISA a biotinylovaná forma toho istého polyklonálneho králičieho IgG bola použitá ako sekundárna reagentia na umožnenie detekcie interferónu s použitím chrenovej peroxidázy konjugovanej so streptavidínom (HRP: Jackson Immuno Research, W. Grove, PA). Na vytvorenie štandardných kriviek koncentrácie bol použitý rad riedení interferónu-beta-1a. Kondicionované médiá z EBNA transfektant obsahujúce his-IFN-beta boli nariadené tak, aby sa získali vzorky s koncentraciami v rozmedzí od 10 ng/ml do 0,3 ng/ml v teste ELISA. Aby boli koncentrácie IFN-beta v médiu zistené testom ELISA potvrdené, bola uskutočnená analýza westernovým prenosom. Redukované supernatanty z tkanivových kultúr a štandardy IFN-beta-1a boli podrobené SDS-PAGE na géloch s gradientom 10 – 20 % (Novex, San Diego, CA) a prenesené na membrány PDVF. Imunoreaktívne pásy sa detegovali králičím polyklonálnym antisérom anti-IFN-beta-1a (č. 447, Biogen, Inc., druhé antisérum, ktoré bolo pestované proti IFN-beta-1a) a potom nasledovalo ošetrenie somárím proti-králičím IgG konjugovaným s HRP (Jackson ImmunoResearch, W. Grove, PA).

D. Hodnotenie mutantov interferónu-beta na väzbu na receptor

Vlastnosť viazať receptor mutantov interferónu-beta opísaných v časti C bola hodnotená použitím dvoch odlišných väzbových testov. Jeden test meral väzbu mutantov interferónu-beta na fúzny proteín, IFNAR2/Fc, zahrnujúci extracelulárnu doménu ľudského receptora IFNAR2 fúzanú na časť konštantnej oblasti ľudského IgG. IFNAR2-Fc bol exprimovaný v bunkách ovárií čínskeho škrečka (CHO) a purifikovaný prostredníctvom afinitnej chromatografie s proteínom A SepharoseTM podľa inštrukcií výrobcu (Pierce Chem. Co., Rockford, IL, kat. č. 20334). Väzba mutantov interferónu-beta na IFNAR2-Fc bola meraná v teste ELISA. Doštičky na test ELISA boli pripravené cez noc pri 4 °C naviazaním 50 µl/jamku myšej proti-ľudskej IgG1 monoklonálnej protilátky (CDG5-AA9, Biogen, Inc.) v koncentracii 10 g/ml vo väzbovom pufri (50 mM NaHCO₃, 0,2 mM MgCl₂, 0,2 mM CaCl₂, pH 9,6) na 96-jamkové doštičky s plochým dnom. Doštičky boli dvakrát premyté s PBS obsahujúcim 0,05 % Tween-20TM a blokové s 0,5 % netučným sušeným mliekom v PBS 1 hodinu pri teplote miestnosti. Po dvoch ďalších premytiach sa do každej jamky pridalo 50 µl 1 g/ml IFNAR2-Fc v 0,5 % mlieku v PBS obsahujúcom 0,05 % Tween-20TM a inkubované 1 hodinu pri teplote miestnosti a doštičky sa potom ešte dvakrát premyli. Väzba mutantov interferónu-beta na IFNAR2-Fc bola meraná pridaním 50 µl/jamku mutantov interferónu-beta v kondicionovanom médiu, sériovo riedenom Eagleho médiom modifikovaným podľa Dulbecca (DMEM) doplnenom 10 % fetálnym bovinným sérom a inkubáciou 2 hodiny pri 4 °C. Riedenie mutantov interferónu-beta sa typicky pohybovalo od približne 1 M dolu k 10 pM. Na premytie bol interferón-beta naviazaný na doštičky detegovaný pridaním 50 µl/jamku zmesi skladajúcej sa z 1 : 1000 riedenej králičej polyklonálnej anti-interferónovej protilátky (č. 447) plus somárieho proti-králičieho IgG značeného chrenovou peroxidázou (HRP) (Jackson ImmunoResearch) a uskutočňovala sa inkubácia 15 minút pri 4 °C. Po dvoch premytiach bol pridaný HRP substrát a doštička sa inkubovala pri 4 °C pred odpočtom na čítacom zariadení na doštičky ELISA pri absorbancii 450 nm. Dáta sa vyniesli ako absorbancia proti koncentracii mutantov interferónu-beta a afinita väzby mutantov interferónu-beta na IFNAR2-Fc sa určila vynesением dát do jednoduchšej hyperbolickej väzobnej rovnice. Výsledky z týchto analýz sú ukáza-

né na obrázku 3, na ktorom je väzobná afinita každého mutantu, zisťovaná aspoň v troch nezávislých pokusoch, vyjadrená ako percento afinity meranej pre His₆-divý typ interferónu-beta-1a. Druhý test väzby receptora bol použitý na meranie afinity, s ktorou sa mutanty interferónu-beta viažu na bunky Daudi exprimujúce oba receptorové reťazce, IFNAR 1 a IFNAR 2, ktoré dohromady obsahujú receptor pre interferón-beta. Tento test založený na FACS používal blokujúcu monoklonálnu protilátku namierenú proti extracelulárnej doméne IFNAR1, EA12 (Biogen, Inc.) na odlišenie neobsadeného (voľného receptora od receptora, na ktorý bol naviazaný interferón-beta. Bunky Daudi (20 µl pri 2,5 x 10⁷ buniek/ml) boli nanosené na 96-jamkové doštičky pre test ELISA s dnom v tvare V a inkubované 1 hodinu pri 4 °C s rôznymi koncentraciami mutantov interferónu-beta (20 µl v pufrí FACS, 5 % FBS, 0,1 % NaN₃ v PBS). Žiaduce sériové riedenia mutantov interferónu-beta sa pohybovali v rozmedzí od 0,5 M do 0,5 pM. Ku každej jamke sa pridalo 100 ng biotinylovanej myšej anti-IFNAR1 monoklonálnej protilátky EA12 (10 µl) a doštičky sa inkubovali ďalšie dve minúty pri teplote miestnosti pred dvojitém premytím pufrim FACS (4 °C). Potom sa bunky inkubovali 30 minút pri 4 °C s 50 µl/jamku 1 : 200 nariadeného streptavidínu konjugovaného s R-fykoerytrínom (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), dvakrát premyté pufrim FACS, resuspendované v 300 µl pufru FACS obsahujúcom 0,5 % paraformaldehyd a prenesené do polystyrénových skúmaviek 12 x 75 (Falcon 2052). Potom sa vzorky analyzovali prietokovou cytometriou na prístroji FACScan (Becton Dickinson). Dáta sa vyniesli do grafu ako priemerná intenzita fluorescencie kanálu (MFCI) proti koncentracii mutantov interferónu-beta, väzbové afinity boli definované ako koncentrácia mutantov interferónu-beta poskytujúca 50 % inhibície zafarbenia protilátky. Každá mutácia sa testovala niekoľkonásobne. Obrázok 2 ukazuje väzbovú afinitu na receptor na každý mutant interferónu-beta, zistený touto metódou, vyjadrenou ako percento afinity meranej pre His₆-divý typ interferónu-beta-1a v každom pokuse.

E. Hodnotenie funkcie mutantov interferónu-beta

Mutanty interferónu-beta boli tiež testované na funkčnú aktivitu s použitím *in vitro* testov na antivírusovú aktivitu a na schopnosť interferónu-beta inhibovať bunkovú proliferáciu. Na každom mutante boli uskutočnené minimálne tri antivírusové testy, každý v troch opakovaníach. His₆-divý typ interferónu-beta-1a bol do každého pokusu zahrnutý ako referencia. Antivírusové testy sa uskutočnili ošetrovaním buniek A549 z ľudského pľúcneho karcinómu (ATCC CCL 185) cez noc dvojkovým sériovým riedením mutantov interferónu-beta v koncentraciách, ktoré preklenuli rozsah medzi plnou antivírusovou ochranou a žiadnou ochranou pred usmrtením buniek vírusom. Nasledujúci deň boli bunky stimulované v čase dvoch dní vírusom encefalomyokarditidy (ECMV) v riedení, ktoré malo za následok úplnú smrť buniek pri chýbaní interferónu. Doštičky potom boli vyvíjané s metabolickým farbivom MTT (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenyl]-2H-tetrazólium-5-karboxyanilid) (M-5655, Sigma, St. Louis, MO). Zásobný roztok MTT sa pripravil v koncentrácii 5 mg/ml v PBS a sterilizovaný filtráciou a 50 µl tohto roztoku bolo nariadené do tkanivových kultúr (100 µl na jamku). Po inkubácii pri teplote miestnosti počas 30-60 minút bol roztok MTT/médium odstránený, bunky boli premyté s 100 µl PBS a nakoniec bola metabolizovaná farba solubilizovaná v 100 µl 1,2N kyseliny chlorovodíkovej v 90 % izopropanolu. Životaschopné bunky (ako je dokázané prítomnosťou farbiva) boli kvantifikované pri absorbancii pri 450 nm. Dáta boli analyzované vnesením do grafu absorbancie proti koncentracii mutantov interferónu-beta a aktivita každého mutantu bola definovaná ako koncentrácia, v ktorej bolo usmrtené 50 % buniek. Obrázok 5 ukazuje aktivitu každého mutantu vyjadrenú ako percento aktivity meranej pre divý typ interferónu-beta-1a so značkou his v každom pokuse.

U mutantov interferónu-beta bola tiež hodnotená funkcia v antiproliferačnom teste. Bunky Daudi ľudského Burkittovho lymfómu (ATCC č. CCL 213) boli vysiate v koncentrácii 2 x 10⁵ buniek/ml v RPMI 1620 doplnenom 10 % definovaným fetálnym teľacím sérom (Hyclone, Logan, Utah) a 2 mM L-glutamínom. Každá jamka tiež obsahovala danú koncentráciu mutantov interferónu-beta v konečnom celkovom objeme 100 µl média na jamku, použité koncentrácie interferónu-beta boli vybrané tak, aby preklenuli rozsah od maximálnej inhibície proliferácie Daudi buniek k žiadnej inhibícii (t. j. plná proliferácia). Každá koncentrácia testovaných mutantov interferónu-beta bola použitá v duplikátoch a vo všetkých pokusoch bola zaradená séria neošetrených buniek v duplikátoch. Bunky boli inkubované dva dni pri 37 °C, v inkubátoroch s 5 % CO₂ a potom sa do každej jamky pridalo 1 Ci tymidínu s trícium ((metyl-³H) tymidín, Amersham TRK758) v 50 µl média a inkubovaný ďalšie 4 hodiny. Bunky sa odobrali s použitím prístroja LKB na odber buniek z doštičiek a merala sa inkorporácia tymidínu s trícium použitím čítacieho zariadenia na doštičky LKB beta. Duplikáty experimentálnych hodnôt boli spriemerované a určené ako štandardné odchýlky. Dáta boli vynesené do grafu ako priemerné počty za minútu proti koncentracii mutantov interferónu-beta a aktivita každého mutantu bola definovaná ako koncentrácia požadovaná poskytnúť 50 % maximálnej pozorovanej inhibície rastu. Pre každý mutant boli uskutočnené niekoľkonásobné testy. Obrázok 6 ukazuje výsledky vyjadrené ako percento aktivity nájdennej pre divý typ interferónu-beta-1a so značkou his v každom pokuse.

F. Vlastnosti mutantov interferónu-beta

Bolo zistené, že divý typ interferónu-beta-1a s histidínovou značkou mal v antivírusových a antiproliferačných testoch aktivitu, ktorá bola približne 3-krát nižšia ako zodpovedajúca aktivita nájdená u naznačeného divého typu interferónu-beta-1a. Pretože zo všetkých mutantov interferónu-beta obsahovali A1-E na svojich N-koncoch totožnú sekvenciu značky his, boli účinky mutácií na vlastnosti molekuly určené porovnaním aktivít týchto mutantov v antivírusových, antiproliferačných a väzbových testoch s aktivitou pozorovanou na divý typ interferónu-beta-1a so značkou his. Pri uskutočňovaní tohto porovnávania pôvodcovia predpokladali, že odchýlky aktivít mutantov A1-E, v porovnaní s divým typom interferónu-beta-1a so značkou his sú kvalitatívne a kvantitatívne približne rovnaké, ako účinok, ktorý by tiež mutanty mali v neprítomnosti N-koncovej značky his. Zodpovedajúci predpoklad na značené alebo fúzne konštrukty iných rozpustných cytokínov je všeobecne predpokladaný za platný odborníkmi pracujúcimi s technikou alanínovej skenovacej mutagenézy („alanine scanning mutagenesis“), hlavne keď *in vitro* funkčná aktivita značeného alebo fúzneho konštruktu je blízka aktivite divého typu cytokínu, ako je tomu v tomto prípade (pozri napr. Pearce, K. H. Jr., et al., J. Biol. Chem., 272, 20595-20602, 1997 a Jones, J. T., et. Al., J Biol. Chem. 273, 11667-11674, 1998).

Dáta ukázané na obrázkoch 3-6 naznačujú tri typy účinku, ktorý bol vyvolaný cieľenou mutagenézou. Tento účinok môže byť výhodný na vývoj interferónových liečiv za istých okolností. Tieto tri typy účinku sú: a) mutanty s vyššou antivírusovou aktivitou, než je aktivita divého typu interferónu-beta-1a (napr. mutantu C1), b) mutanty, ktoré prejavujú aktivitu v oboch testoch, antivírusovom alebo proliferačnom, ale u ktorých je antiproliferačná aktivita disproporčne nízka vzhľadom na antivírusovú aktivitu v porovnaní s divým typom interferónu-beta-1a (napr. mutanty C1, D a DE1) a c) funkčné antagonizmy (napr. A1, B2, CD2 a DE1), ktoré vykazujú antivírusovú a antiproliferačnú aktivitu, ktorá je disproporčne nízka vzhľadom na väzbu receptora v porovnaní s divým typom interferónu-beta-1a. Je možné pozorovať, že niektoré mutanty patria do viac ako jednej skupiny. Tieto skupiny sú uvedené v prehľade ďalej. Aj keď pôvodcovia charakterizovali tieto skupiny mutantov vzhľadom na tieto príklady uvedené v zozname, je nutné si uvedomiť, že ďalšia mutácia v týchto oblastiach môže mať za následok podobný alebo dokonca zvýšený vplyv na aktivitu:

a) Mutant C1 má antivírusovú aktivitu, ktorá je približne 6-krát väčšia ako aktivita divého typu interferónu-beta-1a so značkou his. Predpokladá sa, že tento mutant a ďalšie rovnakého typu sú užitočné na zníženie množstva interferónu-beta, ktorý musí byť podávaný na dosiahnutie daného stupňa antivírusového účinku. Očakáva sa, že zníženie množstva podávaného proteínu zredukuje imunogenicitu proteínu a môže tiež znížiť vedľajšie účinky toxicity, ktorá nie je založená na mechanizme účinku. Predpokladá sa, že mutácie v tejto skupine sú výhodné v situáciách, keď terapeutický prospech podávania interferónu-beta vyplýva z jeho antivírusových účinkov a keď antiproliferačné účinky prispievajú k toxicite alebo nežiaducim vedľajším účinkom.

b) Relatívne aktivity (% divého typu) alanínových substitučných mutantov v antivírusovom a antiproliferačnom teste sú porovnané na obrázku 7. U väčšiny mutantov (ktoré sú uvedené na diagonálnej čiare) možno pozorovať koordinovane zmenené aktivity (t. j. antivírusové a antiproliferačné aktivity, ktoré sa líšia o rovnaký faktor od aktivít divého typu interferónu-beta-1a so značkou his). Ale niekoľko mutantov vykazuje väčšie odchýlky v aktivite v jednom teste relatívne k druhému, v porovnaní s divým typom interferónu-beta-1a so značkou his, ako je dokázané posunom od diagonálnej línie. Tieto tri mutanty sú uvedené v tabuľke ďalej. Mutant C1 vykazuje antivírusovú aktivitu, ktorá je ~6-krát väčšia, ako je aktivita divého typu interferónu-beta-1a so značkou his, ale jeho aktivita v antiproliferačnom teste je podobná aktivite divého typu. Mutant C1 má teda antivírusovú aktivitu, ktorá je zvýšená faktorom 5,2 proti jeho antiproliferačnej aktivite, relatívne k divému typu interferónu-beta-1a so značkou his. Podobne mutant D prejavuje 65 % aktivity divého typu v antivírusovom teste, ale iba 20 % aktivity divého typu v antiproliferačnom teste a teda má antivírusovú aktivitu, ktorá je zvýšená 3,4-krát oproti jeho antiproliferačnej aktivite v porovnaní s divým typom. Mutant DE1 prejavuje 26 % aktivity divého typu v antivírusovom teste, ale iba 8,5 % v antiproliferačnom teste a má teda antivírusovú aktivitu, ktorá je zvýšená 3,0-krát oproti jeho antiproliferačnej aktivite v porovnaní s divým typom interferónu-beta-1a so značkou his. Keď sú podávané v koncentrácii postačujúcej na dosiahnutie požadovaného stupňa antivírusovej aktivity, ukazujú tieto mutanty proteínov podstatne nižšiu úroveň antiproliferačnej aktivity, ako je proteín divého typu. Predpokladá sa, že mutácia v tejto skupine, ako tie v skupine a) sú výhodné v situáciách, keď terapeutický prospech podávania interferónu-beta vyplýva z jeho antivírusových účinkov a keď antiproliferačné účinky prispievajú na toxicitu alebo nežiaduce vedľajšie účinky.

Mutant	Antivírusová (AV) aktivita (% divého typu)	Antiproliferačná (AP) aktivita (% divého typu)	AV/AP
C1	571	109	5,2
D	65	19	3,4
DE1	26	8,5	3,0

c) Mutanty s antivírusovou a antiproliferačnou aktivitou, ktorá je nízka vzhľadom na väzbu receptora, v porovnaní s divým typom interferónu-beta-1a so značkou his (pozri tabuľku). Mutant A1 prejavuje antivírusovú a antiproliferačnú aktivitu, ktoré sú 2,0-krát a 1,8-krát väčšie ako aktivity pozorované u divého typu interferónu-beta-1a so značkou his, ale viaže sa na analogický receptor na bunkách Daudi s afinitou, ktorá je 29-krát väčšia, ako je u divého typu. Väzba tohto mutantu na receptor IFN-beta je teda zvýšená približne 15-krát v porovnaní s antivírusovou a antiproliferačnou aktivitou proteínu. Podobné mutanty B2, CD2 a DE1 vykazujú zvýšenie väzby proti antivírusovej aktivite 4,6-, 4,6- a 18-krát, podľa poradia, a proti antiproliferačnej aktivite 3,5-, 15- a 54-krát. Predpokladá sa, že tieto proteíny sú užitočné ako funkčné antagonisy aktivity endogenného IFN-beta a možno aj ďalších endogenných interferónov typu I, pretože majú schopnosť viazať a obsadiť receptor a navyše vyvolať iba malú časť funkčnej odpovede v cieľových bunkách, aká by bola pozorovaná u divého typu IFN-beta.

Mutant	Antivírusová aktivita (AV) (% hmotn.)	Antiproliferačná aktivita (AP) (% hmotn.)	Väzobná aktivita na bunky (% hmotn.)	Väzba/AV	Väzba/AP
A1	200	180	2900	15	16
B2	7,1	9,2	33	4,6	3,5
CD2	150	46	690	4,6	15
DE1	26	8,5	460	18	54

G. Vzťah muteínu k trojrozmernej štruktúre interferónu

Zatiaľ čo publikované kryštálové štruktúry neglykozylovanej formy myšieho interferónu-beta (T. Senda, S. Saitoh a Y. Mitsui, Refined Crystal Structure of Recombinant Murine Interferon- at 2.15 Resolution, J. Mol. Biol., 253, 187-207, 1995) a ľudského interferónu alfa-2b (R. Radhakrishnan, L. J. Walter, A. Hruza, P. Reichert, P. P. Trotta, T. L. Nagabhushan a M. R. Walter, Zinc Mediated Dimer of Human Interferon-2b Revealed by X-ray Crystallography, Structure, 4, 1453-1463, 1996) poskytli modely na polypeptidovú kostru ľudského interferónu-beta, pôvodcovia nedávno doriešili štruktúru interferónu-beta-1a v jeho glykozylovanom stave (M. Karpusas, M. Nolte, C. B. Benton, W. Meier, W. N. Lipscomb a S. E. Goelz, The Crystal Structure of Human Interferon- at 2.2 Resolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 11813-11818, 1997).

Výsledky mutačných analýz pôvodcov môžu byť zhrnuté vzhľadom na trojrozmernú štruktúru interferónu-beta-1a (neuvadené). Niektoré mutácie vyvolali zníženie aktivity (2- až 5-krát znížené). Mutované oblasti zodpovedali substitúciám uvedenými v tabuľkách 1 a 2.

Mutácie, ktoré sú najvýznamnejšie, čo sa týka ich účinku na funkciu, mali za následok dramatické zníženie tak aktivity, ako aj väzby bunkového povrchového receptora. Mutácie v tejto oblasti (A2 helix, AB a AB2 slučky a E helix) zodpovedajú mutáciám vo väzbovom mieste IFNAR2, pretože žiadny z týchto mutantov neviazal v testoch pôvodu IFNAR/Fc.

Aj keď tieto mutácie, ktoré boli dôležité na väzbu IFNAR2, tiež ovplyvnili bunkovú väzbu, väzbové vlastnosti bunkového povrchu sú tiež ovplyvnené zvyšky v ďalších oblastiach molekuly (B1 helix, C2 helix). Na trojrozmerných modeloch (neuvadených), ktoré zobrazujú pôsobenie alanínových substitučných mutantov, je možné pozorovať, že N-koncová oblasť, C-koncová oblasť a glykozylovaná oblasť C helixu molekuly IFN-beta-1a neleží vo väzbovom mieste receptora. Mutácie v týchto oblastiach neznížili biologickú aktivitu alebo väzbu bunkového povrchového receptora.

Príklad 2

Konštrukcia plazmidov na expresiu fúzneho proteínu interferón-beta-1a (IFN-beta/Fc)

Na vytvorenie expresného plazmidu bola použitá technológia PCR kódujúceho DNA sekvenciu ľudského IFN-beta fúzanú na Fc časť molekuly ťažkého reťazca myšieho IgG2a. Plazmidový vektor pDSW247 (pozri príklad 1) je derivát pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), z ktorého bol odstránený gén EBNA-1. Tento plazmid bol použitý na konštrukciu expresného vektora na prechodnú expresiu proteínu v bunkách EBNA 293 z ľudských obličiek (Invitrogen, Carlsbad, CA, Shen, E. S., et. Al., 1995, Gene, 156, 235-239). Navrhol sa tak, aby obsahoval signálnu sekvenciu ľudskej adhézne molekuly cievej bunky I (VCAM-1) v rámci a v protismere od sekvencie interferónu beta a sekvencií Ig.

Expresná kazeta fúzneho proteínu bola zostavená z niekoľkých fragmentov DNA. Aby sa získal fragment DNA kódujúci ľudský gén IFN-beta, bol použitý cDNA subklon ľudského IFN-beta (GenBank prístupové č. E00029) ako templát na PCR s použitím priméru:

5'-GGTGGTCTCATGAGCTACAACCTTGCTTGGATTCTACAAAGAAGC

(sekvencia SEQ ID NO: 31: „BET-025“) a

5'-GCCCTCGAGTCGACCTTGTCATCATCGTCGTTTCGGAGGTAACCTGTAAG

(sekvencia SEQ ID NO: 32: „BET -026“),

ktoré tiež obsahovali štiepne miesto restriktčného enzýmu (*BsaI*) v protismere od prvého kodónu IFN-beta. 3'PCR primér (sekvencia SEQ ID NO: 32 BET-026) pre gén IFN-beta eliminoval terminančný kodón IFN-beta a inkorporoval ako do rámca enterokinázovej spojovacej sekvencie (DDDDK) (SEQ ID NO: 62) tak terminálne miesto restriktčného enzýmu (*XhoI*), použiteľné na subklonovanie do expresného vektora. Miesto *BsaI* zavedené v protismere od kódujúcej sekvencie IFN-beta umožnilo pôvodcom ligovať signálnu sekvenciu VCAM-1 do protismere a v rámci s kódujúcou sekvenciou génu IFN-beta. Táto signálna sekvencia VCAM-1 bola tiež vytváraná pomocou PCR s použitím párov primérov:

5'-CAAGCTTGCTAGCGGCCGCGG-3' (sekvencia SEQ ID NO: 33: „BET-023“ a

5'-GGTGGTCTCACATGGCTTGAGAAGCTGC-3' (sekvencia SEQ ID NO: 34: „BET-024“), ktoré obsahovali 5'-štiepne miesto restriktčného enzýmu (*NotI*, na ligáciu do klonovacieho miesta *NotI* v pDSW247) a 3'-štiepne miesto restriktčného enzýmu (*BsaI*, na ligáciu do 5'-PCR fragmentu interferónu-beta-1a). Templátom na PCR bola cDNA ľudskej adhéznej molekuly cievnej bunky I (VCAM-1) (GenBank prístupové číslo X53051).

Aby bol vytvorený fúzny gén IFN-beta-1a/Fc, boli uskutočnené nasledujúce postupy. Fragment myšieho IgG2a sa odstránil z pEAG293 gélovou purifikáciou DNA fragmentu po štiepení *SalI* + *BamHI*. Plazmid pEAG293 je subklon kľbovej domény, domén CH2 a CH3 myšieho IgG2a (GenBank prístupové číslo V00798) v Bluescript IISK+ (Stratagene, LaJolla CA, katalóg. Č. 212205). Nasledujúce páry primérov na PCR:

5'-AGGTSMARCTGCAGSAGTCW-3' (sekvencia SEQ ID NO: 35), kde S=C alebo G, M=A alebo C, R=A alebo G, W=A alebo T a

5'-CTGAGCTCATTTACCCGGAGTCCGGGAGAAGCTCTT-3' (sekvencia SEQ ID NO: 36) vytvorili hraničné miesta *SalI* a *NotI* na 5'- a 3'-konci kazety, v príslušnom poradí. Kazeta myšej domény IgG2a Fc sa líši od sekvencie z GenBank v jednej báze (kodón V369), vytvárajúca umlčanú mutáciu. Z tejto IgG2a Fc kazety je teda exprimovaný divý typ proteínu Fc.

DNA fragment obsahujúci signálnu sekvenciu VCAM-1 fúzanú na gén ľudského IFN-beta s C-koncovou enterokinázovou spojovacou sekvenciou bol vystrihnutý z pCMG258 štiepením s *NotI* až *BamHI* a purifikovaný na géli. Miesto *SalI* sa vyskytovalo na pôvodnom plazmide pDSW247 a je lokalizované hneď v smere a v rámci s kódujúcou sekvenciou IFN-beta. Plazmidový vektor pDSW247 bol pripravený purifikáciou na géli fragmentu *NotI* + *BamHI* (pozri príklad 1). Aby sa zostavil konečný expresný vektor kódujúci fúziu IFN-beta-1/IgG2, uskutočnila sa trojcestná ligácia s použitím uvedených fragmentov. Tento expresný plazmid bol nazvaný pCMG261 a obsahoval signálnu sekvenciu VCAM-1 vo fúzii s génom pre zrelý ľudský IFN-beta, enterokinázovú spojovaciu sekvenciu a Fc doménu myšieho IgG2a. Kompletná DNA (sekvencia SEQ ID NO: 1) a proteínová (sekvencia SEQ ID NO: 2) sekvencia fúzneho proteínu sú uvedené na obrázku 2.

Príklad 3

Produkcia fúzneho proteínu interferónu-beta-1a v cicavčích bunkách

Expresný vektor rekombinantného IFN-beta/Fc, pCMG261, bol prechodne transfekovaný do buniek EBNA 293 z ľudských obličiek, aby bola dosiahnutá expresia fúzneho proteínu IFN-beta-1a podľa vynálezu. Tento rekombinantný expresný plazmid bol transfekovaný podľa lipofektamínového protokolu (katalóg. č. 18324-020, Life Technologies) do buniek EBNA 283 z ľudských obličiek podľa protokolu výrobcu (Life Technologies, Gaithersburg, MD, Hawley-Nelson, P., Ciccarone, V., Gebeyehu, G. Jessee, J., Felgner, P. L., 1993, Focus 15.73) s použitím 1 až 3 g plazmidovej DNA na 100 mm misky na tkanivové kultúry na bunky EBNA 293. Deň po lipofektamínovej transfekcii buniek boli médiá nahradené rastovým médiom (Eagleho médiom modifikovaným podľa Dulbecca, 10 % fetálne bovinné sérum, 4 mM glutamín, 250 g Gentecínu/ml (Life Technologies, Gaithersburg, MD)). Kondicionované médiá boli odobraté 3 až 4 dni neskôr a určili sa koncentrácie IFN-beta-1-Fc tak, ako je opísané.

Produkcia fúzneho proteínu IFN-beta/Fc v iných cicavčích bunkách a expresných systémoch na prokaryotické bunky sa môže tiež uskutočniť po prenesení proteínovej kódujúcej oblasti pre fúzny proteín do príslušných expresných vektorov na tieto systémy. Alternatívne expresné systémy zahŕňujú cicavčie bunkové expresné systémy, ako sú napríklad bunky ovárií čínskeho škrečka (CHO) (Barsoum, J., 1995, Methods v Mol. Biol. 48, kapitola 18, 225-237) a myšie bunky NS-O (Rossman, C. Et. At., 1996, Protein Expression and Pur., 7, 335-342) a bunky obličiek opice COS7 (Ettinger, R. Et. Al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:23, 13102-13107). Ďalšie eukaryotické expresné systémy, ktoré by mohli byť použiteľné, sú kvasinky *Pichia pastoris* (Eldin, P. E. et. Al., 1997, I. Immun. Methods, 201, 67-75) a *Saccharomyces cerevisiae* (Horwitz, A. H., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8678-8682).

Kvantifikácia stupňa exprese proteínu IFN-beta-1a-Fc v tkanivových supernatantoch z transfekovaných buniek EBNA 293 sa uskutočnila pomocou testu ELISA s použitím IgG frakcie králičích polyklonálnych protilátok anti-IFN-beta-1a purifikovaných metódou proteínu A (antigén bol purifikovaný IFN-beta-1a, Biogen, Inc.) na naviazanie na 96-jamkové doštičky. Protilátka deteguje štandardy IFN-beta-1a a tkanivé supernatanty v rozmedzí koncentrácie interferónu medzi 10 ng/ml a 0,3 ng/ml. Na detekciu naviazaných inter-

ferónov sa použili biotinylované králičie polyklonálne anti-IFN-beta-1a (rovnaké protilátky, ako je uvedené) a chrenová peroxidáza konjugovaná so streptavidínom. Na potvrdenie hodnôt získaných z testu ELISA sa uskutočnila analýza westernovým prenosom, keď redukované tkanivové supernatanty a štandardy IFN-beta-1 boli separované na 5 - 20 % Tris-glycinových géloch (Novex, San Diego, CA), prenesené na membrány PVDF (Amersham Life Science, Inc., Cleveland, OH) a detegované odlišným králičím polyklonálnym sérom (pestovaným proti IFN-beta-1a) a potom nasledovali somárie proti-králičie IgG protilátky konjugované s chrenovou peroxidázou (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA).

Príklad 4

10 Antivírusová aktivita fúzneho proteínu IFN-beta-1a/myšia IgG2a

Bunky ľudského pľúcneho karcinómu (A549) boli najskôr ošetrované 24 hodín s IFN-beta-1a alebo IFN-beta-myši IgG2a (61, 41, 27, 18, 12, 8,2, 5,5, 3,7, 2,5, 1,6 pg/ml) pred stimuláciou vírusom encefalomyokarditidy (EMCV). Po dvojdennej inkubácii s vírusom boli živé bunky farbené roztokom XTT:PMS (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazólium-5-karboxanilid, vnútorná soľ: fenazinmetosulfát, v koncentrácii 333 g/ml a 2 ng/ml, v danom poradí, v pufrovanom soľnom roztoku) a detegované spektroskopiou v 450 nM. Test sa uskutočnil trojnásobným opakovaním na každú koncentráciu IFN. Na obrázku 8 sú ukázané štandardné odchýlky ako súvislé úsečky. Bolo zistené, že 50 % cytopatický účinok na IFN-beta-1a bol približne 0,4 pM. Pre IFN-beta myši IgG2a bol 50 % cytopatický účinok 0,15 pM.

20 Príklad 5

Konštrukcia a produkcia fúzneho proteínu „ľudský interferón beta-1a/ľudský IgG1 Fc“

A. Konštrukcia fúzneho proteínu ľudský interferón beta-1a/ľudský IgG1 Fc

PCR technológia bola použitá na vytvorenie expresného plazmidu kódujúceho DNA sekvenciu ľudského IFN beta fúzovanou s časťou Fc (kľbová doména, domény CH2 a CH3) molekuly ťažkého reťazca ľudského IgG1.

EBNA konštrukt:

Plazmidový vektor pCH269 je derivát pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), z ktorého bol odstránený gén EBNA-1. Plazmid sa použil na konštrukciu expresného vektora použiteľného na prechodnú expresiu proteínu v bunkách EBNA 293 z ľudských obličiek (Invitrogen, Carlsbad, CA, Shen, E. S., et. al., 1995, Gene, 156, 235-239).

Expresná kazeta fúzneho proteínu bola zostavená z troch fragmentov DNA: fragment *NotI/SalI* kódujúci signálnu sekvenciu VCAM-1 v rámci a fúzanú so sekvenciou kódujúcou ľudský IFN beta, fragment *SalI/NotI* kódujúci kľbovú doménu, domény CH2 a CH3 ľudského IgG1 a fragment *NotI* EBNA expresného vektora pCH269.

Dva nezávislé fragmenty *NotI/SalI* kódujúce zrelú signálnu sekvenciu VCAM-1 v rámci a fúzanú na gén ľudského IFN beta boli vytvorené technológiou PCR. PCR templát bol plazmid pCMG258 (pozri príklad 2), ktorý kóduje zrelú signálnu sekvenciu VCAM-1 v rámci a fúzanú na gén ľudského IFN beta, ktorý sám je tiež v rámci a fúzaný na enterokinázovú spojovaciu sekvenciu. Použili sa dve sady primérov na PCR.

Jedna sada primérov:

5'-AGCTTGCTAGCGGCCGCGGCCTCACTGGCTTCA-3' (sekvencia SEQ ID NO: 37) a

5'-ATACGCGTCGACGTTTCGGAGGTAACATGTAAGTCTG-3' (sekvencia SEQ ID NO: 38) vniesla zmenu aminokyselín od G do C v pozícii 162. Tento fragment bol nazvaný ľudský IFN beta-C 162. Druhá sada primérov:

5'-AGCTTGCTAGCGGCCGCGGCCTCACTGGCTTCA-3' (sekvencia SEQ ID NO: 39) a

5'-TACACGTCGACGCTGCCACCACCGCCGTTTCGGAGGTAACATGTAAGTCTG-3' (sekvencia SEQ ID NO: 40) tiež zaviedla substitúciu aminokyselín G162 až C162 a zmenila enterokinázovú spojovaciu sekvenciu (DDDDK) (SEQ ID NO: 62) na GGGGS (SEQ ID NO: 64) spojovaciu sekvenciu v rámci a fúzanú na ľudský gén IFN beta. Tento fragment bol nazvaný ľudský IFN beta-C162/G4S. Obe sady primérov obsahovali 5'-*NotI* miesto na umožnenie ligácie do pCH269, a *SalI* štiepne miesto na umožnenie ligácie s fragmentom *SalI/NotI* ľudského IgG1.

Ľudský fragment IgG1, ktorý kóduje kľbovú doménu a domény CH2 a CH3 ľudského IgG1, bol pripravený pomocou štiepenia restriktívnymi enzýmami (*SalI/NotI*) plazmidu pEAG409, derivátu plazmidu SABI44 (opísaného v patente US 5 547 853). Fragment bol vyrezaný a purifikovaný cez gél. EBNA expresný vektorový plazmid pCH269 bol štiepený *NotI* a purifikovaný cez gél.

Dva fúzne konštrukty ľudského IFN beta-ľudského IgG1 Fc boli vytvorené dvoma trojcestnými ligáciami. Jeden konštrukt, nazývaný ZL6206, obsahoval spojovaciu sekvenciu G4S, druhý konštrukt, nazývaný ZL5107, je priama fúzia. Kompletná sekvencia DNA a proteínu otvoreného čítacieho rámca priamej fúzie (pozri obrázok 10) sú uvedené v sekvencii SEQ ID NO: 41 a v sekvencii SEQ ID NO: 42, podľa poradia.

Kompletná sekvencia DNA a proteínu otvoreného čítacieho rámca fúzie spojovacej sekvencie (pozri obrázok 11) sú uvedené v sekvencii SEQ ID NO: 43 a v sekvencii SEQ ID NO: 44, podľa poradia.

CHO konštrukt:

- 5 Bol vytvorený konštrukt v bunkách CHO s trvalou expresiou fúzie „ľudský IFN beta-ľudský IgG1 Fc“, ktorý obsahoval ľudský IFN beta priamo spojený s ľudským IgG1 Fc. Fragment ľudský IFN- beta-ľudský IgG1 Fc bol vystrihnutý z plazmidu ZL5107 s *NotI* a purifikovaný cez gél, bol ligovaný do miesta *NotI* v pEAG347 (expresný vektor obsahujúci tandem skorého promotora SV40a hlavného neskorého adenovírusového promotora (pochádzajúceho z plazmidu pAD2beta), jedinečné klonovacie miesto *NotI* nasledované signálmi na neskoré ukončenie transkripcie SV40 a polyA (pochádzajúce z plazmidu pCMVbeta). pEAG347 obsahuje plazmidovú kosť pochádzajúcu z pUC 19 a dhfr pre MTX selekciu a amplifikáciu v transfekovaných bunkách CHO).

- 15 B. produkcia fúzneho proteínu ľudský interferón-beta-1a/ľudský IgG1 Fc
Prechodná transfekcia fúzných konštruktov ľudského IFN beta do buniek EBNA293:

Opísané rekombinantné expresné vektory IFN-beta/ľudský IgG1 Fc boli prechodne transfekované do buniek EBNA 293 z ľudských obličiek na dosiahnutie expresie fúzneho proteínu IFN-beta-1a podľa vynálezu. Tieto rekombinantné expresné plazmidy boli transfekované podľa lipofektaminového protokolu (katalóg. č. 18324-020, Life Technologies) do buniek z ľudských obličiek EBNA 293 podľa protokolu opísaného v príklade 3.

20 Stabilné transfekcie dhfr-CHO buniek fúznym konštruktom „ľudský IFN-beta-1a/ľudský IgG1 Fc“ (bez spojovacej sekvencie):

- 25 Expresný vektor dhfr obsahujúci rekombinantný IFN-beta/ľudský IgG1 Fc (bez spojovacej sekvencie), ktorý už bol opísaný, sa trvale transfekoval do buniek, aby sa dosiahla expresie fúzneho proteínu IFN-beta-1a podľa vynálezu. Tento rekombinantný expresný plazmid bol transfekovaný elektroporáciou a selekcia pozitívnych klonov sa uskutočnila podľa nasledujúceho protokolu:

30 Plazmidová DNA (20 g) štiepená s *BglII* sa precipitovala, resuspendovala v 800 µl pufru HEPES a pridala k 10×10^7 buniek/ml CHO. Po elektroporácii boli bunky pestované 2 dni v kompletnom médiu DMEM. Potom sa bunky rozdelili na 20 až 40 10 cm misiek s kompletným DMEM/dialyzovaným 10 % FBS a pestovali 5 dní pred prenesením buniek na selekčné média so stúpajúcou koncentráciou (50 - 200 ng/ml) MTX v DMEM počas dvoch týždňov. Na konci dvoch týždňov sa selektovali jednotlivé kolónie buniek a namnožili. Supernatanty pochádzajúce z 22 klonov CHO boli testované v antivírusových testoch.

- 35 Aktivita

Antivírusová aktivita fúzných proteínov sa zisťovala v testoch CPE, ako je opísané v príklade 4. Na základe špecifickej aktivity 60 MU/mg štandardu interferónu-beta-1a použitého v tomto teste, bola aktivita prechodne (EBNA) exprimovaného fúzneho proteínu ľudský interferón-beta-1a/ľudský IgG1 Fc so spojovacou sekvenciou 900 U/ml a aktivita bez spojovacej sekvencie bola 440 U/ml. Aktivita fúzneho proteínu exprimovaného v bunkách CHO ľudský interferón-beta-1a/ľudský IgG1 Fc bola 50 U/ml.

Príklad 6

Meranie antivírusovej aktivity interferónu-beta-1a v plazme myši ošetrovaných interferónom-beta-1a a fúznym protínom interferón-beta-1a/myši IgG2a

- 45 Myšiam (C57/B16) sa podala do žily v chvoste i.v. injekcia 50 000 jednotiek interferónu-beta-1a (voľného) alebo 5000 jednotiek fúzneho proteínu interferón-beta-1a-myši IgG2a. Ako kontrola sa podal rovnaký objem fosfátového pufru.

50 Krv sa odoberala retroorbitálnymi krvnými odbermi v rôznych časových bodoch (okamžite, 0,25, 1, 4, 24 a 48 hodín) po injekcii interferónu beta. V každom časovom bode boli aspoň tri myši. Úplná krv sa odoberala do skúmaviek obsahujúcich antikoagulans, bunky sa odstránili a zvyšná plazma sa zmrazila až do času testovania. Vzorky plazmy sa nariedili 1 : 10 médiom bez séra a ponechali sa pretiecť cez 0,2 mm filter v striekačke.

60 Nariedené vzorky potom boli titrované do určených jamiek na 96-jamkovej doštičke na tkanivové kultúry obsahujúce bunky A549. Na každej doštičke sa testovali riedenia štandardov interferónu-beta-1a (10, 6,7, 4,4, 2,9, 1,3, 0,9 a 0,6 U/ml AVONEX) a štyri vzorky plazmy. Bunky boli vopred ošetrované so vzorkami po 24 hodín pred stimuláciou vírusom EMC. Po dvojdennej inkubácii s vírusom boli životaschopné bunky farbené roztokom MTT (5 mg/ml vo fosfátovom pufru) počas 1 hodiny, premyté fosfátovým pufrum a solubilizované s 1,2N HCl v izopropanole. Jamky potom boli odčítané pri 450 nm. Na každú doštičku boli vytvorené štandardné krivky a použité na určenie množstva aktivity interferónu-beta-1a v každej testovanej vzorke. Aktivita vo vzorkách od rôznych myši sa vynesla do grafu proti časovým bodom na obrázku 9.

Pomalšia strata fúzie interferónu-beta-1a z krvného obehu ako funkcia času ukazuje, že biologický polčas vzorky fúzneho proteínu je oveľa dlhší ako polčas nemodifikovaného kontrolného interferónu-beta-1a. Druhé veľmi významné zistenie z tejto štúdie bolo to, že veľmi málo fúzneho proteínu bolo strateného v priebehu distribučnej fázy, ako bolo dokázané podobnými vysokými hladinami aktivity v 15 a 60 minútach. Dáta ukazujú, že na rozdiel od kontrol interferónu-beta-1a, je distribúcia fúzneho protínu interferónu-beta-1a prevažne obmedzená na cievne zásobenie.

Priklad 7

Porovnávacie farmakokinetické a farmakodynamické štúdie na primátoch

Komparatívne štúdie sa uskutočnili s fúziou interferónu-beta-1a a natívnym interferénom-beta-1a (ako neformulovaný voľný medziprodukt AVONEX^R interferónu-beta-1a v 100 mM fosfáte sodnom, 200 mM NaCl, pH 7,2) na zistenie ich relatívnej stability a aktivity na primátoch. V týchto štúdiách boli porovnávané farmakokinetiká a farmakodynamiká fúzie interferónu-beta-1a u primátov s natívnym interferénom-beta-1a a racionálne závery môžu byť rozšírené na človeka.

Zvieratá a metódy

Návrh štúdia

Toto bola štúdia s paralelnými skupinami a opakovanými dávkami na vyhodnotenie komparatívnej farmakokinetiky a farmakodynamiky fúzneho proteínu interferónu-beta-1a a nefúzovaného interferónu-beta-1a.

Na túto štúdiu sa použili zdravé primáty (výhodne makak „rhesus“, *Macaca mullata*). Pred podávaním dávok sa u všetkých zvierat vyšetrili príznaky ochorenia veterinárom pri dvoch príležitostiach behom 14 dní pred prvým podávaním testovanej zlúčeniny, jedno vyšetrenie muselo byť v priebehu 24 hodín pred prvým podaním testovanej zlúčeniny. Iba zdravé zvieratá dostali testovanú zlúčeninu. Vyhodnotenie zahŕňalo všeobecné fyzikálne vyšetrenie a krvné odbery pred podaním dávky na vyšetrenie základných klinických patologických ukazovateľov a východiskové hladiny protilátok proti interferónu-beta-1a. Všetky zvieratá boli zvážené a behom 24 hodín pred podaním testovanej zlúčeniny bola zaznamenávaná telesná teplota.

Zaregistrovaných bolo dvanásť zvierat, ktoré sa rozdelili do skupín po troch, pričom dostávali 1 MU/kg interferónu-beta-1a buď ako fúzovaný alebo nefúzovaný, ale inak identický interferón-beta-1a. Podávanie sa uskutočnilo buď subkuntánne (SC) alebo intravenózne (IV). Šesť samcov dostalo testovanú zlúčeninu IV spôsobom (3/ošetrenie) a ďalších 6 samcov dostalo testovanú zlúčeninu SC spôsobom (3/ošetrenie). Všetky zvieratá museli byť nedotknuté ošetrením interferénom-beta, teda tzv. naivné. Každému zvieraťu boli podávané dávky v dvoch časoch, dávky boli oddelené štyrmi týždňami. Objem dávky bol 1,0 ml/kg.

Na farmakokinetické testovania sa odoberala krv v 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 a 96 hodín po každej injekcii. V 0, 24, 48, 72, 96, 168, 336, 504 hodín po podávaní študovaného liečiva sa tiež odoberali vzorky krvi na meranie markera biologickej reakcie indukovaného interferénom, sérového neopterinu.

Hodnotenia počas obdobia štúdie zahŕňajú klinické vyšetrenia známk toxicity uskutočňované 30 minút a 1 hodinu po podaní dávky. Uskutočnili sa denné pozorovania cez kletku a zaznamenával sa celkový vzhľad, príznaky toxicity, nepokoj a zmeny správania. Počas 21 dní po podaní dávky bola zaznamenávaná telesná hmotnosť a telesná teplota.

Testovacie metódy

Hladiny interferónu-beta v sére sa kvantifikovali použitím testu na hodnotenie cytopatického účinku (CPE). Test CPE meral stupeň antivírusovej aktivity sprostredkovanej interferénom. Stupeň antivírusovej aktivity vo vzorke odráža počet molekúl aktívneho interferónu obsiahnutých vo vzorke v okamihu, keď je odoberaná krv. Tento prístup bol štandardnou metódou na stanovenie farmakokinetiky interferónu-beta. Test CPE použitý v predkladanej štúdii deteguje schopnosť interferónu-beta chrániť bunky ľudského pľúcneho karcinómu (A549, č. CCL-185, ATCC, Rockville, MD) pred cytotoxicitou spôsobenou vírusom encefalomyokarditídy (EMC). Bunky boli vopred inkubované 15 až 20 hodín so vzorkami séra, aby sa umožnila indukcia a syntéza proteínov, ktoré je možné indukovať interferénom, a ktoré potom zvyšujú antivírusovú reakciu. Potom bol pridaný vírus EMC a inkubovaný ďalších 30 hodín pred tým, než sa vyhodnotila cytotoxicita s použitím farbenia kryštálovou violetou. Na každej testovanej doštičke sa súčasne so vzorkami testoval vnútorný štandard interferónu-beta, ako aj vnútorný štandard interferónu-beta-Ig. Tento štandard bol kalibrovaný proti referenčnému štandardu prirodzeného interferónu ľudských fibroblastov (WHO Second International Standard for Interferon, Human Fibroblast, Gb-23-902-53). Každá testovaná doštička tiež zahŕňala jamky s kontrolou bunkového rastu, ktoré neobsahovali ani interferón-beta akéhokoľvek druhu, ani EMC a jamky s vírusovou kontrolou, ktoré obsahovali bunky a EMC, ale neobsahovali interferón-beta. Na zistenie účinku, ak bol nejaký, vzoriek na bunkový rast boli tiež pripravené kontrolné doštičky obsahujúce štandardy a vzorky. Tieto doštičky boli zafarbené bez pridania vírusu.

Vzorky a štandardy sa testovali v duplikátoch na každej z dvoch opakujúcich sa testovacích dosťičiek, poskytujúce štyri údaje o vzorke. Uviedol sa geometrický priemer hodnôt koncentrácie zo štyroch opakovaní. Limit detekcie v tomto teste je 10 jednotiek (U)/ml.

Sérové koncentrácie neopterinu boli určované na oddelení klinickej farmakológie s použitím komerčne dostupných testov.

Farmakokinetické a štatistické metódy

Softvér Rstrip™ (MicroMath, Inc., Salt Lake City, UT) sa použil na prekladanie (fitovanie) dát pomocou farmakokinetických modelov. Geometrické priemery hodnôt koncentrácie boli vynesené do grafu oproti času na každú skupinu. Pretože výsledky testu sú vyjadrené ako riedenie, sú geometrické priemery považované za vhodnejšie, než aritmetické priemery. Hladiny sérového interferónu sa porovnávali podľa východiskových hodnôt a nedetegovateľné koncentrácie v sére boli stanovené na 5 U/ml, čo predstavovalo jednu polovicu spodného limitu detekcie.

Pre dáta zo IV infúzií bol fitovaný IV infúzny model s dvoma kompartmentami na detegovateľné koncentrácie v sére na každý subjekt a SC dáta boli fitované podľa injekčného modelu s dvoma kompartmentami.

Vypočítali sa nasledujúce farmakokinetické parametre:

- i) pozorovaná vrcholová koncentrácia, $C_{\max}$ (U/ml),
- ii) oblasť pod krivkou od 0 do 48 hodín, AUC sa vypočítala pomocou lichobežníkového pravidla,
- iii) polčas eliminácie,
- iv) polčas distribúcie (hodiny, h),
- v) clearancia (ml/h),
- iv) zjavný distribučný objem, V_d (l).

Na výpočet polčasu eliminácie po SC a IM injekcii bol použitý softvér WinNonlin (verzia 1.0, Scientific Consulting inc., Apex, NC).

Pre neopterin sú uvedené hodnoty aritmetického priemeru v každej skupine. Vypočítala sa $E_{\max}$, maximálna hodnota zmeny proti základnej hodnote. $C_{\max}$, AUC a $E_{\max}$ boli potom analyzované jednosmernou analýzou rozptylu na porovnanie skupín líšiacich sa dávkami. Hodnoty $C_{\max}$ a AUC sa logaritmicke transformovali pred analýzou, uvádzané sú geometrické priemery.

Príklad 8

Antiangiogénne účinky fúzie interferónu-beta-1a: Hodnotenie schopnosti fúzie interferónu-beta-1a inhibovať proliferáciu endotelových buniek *in vitro*

Bunky z ľudského cievneho endotelu (Cell Systems, katalóg. č. 2V-P75) a bunky endotelu kožných kapilár (Cell Systems, katalóg. č. 2M1-C25) sa udržiavali v kultúre s médiom zo súpravy CS-C Medium Kit (Cell Systems, katalóg. č. 4Z-500). Dvadsaťštyri hodín pred pokusom sa bunky ošetrili trypsínom, resuspendovali v testovacom médiu, 90 % M199 a 10 % fetálne hovädzie sérum (FBS) a upravili na požadovanú hustotu. Potom sa bunky vysiali na 24 alebo 96 jamkové dosťičky potiahnuté želatínou, s hustotou 12 500 buniek/jamka alebo 2000 buniek/jamka.

Po inkubácii cez noc bolo testovacie médium nahradené čerstvým médiom obsahujúcim 20 ng/ml ľudského rekombinantného bazického fibroblastového rastového faktora bFGF (Becton Dickinson, katalóg. č. 400600) a rôzne koncentrácie fúzovaných alebo nefúzovaných proteínov interferónu-beta-1a alebo pozitívnej kontroly (ako pozitívnu kontrolu možno použiť endostatin alebo protilátku na bFGF). Celkový objem bol nastavený na 0,5 ml v 24-jamkovej dosťičke alebo 0,2 ml v 96-jamkovej dosťičke.

Po 72 hodinách sa bunky ošetrili trypsínom na počítanie na Coultere, zamrazili na odčítanie fluorescence CyQuant alebo značili (^3H) tymidínom.

Tento *in vitro* test slúžil na hodnotenie molekúl ľudského interferónu-beta podľa vynálezu z hľadiska účinku na proliferáciu endotelových buniek, ktorá môže byť indikátorom antiangiogénnych účinkov *in vivo*. Pozri napr. O'Reilly, M. S., T. Boehm., Y. Shing, N. Fukal, G. Vasios, W. Lane, E. Flynn, J. Birkhead, B. Olsen, J. Folkman, 1997, Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth, Cell, 88, 277-285.

Príklad 9

In vivo model na testovanie antiangiogénneho a antineovaskularizačného účinku fúzie interferónu-beta-1a/Ig Na testovanie antiangiogénnych a antineovaskularizačných účinkov molekúl podľa vynálezu bol vyvinutý celý rad modelov. Niektoré z týchto modelov boli opísané v patentoch US 5 733 876 (31. marca 1998, „method of inhibiting angiogenesis“) a 5 135 919 (4. august 1992, „Method and pharmaceutical composition for the inhibition of angiogenesis“). K ďalším testom patrí napr. test s chorioalantoidnou membránou bez škrupiny (CAM) podľa S. Taylor a J. Folkman, Nature, 297, 307, 1982 a R. Crum, S. Szabo a J. Folkman, Science, 230, 1375, 1985, model angiogenezy s vzdušným dorzálnym vakom u myší podľa J. Folkman, et. al., J. Exp.

Med., 133, 275, 1971 a test s mikrokapsou rohovky podľa Gimbrone, M. A. Jr. et. al., Natl. Cancer Inst., 52, 413, 1974, kde je vaskularizácia rohovky indukovaná u dospelých samcov laboratórnych potkanov kmeňa Sprague-Dawley (Charles River, Japonsko) implantáciou 500 ng bázičného FGF (hovädzie, R and D systems, Inc.) impregnovaného v EVA (kopolymér etylén-vinylacetátu) peletoch do každej rohovky.

- 5 K ďalším metódam testovania fúzií interferónu-beta/Ig na antiangiogénne účinky na zvieracom modeli patria (aj keď výpočet tým nie je obmedzený) skríningové testy nových potenciálnych protirakovinových liečiv, ako bolo opísané v pôvodnej publikácii Cancer Chemotherapy Reports, Part 3, Vol. 3, No. 2, septembra 1972 a v dodatku In Vivo Cancer Models, 1976-1982, NIH Publ. No. 84-2635, február 1984. Vzhľadom na medzidruhovú bariéru na interferóny typu I, na hodnotenie antiangiogénnej aktivity fúzií interferónu-beta na modeloch hlodavcov, boli pripravené prípravky fúzií interferónu-beta/Ig hlodavcov. Skríningové metódy sú ukázané na príklade protokolu na testovanie antiangiogénneho účinku fúzií myšieho interferónu-beta/Ig na subkutánne implantovaný Lewisov pľúcny karcinóm.

Pôvod nádorovej línie

- 15 Vznikla spontánne v r. 1951 ako karcinóm pľúc u myši C57BL/6.

Súhrn testovacích procedúr

- Fragment nádoru bol implantovaný subkutánne do axilárnej oblasti myši B6D2F1. Testované činidlo (napr. fúzny proteín podľa vynálezu) bol podávaný v rôznych dávkach subkutánne (SC) alebo intraperitoneálne (IP) po niekoľko dní po implantácii nádoru. Meraným parametrom potom bol medián času prežitia. Výsledky sú uvedené ako percentá času prežitia kontroly.

Zvieratá

- Propagácia nádory: myši C57BL/6
 25 Testovacie zvieratá: myši B6D2F1
 Hmotnosť: myši by mali mať hmotnosť s rozpätím 3 g s minimálnou hmotnosťou u samcov 18 g a samíc 17 g
 Pohlavie: zvieratá jedného pohlavia sú použité na test aj kontrolu v jednom pokuse
 Zdroj: jeden zdroj, pokiaľ je to možné, pre všetky zvieratá v jednom pokuse

Rozsah experimentu

- 10 zvierat v jednej testovacej skupine
 Prenos nádoru
 Propagácia nádoru:
 35 Fragment: pripraviť 2 až 4 mm fragment nádoru SC darcovského nádoru
 Čas: 13. až 15. deň
 Miesto: fragment implantovaný SC do axilárnej oblasti vpichom v ingvinálnej oblasti
 Testovanie:
 Fragment: príprava fragmentu o veľkosti 2-4 mm z s.c. darcovského tumoru
 40 Čas: 13. až 15. deň
 Miesto: implantácia fragmentu s.c. do axilárnej oblasti vpichom v ingvinálnej oblasti.

Testovacia schéma:

- Deň 0: implantácia tumoru. Založenie bakteriálnych kultúr. Testovanie pozitívnej kontrolnej zlúčeniny v každom experimente s párnym číslom. Príprava materiálu. Denný záznam úmrtia
 45 Deň 1: kontrola kultúr. Odstránenie kontaminovaného experimentu. Randomizácia zvierat. Ošetrovanie podľa inštrukcií (v deň 1 a nasledujúce dni).
 Deň 2: Opätovná kontrola kultúr. Odstránenie kontaminovaného experimentu.
 Deň 5: Hodnotenie dňa 2 a deň počiatočného testu vyhodnotenia toxicity prípravku.
 50 Deň 14: Kontrolný deň skorého úmrtia.
 Deň 48: Kontrolný deň.
 Deň 60: Koniec a vyhodnotenie experimentu. Vyšetrenie tumoru pľúc iba podľa oka.

Kontrola kvality:

- 55 Stanovenie pozitívnej kontrolnej zlúčeniny (NSC 26271 (Cytosan v dávke 100 mg/kg/injekcie)) v každom experimente s párnym číslom, ktorého režim bol v deň 1 iba intraperitoneálny. Spodný limit testu/kontroly na pozitívnu kontrolu je 140 %. Prijateľný medián prežitia u neošetrenej kontroly bol 19 až 35,6 dňa.

Vyhodnotenie:

- Meraný parameter je medián prežitia. Výpočet priemernej telesnej hmotnosti zvierat v deň 1 a v deň 5, výpočet pomeru test/kontrola na všetky testované skupiny. Sú vypočítané priemerné telesné hmotnosti zvierat v dni odpočítania a v deň konečného vyhodnotenia. Pomer test/kontrola je vypočítaný na všetky testované skupiny s > 65 % prežívajúcich na 5. deň. Pomer test/kontrola < 86 % indikuje toxicitu. Na hodnotenie toxicity môže byť tiež použitá neprimeraná zmena telesnej hmotnosti (test mínus kontrola).

Merítka aktivity:

- Východiskový pomer test/kontrola väčší alebo rovnajúci sa 140 % je považovaný za nevyhnutný na dôkaz miernej aktivity. Reprodukovateľná hodnota priemeru test/kontrola väčšia alebo rovnajúca sa 150 % je považovaná za významnú aktivitu.

Zoznam sekvencií

```

<110> WHITTY, ADRIAN
RUNKEL, LAURA
BRICKELMAIER, MARGOT
HOCHMAN, PAULA

<120> INTERFERÓN-BETA FÚZNE PROTEÍNY A POUŽITIA

<130> A064 CON US

<140>
<141>

<150> 09/832,659
<151> 2001-04-11

<150> PCT/US99/24200
<151> 1999-10-15

<150> 60/120,237
<151> 1999-02-16

<150> 60/104,491
<151> 1998-10-16

<160> 64

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 1197
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1197)

<400> 1
atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga agc agc aat ttt cag 48
MET SER TYR ASN LEU LEU GLY PHE LEU GLN ARG SER SER ASN PHE GLN
1 5 10 15

tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg ctt gaa tac tgc ctc 96
CYS GLN LYS LEU LEU TRP GLN LEU ASN ARG ARG LEU GLU TYR CYS LEU
20 25 30

aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag gag att aag cag ctg cag 144
LYS ASP ARG MET ASN PHE ASP ILE PRO GLU GLU ILE LYS GLN LEU GLN
35 40 45

cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc tat gag atg ctc cag 192
GLN PHE GLN LYS GLU ASP ALA ALA LEU THR ILE TYR GLU MET LEU GLN
50 55 60

aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct agc act ggc tgg aat 240
ASN ILE PHE ALA ILE PHE ARG GLN ASP SER SER SER THR GLY TRP ASN
65 70 75

gag act att gct gag aac ctc ctg gct aat gtc tat cat cag ata aac 288
GLU THR ILE VAL GLU ASN LEU LEU ALA ASN VAL TYR HIS GLN ILE ASN
85 90 95

cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag aaa gaa gat ttc acc 336
HIS LEU LYS THR VAL LEU GLU LYS LEU GLU LYS GLU ASP PHE THR
100 105 110

agg gga aaa ctc atg agc agt ctg cac ctg aaa aga tat tat ggg agg 384
ARG GLY LYS LEU MET SER SER LEU HIS LEU LYS ARG TYR TYR GLY ARG
115 120 125

att ctg cat tac ctg aag gcc aag gaa tac aat cac tgt gcc tgg acc 432
ILE LEU HIS TYR LEU LYS ALA LYS GLU TYR SER HIS CYS ALA TRP THR
130 135 140

ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt tac ttc att aac aga ctt 480
ILE VAL ARG VAL GLU ILE LEU ARG ASN PHE TYR PHE ILE ASN ARG LEU
145 150 155

aca ggt tac ctc cga aac gac gat gat gac aag gtc gac aaa act cac 528
THR GLY TYR LEU ARG ASN ASP ASP ASP LYS VAL ASP LYS THR HIS
160 165 170

aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc 576
THR CYS PRO PRO CYS PRO ALA PRO GLU LEU LEU GLY GLY PRO SER VAL
180 185 190

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc 624
PHE LEU PHE PRO PRO LYS PRO LYS ASP THR LEU MET ILE SER ARG THR
195 200 205

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag 672
PRO GLY VAL THR CYS VAL VAL VAL ASP VAL SER HIS GLU ASP PRO GLU
210 215 220

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 720
VAL LYS PHE ASN TRP TYR VAL ASP GLY VAL GLU VAL HIS ASN ALA LYS
225 230 235

aca aag ccg cgg gag ggg cgg tac aac agc acc tac cgt gtg gtc agc 768
THR LYS PRO ARG GLU GLN TYR ASN SER THR TYR ARG VAL VAL SER
240 245 250

gtc ctc acc gtc ctg cac cgg gac tgg ctg aat ggc aag gaa tac aag 816
VAL LEU THR VAL LEU HIS GLN ASP TRP LEU ASN GLY LYS GLU TYR LYS
255 260 265

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc ggg aaa acc atc 864
LYS LYS VAL SER ASN LYS ALA LEU PRO ALA PRO ILE GLU LYS THR ILE
270 275 280

ccc aaa gcc aaa ggg cgg ccc cca gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 912
SER LYS ALA LYS GLY GLN PRO ARG GLU PRO GLN VAL TYR THR LEU PRO
285 290 295

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 960
PRO SER ARG ASP GLU LEU THR LYS ASN GLN VAL SER LEU THR CYS LEU
300 305 310

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 1008
VAL LYS GLY PHE TYR PRO SER ASP ILE ALA VAL GLU TRP GLU SER ASN
315 320 325

```

890 CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCG GTC TGT GAC TCC 1056
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 340 345 350
 GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG 1104
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 355 360 365
 CCG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAC GAG GGT CTG 1152
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 370 375 380
 CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCC GGG AAA 1197
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390 395

<210> 2

<211> 399

<212> PRT

<213> Umold sekvencia

<220>

<223>

Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt

<400> 2
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Asp Asp Asp Asp Lys Val Asp Lys Thr His
 165 170 175
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 180 185 190
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

195 200 205
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 210 215 220
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 225 230 235 240
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 245 250 255
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Ile Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 260 265 270
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 275 280 285
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 290 295 300
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 305 310 315 320
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 325 330 335
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 340 345 350
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 355 360 365
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 370 375 380
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390 395

<210> 3

<211> 549

<212> DNA

<213> Umold sekvencia

<220>

<223>

Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(549)
 <400> 3
 tcc ggg ggc cat cat cat cat cat cat agc tcc gga gac gat gat gac 48
 Ser Gly Gly His His His His His His Ser Ser Gly Asp Asp Asp Asp
 1 5 10 15
 aag atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga agc agc aat ttt 96
 Lys Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
 20 25 30
 cag tgc cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg ctt gaa tac tgc 144
 Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys

```

      35          40          45
ctc aag gac aop atp aac ttt gac atc cct gag gag att aag cag ctg 192
Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
50          55          60
cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc tat gag atg ctc 240
Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
65          70          75
cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct agc act ggc tgg 288
Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
85          90          95
aat gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat gtc tat cat cag ata 336
Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
100          105          110
aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag aaa gaa gat ttc 384
Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
115          120          125
acc agp gga aaa ctc atp agc agt ctg cac ctg aaa aga tat tat ggg 432
Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
130          135          140
aga att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt cac tgt gcc tgg 480
Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
145          150          155
acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agp aac ttt tac ttc att aac aga 528
Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
165          170          175
ctt aca ggt tac ctc cga aac
Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
180

```

<210> 4
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt

```

<400> 4
Ser Gly Gly His His His His His Ser Ser Gly Asp Asp Asp Asp
1      5      10      15
Lys Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
20      25      30
Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys
35      40      45
Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
50      55      60
Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
65      70      75      80

```

```

Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
85          90          95
Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
100          105          110
Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
115          120          125
Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
130          135          140
Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
145          150          155
Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
165          170          175
Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
180

```

<210> 5
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(69)
<400> 5
ttc att aac aga ctt aca tgt tac ctc cga aac gtc gac aaa act cac 48
phe ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Val Asp Lys Thr His
1      5      10      15
aca tgc cca ccg tgc cca gca
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
20

```

<210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt

```

<400> 6
phe ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Val Asp Lys Thr His
1      5      10      15
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
20

```

```

<210> 7
<211> 81
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(81)

<400> 7
ttc att aac aga ctt aca tgt tac ctc cga aac ggc ggt ggt ggc agc 48
phe ile asn arg leu thr cys tyr leu arg asn gly gly gly gly ser
1 5 10 15
gtc gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca 81
val asp lys thr his thr cys pro pro cys pro
20 25

<210> 8
<211> 27
<212> PRT
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt

<400> 8
phe ile asn arg leu thr cys tyr leu arg asn gly gly gly gly ser
1 5 10 15
val asp lys thr his thr cys pro pro cys pro
20 25

<210> 9
<211> 60
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

<400> 9
ttctccggag acgatgatga caagatgagc tacacttgc ttggattcct acaagaagc 60

<210> 10
<211> 39
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

<400> 10

gccgctcag ttatcagttt cpgaggtaac ctgtaagtc 39

<210> 11
<211> 35
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

<400> 11
agcttccggg ggccatcac atcatcata tagct 35

<210> 12
<211> 35
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

<400> 12
ccgaactat gatgatgat ataatgccc ccgaa 35

<210> 13
<211> 87
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 13
ctppagacga tgaagacaag atgacttacg ccgctcttgg agccctacaa gcttctagca 80
atttcagtg tcagaagctc ctgtggc 87

<210> 14
<211> 60
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 14
gatctagcaa tgcgtcctgt gctgccctcc tggctgctt gaatgggagg cttgaatact 60

<210> 15
<211> 52
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

```

```

<400> 15
gcctcaagga caggatgaac ttgacatcc ctgaggagat taagcagctg ca      52

<210> 16
<211> 76
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 16
aattgaatgg gagggctgca gcttcgctg cagacaggat gaactttgac atccctgagg 60
agattaagca gctgca      76

<210> 17
<211> 76
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 17
aattgaatgg gaggcttgaa tactgcctca aggacaggac tgcatttgc atccctgcag 60
agattaagca gctgca      76

<210> 18
<211> 51
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 18
aattgaatgg gaggcttgaa tactgcctca aggacaggat gaactttgac a      51

<210> 19
<211> 43
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 19
tccctgagga gattgctgca gctgcagctt tcgctgcagc tga      43

<210> 20
<211> 78
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223>

<400> 20
cgccgcgttg accatctatg agatgctgc taacatgct agcattttca gacaaagattc 60
atctagcact ggctggaa      78

<210> 21
<211> 78
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 21
cgccgcattg accatctatg agatgctcca gaacatcttt gctattttcg ctgcagcttc 60
atctagcact ggctggaa      78

<210> 22
<211> 72
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 22
ggaatgcttc aattgttgc gactctctga gcaatgtcta tcacagata aaccatctga 60
agacatttct ag      72

<210> 23
<211> 72
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 23
ggaaatgac cattgttgag aacctctcg ctaatgtgc tcacagata gcacatctgg 60
ctgcatttct ag      72

<210> 24
<211> 44
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 24
ctagctgcaa aactggctgc agctgatttc accaggggaa aact      44

```

<210> 25
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 25
 ctgaagaaa aactggagaa agaagcagct accgctgga aagcaatgag cgcctgcac 60
 ctgaasaga 69

<210> 26
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 26
 tattatggga ggattctgca ttacctgaag gccaaaggagt actcacactg t 31

<210> 27
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 27
 catgagcagt ctgcacctga aaagatatta tggggcaatt gctgcattcc tggcagccaa 60
 ggagtactca cactgt 76

<210> 28
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 28
 catgagcagt ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccgc 60
 tgcatactca cactgtgctt ggacgat 87

<210> 29
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 29
 catgagcagt ctgcacctga aaagatatta tgggaggatt ctgcattacc tgaaggccaa 60
 ggagtactct gcattgtgctt ggacgat 87

<210> 30
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický oligonukleotid

<400> 30
 cptrcagagct gaaatcttag caaaccttgc attcattgca agacttacag 50

<210> 31
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

<400> 31
 ggtggcttca catgacttac aacttgcttg gattctctca aagaagc 47

<210> 32
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

<400> 32
 gccctcgagt cgaccttgct atcctgtgct tttcggaggt aacctgtaag 50

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

<400> 33
 caagcttgct agcggctgct g 21

<210> 34
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

<400> 34
 gggtgtctca catggcttga gaagctgc 28

 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

 <400> 35
 aggtsmarct gcagsagtcw 20

 <210> 36
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

 <400> 36
 ctgagctcat ttaccggag tccgggagaa gctctt 36

 <210> 37
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

 <400> 37
 agcttgctag cggccgcggc ctactggct tca 33

 <210> 38
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

 <400> 38
 atacgcgtcg acgtttcggg ggtaacatgt aagcttg 37

 <210> 39
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>

 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

 <400> 39
 agcttgctag cggccgcggc ctactggct tca 33

 <210> 40
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický primér

 <400> 40
 tatcatgcga cgtgccacc accgcgcttt cggagptaac atgtaagtct g 51

 <210> 41
 <211> 1237
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1254)

 <400> 41
 atg cct ggg aag atg gtc gtc atc ctt gga gcc tca aat ata ctt tgg 48
 Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp
 1 5 10 15

 ata atg ttt gca gct tct caa gcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc 96
 Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe
 20 25 30

 cta caa aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg 144
 Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu
 35 40 45

 aat ggg agg ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc 192
 Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile
 50 55 60

 cct gag gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gra 240
 Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala
 65 70 75 80

 ttg acc atc tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa 288
 Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln
 85 90 95

 gat tca tct agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg 336
 Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu
 100 105 110

 gct aat gtc tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa 384
 Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu

SK 287491 B6

```

115      120      125
aaa ctg gag aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg 432
lys leu glu lys glu asp phe thr arg gly lys leu met ser ser leu
130      135      140
cac ctg aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag 480
his leu lys arg tyr tyr gly arg ile leu his tyr leu lys ala lys
145      150      155
gag tac agt cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg 528
glu tyr ser his cys ala trp thr ile val arg val glu ile leu arg
165      170      175
aac ttt tac ttc att aac aga ctt aca tgt tac ctc cga aac gtc gac 576
asn phe tyr phe ile asn arg leu thr cys tyr leu arg asn val asp
180      185      190
aaa act cac aca tgc cca ctg tgc cca gca cct gaa ttc ctg ggg gga 624
lys thr his thr cys pro pro cys pro ala pro glu leu leu gly gly
195      200      205
ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc 672
pro val phe leu phe pro pro lys pro lys asp thr leu met ile
210      215      220
tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtc gtc gtc gac gtc agc cac gaa 720
ser arg thr pro glu val thr cys val val val asp val ser his glu
225      230      235
gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtc gac ggc gtc gaa gtc cat 768
asp pro glu val lys phe asn trp tyr val asp gly val glu val his
245      250      255
aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt 816
asn ala lys thr lys pro arg glu glu gln tyr asn ser thr tyr arg
260      265      270
gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag 864
val val ser val leu thr val leu his gln asp trp leu asn gly lys
275      280      285
gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag 912
glu tyr lys cys lys val ser asn lys ala leu pro ala pro ile glu
290      295      300
aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtc ttc 960
lys thr ile ser lys ala lys gly gln pro arg glu pro gln val tyr
305      310      315
acc ctg ccc cca tcc ccg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg 1008
thr leu pro pro ser arg asp glu leu thr lys asn gln val ser leu
325      330      335
acc tgc ctg gtc aac ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtc gag tgg 1056
thr cys leu val lys gly phe tyr pro ser asp ile ala val glu trp
340      345      350
gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtc 1104
glu ser asn gly gln pro glu asn asn tyr lys thr thr pro pro val
355      360      365
ttg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtc gac 1152
leu asp ser asp gly ser phe phe leu tyr ser lys leu thr val asp

```

```

370      375      380
aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtc atg cat 1200
lys ser arg trp gln gln gly asn val phe ser cys ser val met his
385      390      395
gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccc 1248
glu ala leu his asn his tyr thr gln lys ser leu ser leu ser pro
400      405      410      415
ggg aaa tga 1257
gly lys

```

```

<210> 42
<211> 418
<212> PKT
<213> Umeľá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt
<400> 42
Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp
1 5 10 15
Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe
20 25 30
Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu
35 40 45
Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile
50 55 60
Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala
65 70 75 80
Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile phe Ala Ile Phe Arg Gln
85 90 95
Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu
100 105 110
Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu
115 120 125
Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu
130 135 140
His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys
145 150 155 160
Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg
165 170 175
Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Val Asp
180 185 190
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
195 200 205
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

```

210 215 220
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu 240
 225 230 235
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 255
 245 250 255
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 270
 260 265 270
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 285
 275 280 285
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu 300
 290 295 300
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 320
 305 310 315
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 335
 325 330 335
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 350
 340 345 350
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 365
 355 360 365
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp 380
 370 375 380
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 400
 385 390 395 400
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro 415
 405 410 415
 Gly Lys

<210> 43
 <211> 1272
 <212> DNA
 <213> Umeľá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1269)

<400> 43
 atg cct ggg aag atg gtc gtp atc ctt gga gcc tca aat ata ctt tgg 48
 Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp
 1 5 10 15
 ata atg ttt gca gct tct cca gcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc 96
 Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe
 20 25 30

cta caa aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg 144
 Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu
 35 40 45
 aat ggg agg ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc 192
 Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile
 50 55 60
 cct gag gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca 240
 Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala
 65 70 75 80
 ttg acc atc tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa 288
 Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln
 85 90 95
 gat tca tct agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg 336
 Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu
 100 105 110
 gct aat gtc tat cat cag ata aac cat ctg aag acg gtc ctg gaa gaa 384
 Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu
 115 120 125
 aaa ctg gag aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg 432
 Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu
 130 135 140
 cac ctg aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag 480
 His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 gag tac agt ctc tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtp gaa atc cta agg 528
 Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg
 165 170 175
 aac ttt tac ttc att aac aga ctt aca tgt tac ctc cga aac gcc ggt 576
 Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Gly Gly
 180 185 190
 ggt ggc agc gtc gac aaa act cac aca tgc cca ctg tgc cca gca cct 624
 Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 195 200 205
 gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag 672
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 210 215 220
 gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtp gtp gtp 720
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 225 230 235 240
 gac gtp agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtp gac 768
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 245 250 255
 ggc gtp gag gtp cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag gac tac 816
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 260 265 270
 aac agc atg tac cgt gtp gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac 864
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 275 280 285

SK 287491 B6

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc 912
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 290 295 300
 cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga 960
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 305 310 315
 gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag 1008
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys 320 325 330 335
 aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa gcc ttc tat ccc agc gac 1036
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 340 345 350
 atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag 1104
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 355 360 365
 acc acg cct ccc gtg ttg gac tcc gac gcc tcc ttc ttc ctc tac agc 1152
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 370 375 380
 aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca 1200
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser 385 390 395 400
 tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc 1248
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 405 410 415
 ctc tcc ctg tct ccc ggg aaa tga 1272
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 420

<210> 44
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> Opis umelej sekvencie: Syntetický konštrukt

<400> 44
 Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp
 1 5 10 15
 Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe
 20 25 30
 Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu
 35 40 45
 Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile
 50 55 60
 Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala
 65 70 75 80
 Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln

85 90 95
 Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu
 100 105 110
 Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu
 115 120 125
 Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu
 130 135 140
 His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg
 165 170 175
 Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Gly Gly
 180 185 190
 Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 195 200 205
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 210 215 220
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 225 230 235 240
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 245 250 255
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 260 265 270
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 275 280 285
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 290 295 300
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 305 310 315 320
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 325 330 335
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 340 345 350
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 355 360 365
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 370 375 380
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 385 390 395 400
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 405 410 415
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 420

<210> 45
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Ćlovek
 <400> 45
 Met Ala Tyr Ala Ala Leu Gly Ala Leu Gln Ala Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 46
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Ćlovek
 <400> 46
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Ala Ala
 1 5 10 15
 Cys Ala Ala Leu Leu Ala Ala Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 47
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Ćlovek
 <400> 47
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Ala Ala Cys Ala
 20 25 30
 Ala Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 48
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Ćlovek

<400> 48
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30
Lys Asp Arg Ala Ala Phe Ala Ile Pro Ala Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 49
<211> 166
<212> PRT
<213> Človek

<400> 49
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Ala Ala Ala
35 40 45
Ala Phe Ala Ala Ala Asp Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 50
<211> 166
<212> PRT
<213> Človek

<400> 50
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Ala
50 55 60
Asn Ile Ala Ser Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 51
<211> 166
<212> PRT
<213> Človek

<400> 51
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln

35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 52
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Clovek

<400> 52
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Ala Ser Ile Val Ala Ala Leu Leu Ser Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

165

<210> 53
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Clovek

<400> 53
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Ala His Gln Ile Ala
 85 90 95
 His Leu Ala Ala Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 54
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Clovek

<400> 54
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95
His Leu Lys Thr Val Leu Ala Ala Lys Leu Ala Ala Asp Phe Thr
100 105 110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 55
<211> 166
<212> PRT
<213> Človek

<400> 55
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Ala Ala Thr
100 105 110
Ala Gly Lys Ala Met Ser Ala Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 56
<211> 166
<212> PRT
<213> Človek

<400> 56
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Ala
115 120 125
Ile Ala Ala Tyr Leu Ala Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 57
<211> 166
<212> PRT
<213> Človek

<400> 57
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Ala Ala Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 133 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 143 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 163

<210> 58
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Clovek

<400> 58
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 163

<210> 59
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Clovek

<400> 59
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln

35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Ala Glu Ile Leu Ala Asn Phe Ala Phe Ile Ala Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 163

<210> 60
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Clovek

<400> 60
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

165

```

<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický peptid

<400> 61
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
1      5

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický peptid

<400> 62
Asp Asp Asp Lys
1      5

<210> 63
<211> 6
<212> PRT
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický 6x His tag

<400> 63
His His His His His His
1      5

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> Umelá sekvencia
<220>
<223> Opis umelej sekvencie: Syntetický peptid

<400> 64
Gly Gly Gly Gly Ser
1      5

```

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Polypeptid obsahujúci
 - a) mutant interferónu-beta-1a (IFN- β) vybraný zo skupiny pozostávajúcej z mutantov IFN- β majúcich aminokyselinovú sekvenciu znázornenú v tabuľke 1 ako A1, B1, C1, CD1, CD2 a DE1; a
 - b) kľbovú oblasť, doménu CH2 a doménu CH3 imunoglobulínu.
- 10 2. Polypeptid podľa nároku 1, pričom imunoglobulínom je ľudský imunoglobulín.
3. Polypeptid podľa nároku 1 alebo 2, pričom imunoglobulínom je imunoglobulín IgG.
4. Polypeptid podľa nároku 3, pričom imunoglobulínom IgG je imunoglobulín IgG1.
5. Polypeptid obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 42.
6. Polypeptid obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 44.
- 15 7. Polypeptid podľa niektorého z nárokov 1 až 6, pričom mutant interferónu-beta-1a (IFN- β) je glykozylovaný na aminokyselinu v aminokyselinovej sekvencii.
8. Polypeptid podľa niektorého z nárokov 1 až 6, pričom mutant interferónu-beta-1a (IFN- β) je derivovaný na aminokyselinu v aminokyselinovej sekvencii.
9. Polypeptid podľa nároku 7, pričom mutant interferónu-beta-1a (IFN- β) je derivovaný.
- 20 10. Polypeptid podľa nároku 8 alebo 9, pričom mutant interferónu-beta-1a (IFN- β) je derivovaný s polyalkylglykolovým polymérom.
11. Polypeptid podľa nároku 10, pričom polyalkylglykolový polymér je pripojený na N-koniec aminokyselinovej sekvencie mutantu interferónu-beta-1a (IFN- β).
12. DNA kódujúca polypeptid podľa niektorého z nárokov 1 až 6.
- 25 13. Rekombinantná DNA obsahujúca DNA podľa nároku 12 a kontrolnú sekvenciu expresie, pričom uvedená kontrolná sekvencia expresie je operatívne spojená s uvedenou DNA.
14. Hostiteľská bunka obsahujúca rekombinantnú DNA podľa nároku 13.
15. Spôsob prípravy polypeptidu podľa niektorého z nárokov 1 až 6, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje
 - 30 a) poskytnutie populácie hostiteľských buniek podľa nároku 14;
 - b) rast uvedených buniek v podmienkach, v ktorých je polypeptid kódovaný rekombinantnou DNA exprimovaný; a
 - c) izoláciu exprimovaného polypeptidu.
16. Farmaceutická kompozícia, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje terapeuticky účinné množstvo polypeptidu podľa niektorého z nárokov 1 až 11 a farmaceuticky prijateľný nosič.
- 35

17. Použitie polypeptidu podľa niektorého z nárokov 1 až 11 na prípravu liečiva.
18. Použitie podľa nároku 17, pričom liečivo je na liečenie alebo prevenciu zápalového, autoimúnneho, angiogenetického, nádorového alebo vírusového ochorenia.
19. Použitie podľa nároku 18, pričom vírusovým ochorením je infekcia ECM, chrípka, infekcia respiračného traktu, besnoty alebo hepatitídy.
20. Použitie podľa nároku 18, pričom autoimúnnym ochorením je lupus alebo skleróza multiplex.
21. Použitie podľa nároku 18, pričom zápalovým ochorením je fibróza.
22. Použitie podľa nároku 18, pričom angiogenetickým ochorením je diabetická retinopatia, retinopatia nedonosených, degenerácia makuly, odmietnutie rohovkového štep, neovaskulárny glaukóm, retrolentálna fibroplázia, rubeóza alebo Osler-Weberov syndróm.
23. Použitie podľa nároku 18, pričom nádorovým ochorením je osteogénny sarkóm, lymfóm, akútna lymfocytová leukémia, rakovina prsníka, melanóm, nazofaringálny karcinóm alebo hemangióm.

15

17 výkresov

1 TCCGGGGGCC ATCATCATCA TCATCATAGC TCCGGAGACG ATGATGACAA GATGAGCTAC
 1 ▶SerGlyGlyH IsHisHisHi sHisHisSer SerGlyAspA spAspAspLy sMetSerTyr
 61 AACTTGCTTG GATTCTACA AAGAAGCAGC AATTTTCAGT GTCAGAAGCT CCTGTGGCAA
 21 ▶AsnLeuLeuG lyPheLeuGl nArgSerSer AsnPheGlnC ysGlnLysLe uLeuTrpGln
 121 TTGAATGGGA GGCTTGAATA CTGCCTCAAG GACAGGATGA ACTTTGACAT CCCTGAGGAG
 41 ▶LeuAsnGlyA rgLeuGluTy rCysLeuLys AspArgMetA snPheAspIl eProGluGlu
 181 ATTAAGCAGC TGCAGCAGTT CCAGAAGGAG GACGCCGCAT TGACCATCTA TGAGATGCTC
 61 ▶IleLysGlnL euGlnGlnPh eGlnLysGlu AspAlaAlaL euThrIleTy rGluMetLeu
 241 CAGAACATCT TTGCTATTTT CAGACAAGAT TCATCTAGCA CTGGCTGGAA TGAGACTATT
 81 ▶GlnAsnIleP heAlaIlePh eArgGlnAsp SerSerSerT hrGlyTrpAs nGluThrIle
 301 GTTGAGAACC TCCTGGCTAA TGTCTATCAT CAGATAAACC ATCTGAAGAC AGTCCTGGAA
 101 ▶ValGluAsnL euLeuAlaAs nValTyrHis GlnIleAsnH isLeuLysTh rValLeuGlu
 361 GAAAACTGG AGAAAGAAGA TTTCAACAGG GGAAAACTCA TGAGCAGTCT GCACCTGAAA
 121 ▶GluLysLeuG luLysGluAs pPheThrArg GlyLysLeuM etSerSerLe uHisLeuLys
 421 AGATATTATG GGAGGATTCT GCATTACCTG AAGGCCAAGG AGTACAGTCA CTGTGCCTGG
 141 ▶ArgTyrTyrG lyArgIleLe uHisTyrLeu LysAlaLysG luTyrSerHi sCysAlaTrp
 481 ACCATAGTCA GAGTGGAAAT CCTAAGGAAC TTTTACTTCA TTAACAGACT TACAGGTTAC
 161 ▶ThrIleValA rgValGluIl eLeuArgAsn PheTyrPheI leAsnArgLe uThrGlyTyr
 541 CTCCGAAAC
 181 ▶LeuArgAsn

Obr. 1

2A-1
2A-2

Obr. 2A

2/17

Obr. 2A-1

1 ATGAGCTACA ACTTGCTTGG ATTCCTACAA AGAAGCAGCA ATTTTCAGTG TCAGAAGCTC
 1▶MetSerTyrA snLeuLeuGl yPheLeuGln ArgSerSerA snPheGlnCy sGlnLysLeu
 61 CTGTGGCAAT TGAATGGGAG GCTTGAATAC TGCCTCAAGG ACAGGATGAA CTTTGACATC
 21▶LeuTrpGlnL euAsnGlyAr gLeuGluTyr CysLeuLysA spArgMetAs nPheAspIle
 121 CCTGAGGAGA TTAAGCAGCT GCAGCAGTTC CAGAAGGAGG ACGCCGCATT GACCATCTAT
 41▶ProGluGluI leLysGlnLe uGlnGlnPhe GlnLysGluA spAlaAlaLe uThrIleTyr
 181 GAGATGCTCC AGAACATCTT TGCTATTTTC AGACAAGATT CATCTAGCAC TGGCTGGAAT
 61▶GluMetLeuG InAsnIlePh eAlaIlePhe ArgGlnAspS erSerSerTh rGlyTrpAsn
 241 GAGACTATTG TTGAGAACCT CCTGGCTAAT GTCTATCATC AGATAAACCA TCTGAAGACA
 81▶GluThrIleV alGluAsnLe uLeuAlaAsn ValTyrHisG InIleAsnHi sLeuLysThr
 301 GTCCTGGAAG AAAAAGTGA GAAAGAAGAT TTCACCAGGG GAAAAGTCAT GAGCAGTCTG
 101▶ValLeuGluG luLysLeuGl uLysGluAsp PheThrArgG lyLysLeuMe tSerSerLeu
 361 CACCTGAAAA GATATTATGG GAGGATTCTG CATTACCTGA AGGCCAAGGA GTACAGTCAC
 121▶HisLeuLysA rgTyrTyrGl yArgIleLeu HisTyrLeuL ysAlaLysGl uTyrSerHis
 421 TGTGCCTGGA CCATAGTCAG AGTGGAAATC CTAAGGAACT TTTACTTCAT TAACAGACTT
 141▶CysAlaTrpT hrIleValAr gValGluIle LeuArgAsnP heTyrPheIleAsnArgLeu
 481 ACAGGTTACC TCCGAAACGA CGATGATGAC AAGGTCGACA AAAGTCACAC ATGCCACCG
 161▶ThrGlyTyrL euArgAsnAs pAspAspAsp LysValAspL ysThrHisTh rCysProPro
 541 TGCCCGAGCAC CTGAACTCCT GGGGGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAAG

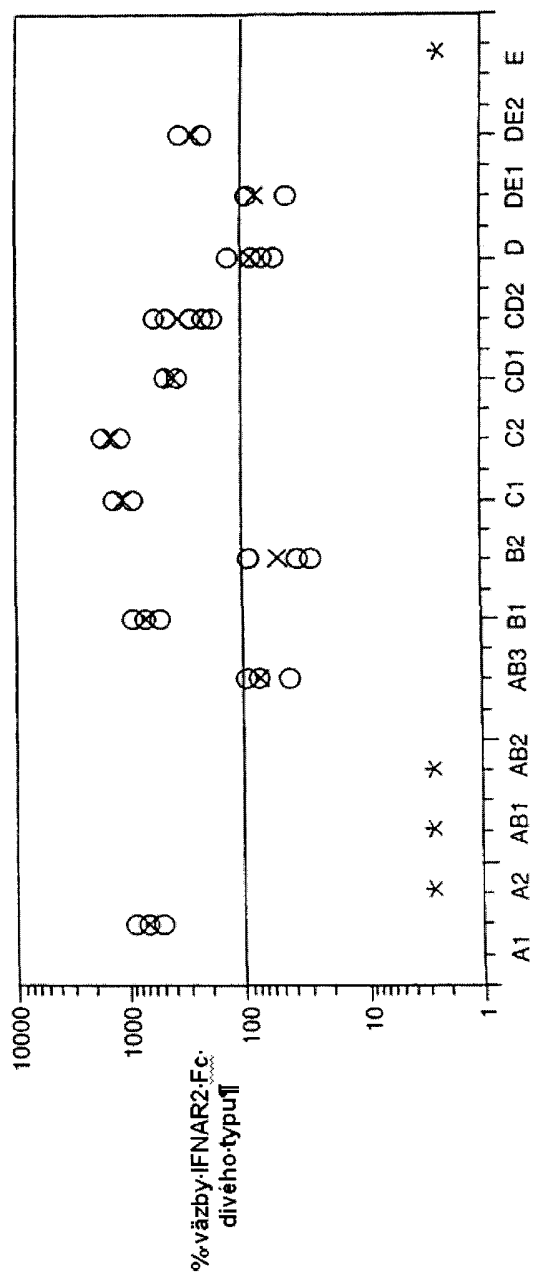
Obr. 2A-2

3/17

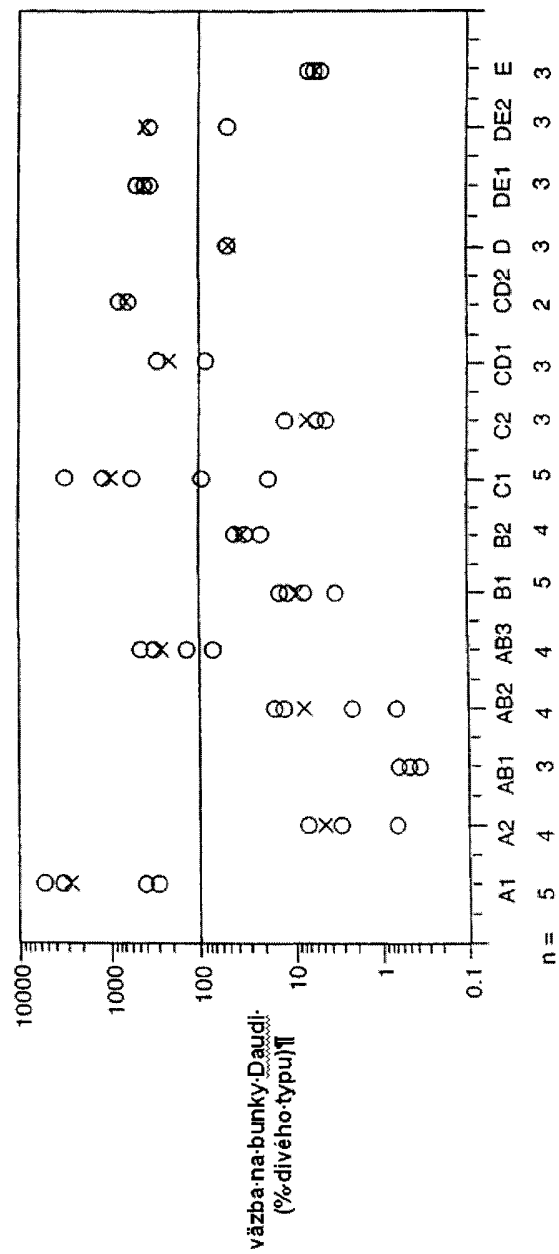
181 ▶CysProAlaP roGluLeuLe uGlyGlyPro SerValPheL euPheProPr oLysProLys
 601 GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC
 201 ▶AspThrLeuM etIleSerAr gThrProGlu ValThrCysV alValValAs pValSerHis
 661 GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG
 221 ▶GluAspProG luValLysPh eAsnTrpTyr ValAspGlyV alGluValHi sAsnAlaLys

Obr. 2B

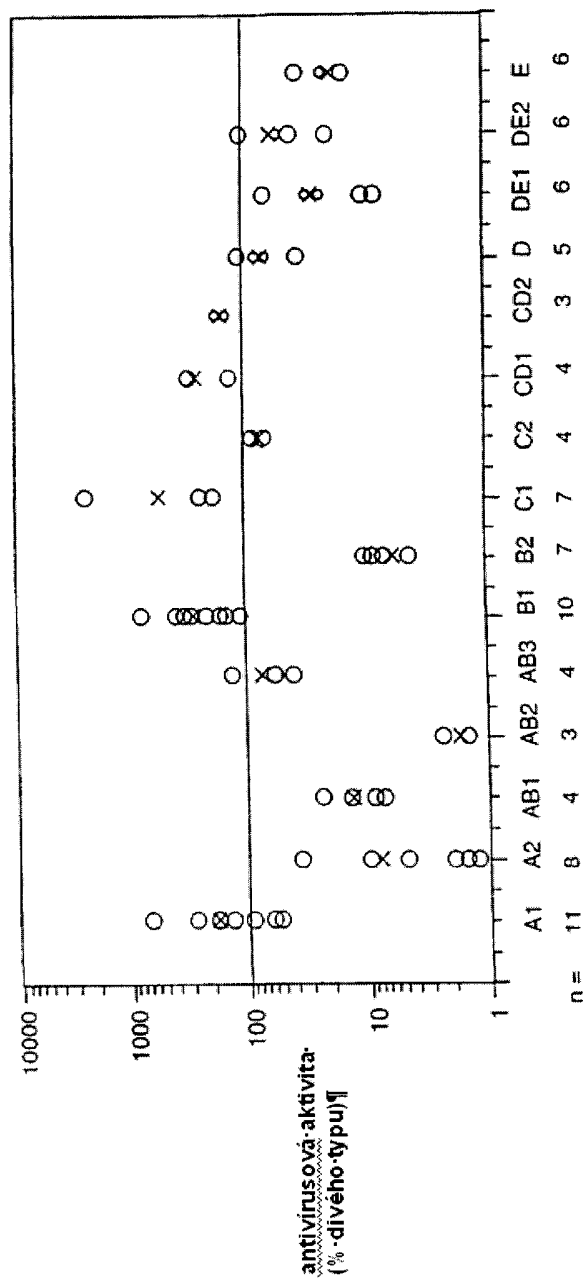
721 ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC
 1▶ThrLysProA rgGluGluGl nTyrAsnSer ThrTyrArgV alValSerVa lLeuThrVal
 781 CTGCACCAGG ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC
 21▶LeuHisGlnA spTrpLeuAs nGlyLysGlu TyrLysCysL ysValSerAs nLysAlaLeu
 841 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA ACCACAGGTG
 41▶ProAlaProI leGluLysTh rIleSerLys AlaLysGlyG lnProArgGl uProGlnVal
 901 TACACCCTGC CCCCATCCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACC AGGTCAGCCT GACCTGCCTG
 61▶TyrThrLeuP roProSerAr gAspGluLeu ThrLysAsnG lnValSerLe uThrCysLeu
 961 GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG
 81▶ValLysGlyP heTyrProSe rAspIleAla ValGluTrpG luSerAsnGl yGlnProGlu
 1021 AACAACTACA AGACCACGCC TCCCGTGTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC
 101▶AsnAsnTyrL ysThrThrPr oProValLeu AspSerAspG lySerPhePh eLeuTyrSer
 1081 AAGCTACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
 121▶LysLeuThrV alAspLysSe rArgTrpGln GlnGlyAsnV alPheSerCy sSerValMet
 1141 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC CGGGAAA
 141▶HisGluAlaL euHisAsnHi sTyrThrGln LysSerLeuS erLeuSerPr oGlyLys



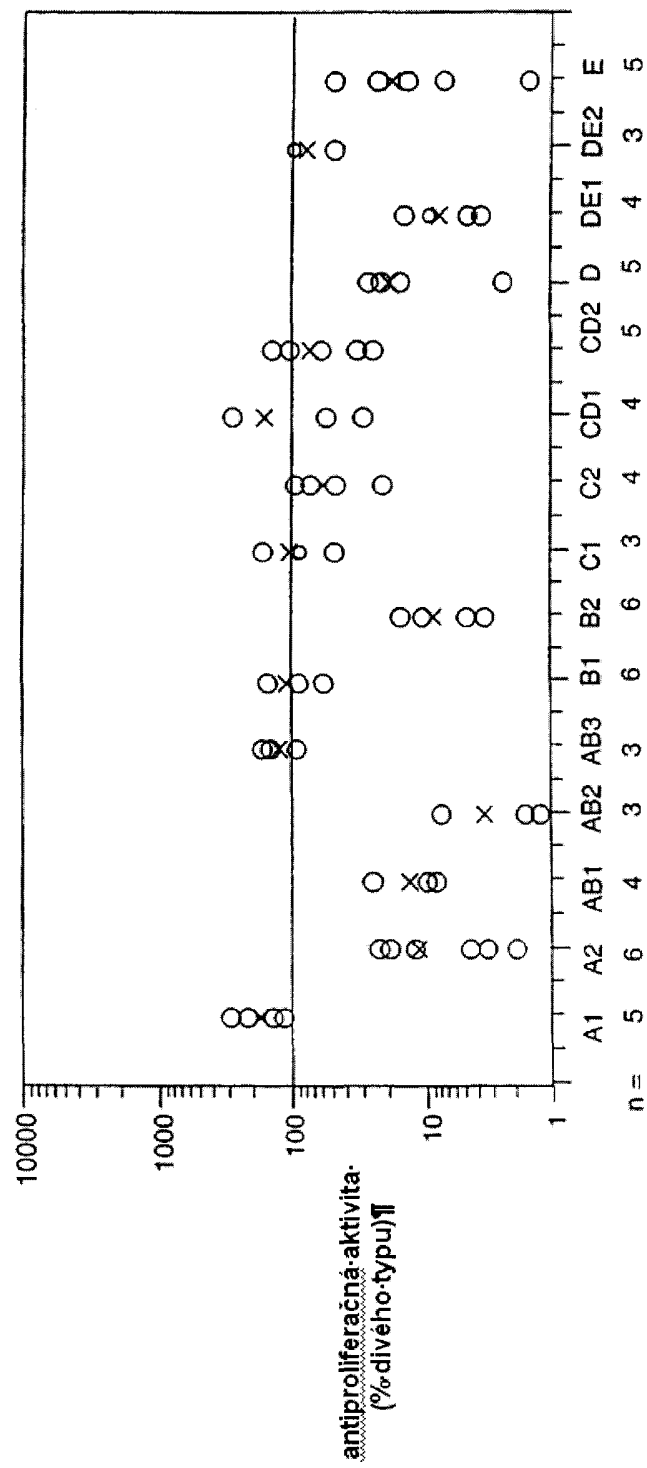
Obr. 3



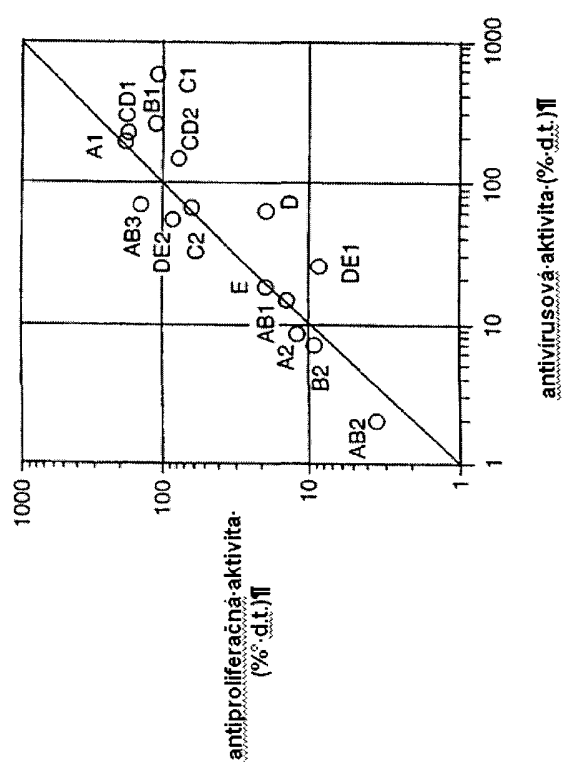
Obr. 4



Obr. 5

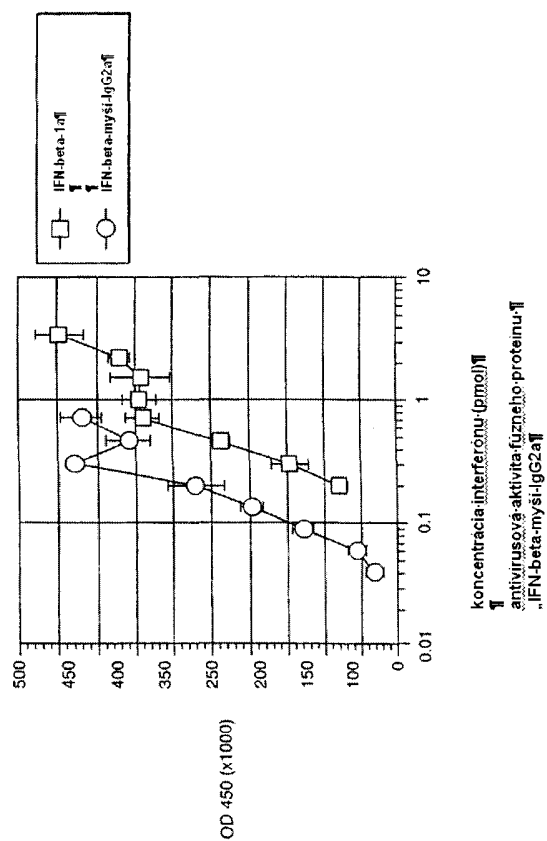


Obr. 6

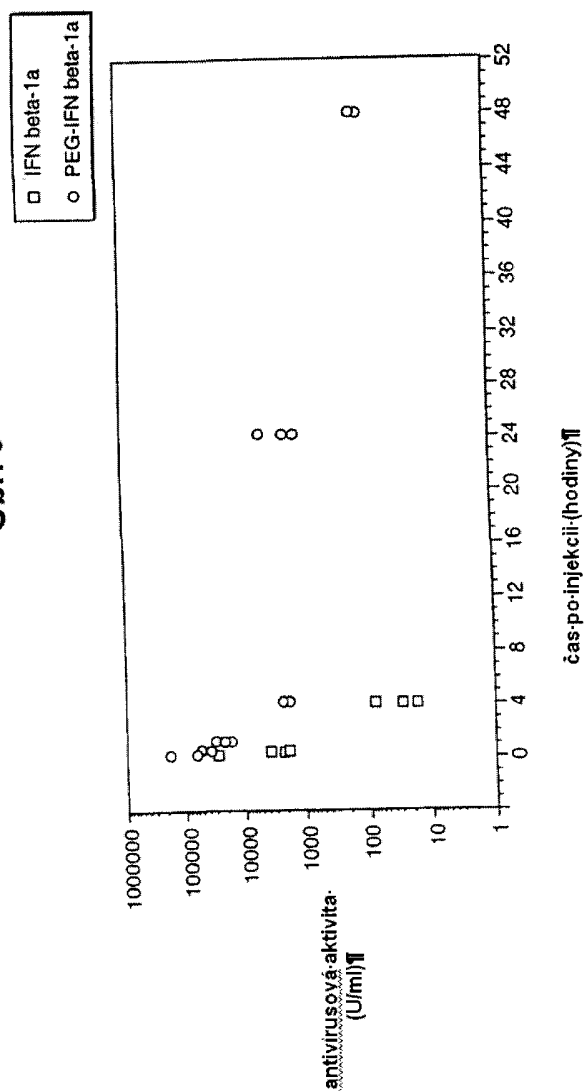


Obr. 7

Obr. 8



Obr. 9



Otvorený-čítací-rámec-konstruktú-priamej-fúzie-IFN-beta-G162C-Ig1

10A
10B
10C

Obr. 10

11/17

1 ATGCCTGGGAAGATGGTCGTGATCCTTGGAGCCTCAAATATACCTTTGGATAATGTTTGA 60
M P G K M V V I L G A S N I L W I M F A
61 GCTTCTCAAGCCATGAGCTACAACCTTGCCTTGGATTCTTACAAAGAGCAGCAATTTTCAG 120
A S Q A M S Y N L L G F L Q R S S N F Q
121 TGTCAAGAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCCTCAAGGACAGGATG 180
C Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R M
181 AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAGGAGGACGCGCA 240
N F D I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A
241 TTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAGATTCATCTAGC 300
L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S
301 ACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGCTATCATCAGATTAAC 360
T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I N
361 CATCTGAAGACAGTCTCGGAAGAAAACTGGAGAAAGAGATTTCACCCAGGGGAAACTC 420
H L K T V L E E K L E K E D F T R G K L
421 ATGAGCAGTCTGCACCTGAAAGATATTATGGAGGAGTTCTGCATTACCTGAAGGCCAAG 480
M S S L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K

Obr. 10A

481 GAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTACTTC 540
E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F

541 ATTAACAGACTTACATGTTACCTCCGAAACGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGC 600
I N R L T C Y L R N V D K T H T C P P C

601 CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC 660
P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D

661 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA 720
T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E

721 GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA 780
D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T

781 AACCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTG 840
K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L

841 CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA 900
H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P

901 GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC 960
A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y

Obr. 10B

961 ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC 1020
T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V

1021 AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC 1080
K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N

1081 AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG 1140
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K

1141 CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT 1200
L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H

1201 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAATGA 1257
E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *

Obr. 10C

11A
11B
11C

Obr. 11

14/17

Otvorený citací rámeček - konštruktu-fúzie-IFN-beta-G162C-Ig s-linkerom-G4S

1 ATGCCTGGGAAGATGCTCGTGATCCTTGGAGCCCTCAAAATATATACTTTGGATAATGTTTGCA 60
M P G K M V V I L G A S N I L W I M F A
61 GCTTCTCAAGCCATGAGCTACAACCTGCTTGGATTCTTCAAAAGAGCAGCAATTTTCAG 120
A S Q A M S Y N L L G F L Q R S S N F Q
121 TGTCAGAAAGCTCCTGTGGCAATTTGAATGGAGGCTTGAATACTGCTCAAGGACAGGATG 180
C Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R M
181 AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGAGCCGCA 240
N F D I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A
241 TTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGGCTATTTTCAGACAGATTTCATCTAGC 300
L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S
301 ACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGCTATCATCATATAAAC 360
T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I N
361 CATCTGAGACAGTCTCGAAGAAACTGGAGAAAGAGATTTCACCGGGGAAACTC 420
H L K T V L E E K L E K E D F T R G K L

Obr. 11A

421 ATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAG 480
M S S L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K

481 GAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACCTTTACTTC 540
E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F

541 ATTAACAGACTTACATGTTACCTCCGAAACGGCGGTGGTGGCAGCGTCGACAAAACCTCAC 600
I N R L T C Y L R N G G G G S V D K T H

601 ACATGCCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC 660
T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P

661 CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG 720
P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V

721 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG 780
D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V

781 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC 840
H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S

841 GTCTTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC 900
V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S

901 AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA 960
N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R

Obr. 11B

961 GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC 1020
 E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S

1021 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT 1080
 L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N

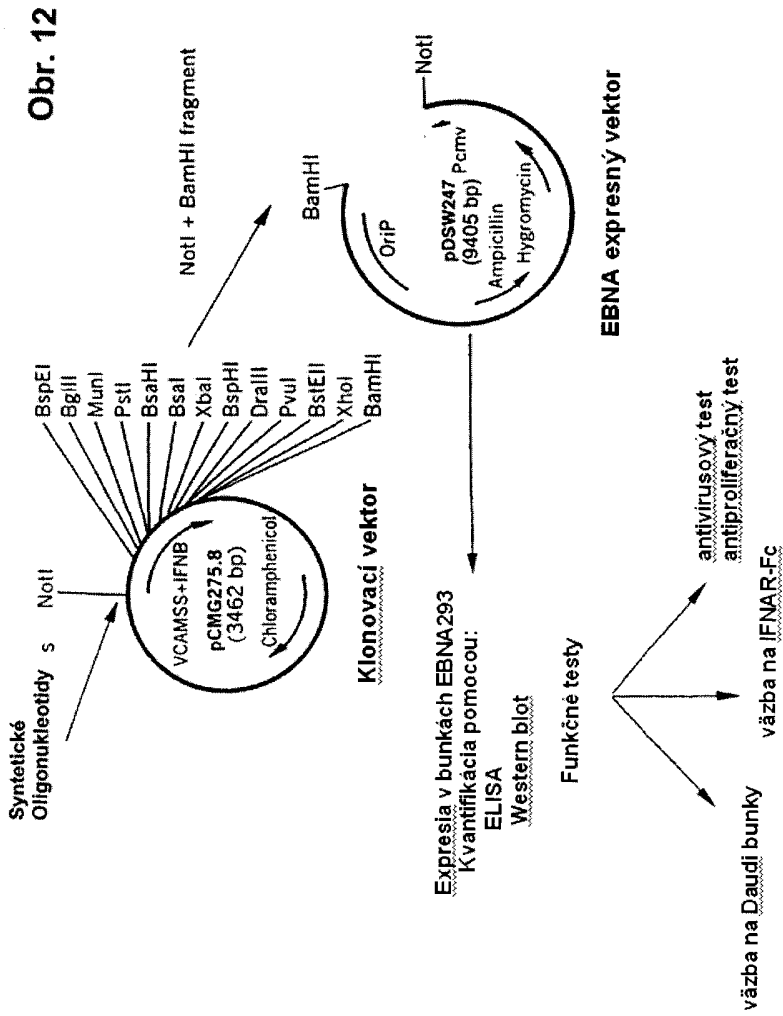
1081 GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC 1140
 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F

1141 TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA 1200
 F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S

1201 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT 1260
 C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S

1261 CCCGGGAAATGA 1272
 P G K *

Obr. 11C



Koniec dokumentu