FI000120356B



(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 120356 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **30.09.2009**

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C12N 15/22 (2006.01)
C07K 14/565 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **963630**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag **13.09.1996**

(24) Alkupäivä - Löpdag **13.03.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **13.09.1996**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/US1995/003206**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

15.03.1994 US 213448 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 • Biogen Idec MA Inc., 15 Cambridge Center, CAMBRIDGE, MA 02142, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 • Goelz, Susan E., 195 Pond Street, Winchester, MA 01890, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • Cate, Richard L., 64 Arrowhead Road, Weston, MA 02193, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • Chow, E. Pingchang, 197 Eighth Street, #706, Charlestown, MA 02129, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • Pepinsky, Blake R., 69 Parker Street, #2, Watertown, MA 02172, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud

Kolster Oy Ab, Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

IFN-ß:n uusia muteiineja

Nya muteiner av IFN-ß

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism

69584 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP 0041313 B1, WO 93/15609 A1,
Mark, D.F. et al., "Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene", Proc Natl Acad Sci USA, Syyskuu 1984, vol. 81, p. 5662-5666, Wu, S., et al., "A study on the relationship between the N terminal variation of human interferon beta and its antiviral activity", Chemical Abstracts, Joulukuu 1988, vol. 109, nro 23, p. 515 (tiivistelmä)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

IFN-ß-muteiini, jossa phe (F), tyr (Y), trp (W) tai his (H) on korvattu val:lla (V) asemassa 101 numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen, näitä IFN-ß-muteiineja koodittavia DNA-sekvenssejä, yhdistelmä-DNA-molekyylejä, jotka sisältävät näitä DNA-sekvenssejä operatiivisesti kytkettyinä ilmentymisen kontrollisekvensseihin ja kykenevät indusoimaan IFN-ß-muteiinin ilmentymisen, näillä yhdistelmä-DMA-molekyyleillä transformoituja isäntiä, farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät IFN-ß-muteiineja, ja menetelmiä näiden koostumusten käyttämiseksi virustartuntojen, syövän tai kasvainten hoitamiseksi tai immuunimodulaatioon.

IFN-ß-mutein, vari phe (F), tyr (Y), trp (W) eller his (H) har ersatts med val (V) i 101-ställning, varvid numreringen överensstämmer med numreringen för den vilda typen IFN-ß, DNA-sekvenser, som kodar dessa IFN-ß-muteiner, rekombinant-DNA-molekyler, som innehåller DNA-sekvenser, som förmår binda operativt expressionkontrollerande sekvenser och som förmår inducera expression av ett IFN-ß-mutein, med dessa rekombinant-DNA-molekyler transformerade värdar, farmaceutiska kompositioner, som innehåller IFN-ß-muteiner, och sätt för användning av dessa kompositioner för behandling av virusinfektioner, cancer eller tumörer eller för immunmodulation.

								10											20
M	S	Y	N	L	L	G	F	L	Q	R	S	S	N	F	Q	C	Q	K	L
								30											40
L	W	Q	L	N	G	R	L	E	Y	C	L	K	D	R	M	N	F	D	I
								50											60
P	E	E	I	K	Q	L	Q	Q	F	Q	K	E	D	A	A	L	T	I	Y
								70											80
E	M	L	Q	N	I	F	A	I	F	R	Q	D	S	S	S	T	G	W	N
								90											100
E	T	I	V	E	N	L	L	A	N	V	Y	H	Q	I	N	H	L	K	T
								110											120
F	L	E	E	K	L	E	K	E	D	F	T	R	G	K	L	M	S	S	L
								130											140
H	L	K	R	Y	Y	G	R	I	L	H	Y	L	K	A	K	E	Y	S	H
								150											160
C	A	W	T	I	V	R	V	E	I	L	R	N	F	Y	F	I	N	R	L
T	G	Y	L	R	N														

IFN-ß:n uusia muteiineja

Keksinnön tekninen aihepiiri

Tämä keksintö koskee interferoni-betan ("IFN-ß") muteiineja, joissa val (V) asemassa 101 numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F), trp:llä (W), tyr:llä (Y) tai his:llä (H).

Keksinnön tausta

Interferonit ovat yksiketjuisia polypeptidejä, joita erittävät useimmat eläinsolut vasteena erilaisiin induso-reihin, mukaan lukien virukset, mitogeenit ja polynukleotidit. Interferonit osallistuvat solufunktion säätelyyn, ja niillä on virusvastaisia, lisääntymistä vastustavia ja immuunimodulatorisia ominaisuuksia. Natiivit ihmisinterferonit luokitellaan kolmeen pääasialliseen tyyppiin: α-IFN (leukosyytti), IFN-ß (sidekudosta muodosta solu) ja γ-IFN (immuuni). Natiivia IFN-ß:aa tuottavat pääasiassa diploidiset sidekudosta muodostavat solut ja vähemmässä määrin imusolujen varhaismuodot.

IFN-ß on glykoproteiini. Sen nukleiinihappo- ja aminohapposekvenssit on määritetty [Houghton *et al.*, "The Complete Amino Acid Sequence of Human Fibroblast Interferon as Deduced Using Synthetic Oligodeoxyribonucleotide Primers of Reverse Transcriptase" ("Ihmisen sidekudosta muodostavien solujen interferonin täydellinen aminohapposekvenssi pääteltynä käyttäen käänteiskopioijaentsyymin synteettisiä oligodeoksiribonukleotidialukkeita"), *Nucl. Acids Res. 8* (1980) s. 2885 - 2894; T. Taniguchi *et al.*, "The Nucleotide Sequence of Human Fibroblast DNA" ("Ihmisen sidekudosta muodostavien solujen DNA:n nukleotidisekvenssi"), *Gene 10* (1980) s. 11 - 15]. Yhdistelmä-DNA-IFN-ß:aa on tuotettu ja karakterisoitu.

IFN-ß osoittaa erilaisia biologisia ja immunologisia aktiivisuuksia. Yksi IFN-ß:n biologisista aktiivisuuksista on sen virusvastainen aktiivisuus. Tämä virusvastainen ak-

tiivisuus voidaan neutraloida IFN-ß:n vastaisilla vasta-aineilla; katso julkaisu EP-B1-41 313. IFN-ß-vastaisten vasta-aineiden valmistusta ja puhdistusta kuvataan julkaisussa EP-B1-41 313 ja siinä mainituissa viitteissä. IFN-ß kykenee myös sitoutumaan interferonireseptoreita ilmentäviin soluihin, kuten Daudi-solut tai A549-solut.

Tuloksena näistä aktiivisuuksista IFN-ß:lla on mahdollisia käyttöjä immuuniterapiassa, kasvain- ja syöpävastaisissa terapioissa ja virusvastaisissa terapioissa.

Lukuisia tutkimuksia ja kliinisiä kokeita on suoritettu ja suoritetaan yhä sekä villityyppi- että yhdistelmä-IFN-ß:n kasvain- ja syöpävastaisista ominaisuuksista. Näitä ovat useiden malignien sairauksien hoito kuten luusyöpä, basaalisolusyöpä, kohdunkaulan kasvuhäiriöt, hermon tukisolukasvain, akuutti myeloinen leukemia, multippelimyelooma ja Hodgkinin sairaus. Lisäksi IFN-ß:n on osoitettu aiheuttavan paikallista kasvaimen regressiota ruiskutettuna ihonalaisiin kasvainnystermiin melanoomaa ja rintasyöpää potevilla potilailla.

IFN-ß:aa (villityyppi ja yhdistelmä-DNA) on testattu kliinisesti erilaisissa virustartunnoissa, mukaan lukien papilloomavirukset, kuten sukuelinten syylät ja kohdunkaulan visvasyylät; virushepatiitti, mukaan lukien akuutti/krooninen hepatiitti-A, ja ei-A-, ei-B-hepatiitti (hepatiitti C); sukuelinten herpes; vyöruusu; herpekseen liittyvä sarveiskalvon tulehdus; herpes simplex; viruksen aiheuttama aivokalvontulehdus; sytomegaloviruksen aiheuttama keuhkokuume; ja nuhaviruksen ennalta ehkäisy. Kliinisiä kokeita yhdistelmä-DNA-IFN-ß:lla multippeliskleroosin hoitamiseksi on myös suoritettu ja IFN-ß on hyväksytty USA:ssa myyntiin multippeliskleroosin hoitoon.

Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö antaa käyttöön IFN-ß:n muteiineja, joissa val (V) asemassa 101 numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F), trp:llä

(W), tyr:llä (Y) tai his:llä (H). Tämä keksintö antaa myös käyttöön näitä IFN-ß-muteiineja koodittavia DNA-sekvessejä, yhdistelmä-DNA-molekyylejä, jotka sisältävät näitä sekvenssejä operatiivisesti kytkettyinä ilmentymisen kontrollisekvensseihin ja kykenevät indusoimaan sopivassa isännässä IFN-ß-muteiinien ilmentymisen, isäntiä, jotka on transformoitu näillä yhdistelmä-DNA-molekyyleillä, ja IFN-ß:aa sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia. Nämä koostumukset ovat käyttökelpoisia immuuniterapiassa sekä syöpävastaisissa, kasvainvastaisissa että virusvastaisissa terapioissa.

Suppea kuvaus piirroksista

Kuviossa 1 esitetään tämän keksinnön mukaisen edullisen muteiinin IFN-ß(phe_{101}) (sekvenssi tunnusnumero 1) aminohapposekvenssi.

Kuviossa 2 esitetään edullinen IFN-ß(phe_{101}):tä ja natiivin IFN-ß:n signaalisekvenssiä koodittava degeneraatti-DNA-sekvenssi (sekvenssi tunnusnumero 2).

Kuviossa 3 esitetään analyysi IFN-ß(phe_{101}):n sitoutumisesta interferonireseptorin käsittäviin soluihin. Paneeleissa A ja B esitetään reseptorisitoutumistulokset ^{125}I-IFN-ß(phe_{101}):lle ja vastaavasti villityypin ^{125}I-IFN-ß:lle Daudi-soluihin. Paneeleissa C ja D esitetään reseptorisitoutumistulokset ^{125}I-IFN-ß(phe_{101}):lle ja vastaavasti villityypin ^{125}I-IFN-ß:lle A549-soluihin.

Kuviossa 4 esitetään IFN-ß(phe_{101}):n ja villityyppi-IFN-ß:n analyysi peptidikartoituksella endoproteinaasi-Lyse-C:llä.

Kuviossa 5 esitetään, että villityyppi-IFN-ß-vastaiset vasta-aineet neutraloivat IFN-ß(phe_{101}):n ja villityyppi-IFN-ß:n aktiivisuuden.

Yksityiskohtainen kuvaus keksinnöstä

Tässä käytettynä "villityppi-IFN-ß" merkitsee IFN-ß:aa, joko natiivia tai yhdistelmä-DNA-teknistä, jolla on natiivin ihmis-IFN-ß:n normaalisti esiintyvä aminohapposekvenssi, esim. julkaisusta EP-B1-41 313, kuvio 4.

Tässä käytettynä "IFN-ß-muteiini" merkitsee polypeptidiä, jossa val (V) asemassa 101 numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F), trp:llä (W), tyr:llä (Y) tai his:llä (H), edullisesti phe:llä (F). Edullisimpien IFN-ß-muteiiniemme aminohapposekvenssi on identtinen villityyppi-IFN-ß:aan nähden muissa tähteissä. Kuitenkin tämän keksinnön mukaisille IFN-ß-muteiineille voivat myös olla tunnusomaisia aminohappojen insertiot, deleetiot, substituutiot ja modifikaatiot natiivin IFN-ß-polypeptidiketjun yhdessä tai useammassa kohdassa tai muissa tähteissä. Tämän keksinnön mukaan kaikki tällaiset insertiot, deleetiot, substituutiot ja modifikaatiot johtavat IFN-ß-muteiiniin, jolla on tallella virusvastainen aktiivisuus, jonka voivat ainakin osittain neutraloida villityyppi-IFN-ß:n vastaiset vasta-aineet.

Pidämme edullisina konservatiivisia modifikaatioita ja substituutioita (eli niitä, joilla on minimaalinen vaikutus muteiinin sekundaari- tai tertiaarirakenteeseen). Tällaisia konservatiivisia substituutioita ovat ne, joita kuvaavat Dayhoff julkaisussa *Atlas of Protein Sequence and Structure 5* (1978); ja Argos julkaisussa *EMBO J. 8* (1989) s. 779 - 785. Esimerkiksi aminohapot, jotka kuuluvat johonkin seuraavaan ryhmään, edustavat konservatiivisia muutoksia:

ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr;
cys, ser, tyr, thr;
val, ile, leu, met, ala, phe;
lys, arg, his; ja
phe, tyr, trp, his.

Pidämme samoin edullisina modifikaatioita tai substituutioita, jotka poistavat kohdat molekyylien väliselle ristikytkeytymiselle tai vääränlaisen disulfidisiltamuodostuksen. Esimerkiksi IFN-ß:n tiedetään käsittävän 3 cys-tähdettä villityypin asemissa 17, 31 ja 141. US-patenttijulkaisussa 4 588 585 viitataan IFN-ß-muteiiniin,

jossa cys (C) asemassa 17 on substituoitu ser:llä (S). Tätä substituutiota voidaan niinikään käyttää tässä keksinnössä. Esimerkiksi tämä keksintö tarkastelee IFN-ß-muteiinia, jossa cys (C) asemassa 17 on korvattu ser:llä (S) ja val (V) asemassa 101 on korvattu phe:llä (F), trp:llä (W), tyr:llä (Y) tai his:llä (H), edullisesti phe:llä (F) numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen.

"Numeroinnilla villityyppi-IFN-ß:n mukaan" tarkoitamme, että valittu aminohappo identifioidaan viittaamalla asemaan, jossa tuo aminohappo normaalisti esiintyy villityyppi-IFN-ß:ssa. Kun insertioita tai deleetioita tehdään IFN-ß-muteiiniin, alan taitaja huomaa, että val (V), joka normaalisti esiintyy asemassa 101 numeroituna villityyppi-IFN-ß:n mukaan voi olla asemaltaan siirtynyt muteiinissa. Kuitenkin siirtyneen val:n (V) sijainti voidaan helposti määrittää tarkastelmalla ja korreloimalla sivuavat aminohapot aminohappoihin, jotka sivuavat val_{101}:tä villityyppi-IFN-ß:ssa.

Esillä olevan keksinnön mukaiset IFN-ß-muteiinit voidaan tuottaa millä tahansa, alalla tunnetulla menetelmällä. Tällläinen menetelmä on DNA-sekvenssin rakentaminen, joka koodittaa tämän keksinnön mukaisia IFN-ß-muteiineja, ja näiden sekvenssien ilmentäminen sopivassa transformoidussa isännässä. Tällä menetelmällä saadaan tämän keksinnön mukaisia yhdistelmä-DNA-muteiineja. Kuitenkin tämän keksinnön mukaisia muteiineja voidaan tuottaa myös, joskin vähemmän edullisesti, kemiallisesti syntetisoimalla tai kemiallisen synteesin ja yhdistelmä-DNA-teknologian yhdistelmällä.

Yhdistelmä-DNA-teknisen menetelmän tämän keksinnön mukaisen muteiinin tuottamiseksi yhdessä suoritusmuodossa rakennetaan DNA-sekvenssi eristämällä tai syntetisoimalla DNA-sekvenssi, joka koodittaa villityyppi-IFN-ß:aa, minkä jälkeen kodoni val_{101}:lle vaihdetaan kodoniin phe:lle (F), trp:lle (W), tyr:lle (Y) tai his:lle (H), edullisesti

phe:lle (F), paikkakohdennetusti mutagenisoimalla. Tämä tekniikka on tuttu. Katso esim. Mark *et al.*, "Site-spesific Mutagenesis Of The Human Fibroblast Interferon Gene" ("Ihmisen sidekudosmuodostussolun interferonigeenin paikkakohdennettu mutagenisointi"), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81* (1984) s. 5662 - 5666; US-patenttijulkaisu nro 4 588 585, jotka sisällytetään tähän viitteiksi.

Toinen menetelmä tämän keksinnön mukaisia IFN-ß-muteiineja koodittavan DNA-sekvenssin rakentamiseksi olisi kemiallinen synteesi. Esimerkiksi geeni, joka koodittaa halutun IFN-ß-muteiinin, voidaan syntetisoida kemiallisin keinoin oligonukleotidisyntetisaattoria käyttäen. Tällaiset oligonukleotidit suunnitellaan ja rakennetaan halutun IFN-ß-muteiinin aminohapposekvenssin perusteella, ja edullisesti valiten ne kodonit, jotka ovat suosituimmuusasemassa isäntäsolussa, jossa yhdistelmä-DNA-muteiini tuotetaan. Tässä suhteessa ollaan hyvin perillä siitä, että geneettinen koodi degeneroituu -- että aminohappoa voi koodittaa useampi kuin yksi kodoni. Esimerkiksi phe:tä (F) koodittaa kaksi kodonia, TTC tai TTT, tyr:ä (Y) koodittaa TAC tai TAT, ja his:ä (H) koodittaa CAC tai CAT. Trp:tä (W) koodittaa yksittäinen kodoni, TGG. Täten tulee huomata, että kohden jotain tiettyä DNA-sekvenssiä, joka koodittaa jotain nimenomaista IFN-ß-muteiinia, on olemassa monia degeneroituneita DNA-sekvenssejä, jotka koodittavat tuota IFN-ß-muteiinia. Esimerkiksi tulee huomata, että kuviossa 2 esitetyn edullisen DNA-sekvenssin lisäksi on monia degeneroituneita DNA-sekvenssejä, jotka koodittavat kuviossa 1 esitettyä IFN-ß-muteiinia. Nämä degeneroituneet DNA-sekvenssit katsotaan kuuluviksi tämän keksinnön suojapiiriin.

DNA-sekvenssi, joka koodittaa tämän keksinnön mukaista IFN-ß-muteiinia, onpa se valmistettu paikkakohdennetusti mutagenisoimalla, synteettisesti tai muilla menetelmillä, voi myös sisältää tai olla sisältämättä DNA-sekvenssejä, jotka koodittavat signaalisekvenssiä. Jos täl-

lainen signaalisekvenssi on läsnä, sen tulisi olla sekvenssi, jonka IFN-ß-muteiinin ilmentämiseksi valittu solu tunnistaa. Se voi olla prokaryoottinen, eukaryoottinen tai näiden kahden yhdistelmä. Se voi myös olla natiivin IFN-ß:n signaalisekvenssi. Signaalisekvenssin mukaan sisällyttäminen riippuu siitä, halutaanko erittää IFN-ß-muteiini yhdistelmä-DNA-soluista, joissa se on valmistettu. Jos valitut solut ovat prokaryoottisia, on yleensä edullista, että DNA-sekvenssi ei koodita signaalisekvenssiä. Jos valitut solut ovat eukaryoottisia, on yleensä edullisesta, että signaalisekvenssi on kooditettu ja että edullisimmin käytetään villityyppi-IFN-ß:n signaalisekvenssiä.

Vakiomenetelmiä voidaan käyttää geenin syntetisoimiseksi, joka koodittaa tämän keksinnön mukaista IFN-ß-muteiinia. Esimerkiksi täydellistä aminohapposekvenssiä voidaan käyttää takaisin translatoidun ("back-translated") geenin rakentamiseksi. Voidaan syntetisoida DNA-oligomeeri, joka sisältää IFN-ß-muteiinia koodittavan nukleotidisekvenssin. Esimerkiksi useita pieniä oligonukleotidejä, jotka koodittavat osia halutusta polypeptidistä, voidaan syntetisoida ja sitten ligatoida. Yksittäiset oligonukleotidit sisältävät tyypillisesti 5'- tai 3'-ylijäämäpäitä komplementaariseen kokoamiseen.

Kun tämän keksinnön mukaista IFN-ß-muteiinia koodittavat DNA-sekvenssit on koottu (syntetisoimalla, paikkakohdennetusti mutagenisoimalla tai muulla menetelmällä), ne insertoidaan ilmentämisvektoriin ja kytketään operatiivisesti ilmentämisen kontrollisekvenssiin, joka sopii IFN-ß-muteiinin ilmentämiseen halutussa transformoidussa isännässä. Oikeanlainen kokoaminen voidaan vahvistaa nukleotidisekventoinnilla, restriktiokartoituksella ja ilmentämällä biologisesti aktiivinen polypeptidi sopivassa isännässä. Kuten alalla hyvin tiedetään, transfektoidun geenin korkeiden ilmentämistasojen saamiseksi sännässä, geenin on oltava operatiivisesti kytketty transkriptionaalisiin ja transla-

tionaalisiin ilmentämisen kontrollisekvensseihin, jotka ovat funktionaalisia halutussa ilmentämisisännässä.

Ilmentämiskontrollisekvenssin ja ilmentämisvektorin valinnat riippuvat isännän valinnasta. Voidaan käyttää laajaa valikoimaa ilmentämisisäntä/vektoriyhdistelmiä. Käyttökelpoisia ilmentämisvektoreita eukaryoottisille isännille ovat esimerkiksi vektorit, jotka käsittävät ilmentämisen kontrollisekvenssejä SV40:stä, naudan papilloomaviruksesta, adenoviruksesta ja sytomegaloviruksesta. Käyttökelpoisia ilmentämisvektoreita bakteeri-isännille ovat tunnetut bakteeriplasmidit, kuten *E. coli* -plasmidit, mukaan lukien El, pCR1, pBR322, pMB9 ja niiden johdannaiset, laajemman isäntäskaalan plasmidit, kuten RP4, fagi-DNA:t, esim. lambdafagin lukuisat johdannaiset, esim. NM989, ja muut DNA-fagit, kuten M13 ja rihmaiset yksisäikeiset DNA-fagit. Käyttökelpoisia ilmentämisvektoreita hiivasoluille ovat 2µ-plasmidi ja sen johdannaiset. Käyttökelpoinen vektori hyönteissoluille ovat pVL 941. Pidämme edullisena pBG311:tä. Cate *et al.*, "Isolation Of The Bovine And Human Genes For Mullerian Inhibiting Substance And Expression Of The Human Gene In Animal Cells" ("Nauta- ja ihmisgeenien Mullerian-inhibointiaineelle eristäminen ja ihmisgeenin ilmentäminen eläinsoluissa"), *cell 45* (1986) s. 685 - 698.

Lisäksi mitä tahansa laajasta valikoimasta ilmentämiskontrollisekvenssejä voidaan käyttää näissä vektoreissa. Tällaisia käyttökelpoisia ilmentämisen kontrollisekvenssejä ovat ilmentämisen kontrollisekvenssit, jotka liittyvät edeltävien ilmentämisvektorien rakennegeeneihin. Esimerkkejä käyttökelpoisista ilmentämisen kontrollisekvensseistä ovat esimerkiksi SV40:n tai adenoviruksen varhais- ja myöhäispromoottorit, *lac*-systeemi, *trp*-systeemi, *TAC*- tai *TRC*-systeemi, lambda-fagin pääasialliset operaattori- ja promoottorialueet, esimerkiksi PL, fd-kuoriproteiinin kontrollialueet, 3-fosfoglyseraattikinaasin tai muiden glykolyyttisten entsyymien promoottorit, happaman fosfataasin pro-

moottorit, esim. Pho5, hiivan α-pariutumissysteemin promoottorit, ja muut sekvenssit, joiden tiedetään kontrolloivan prokaryoottisten tai eukaryoottisten solujen tai niiden virusten geenien ilmentymistä, ja mainittujen erilaiset yhdistelmät.

Mitä tahansa sopivaa isäntää voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisten IFN-ß-muteiinien tuottamiseksi, mukaan lukien bakteerit, fungi (mukaan lukien hiivat), kasvi-, hyönteis-, nisäkäs- tai muut sopivat eläinsolut tai solulinjat, sekä transgeeniset eläimet tai kasvit. Tarkemmin ottaen nämä isännät voivat käsittää tuttuja eukaryoottisia ja prokaryoottisia isäntiä, mukaan lukien kannat *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, fungi, hiivat, hyönteissolut kuten *Spodoptera frugiperda* (SF9), eläinsolut kuten kiinalaisen hamsterin munasarja (CHO) -solut ja hiirisolut kuten NS/0, afrikkalaisen vihreän apinan solut kuten COS-1, COS-7, BSC-1, BSC-40 ja BMT 10, ja ihmissolut sekä kasvisolut kudosviljelmässä. Eläinsoluilmennykseen pidämme edullisina CHO-soluja ja COS-7-soluja viljelmissä ja erityisesti CHO-DDUKY-ß1-solulinjaa (*infra*, s. 18 - 19).

Tulisi tietysti ymmärtää, etteivät kaikki vektorit ja ilmentämisen kontrollisekvenssit toimi yhtä hyvin tässä kuvattujen DNA-sekvenssien ilmemtämiseksi. Myöskään kaikki isännät eivät toimi yhtä hyvin samassa ilmentämissysteemissä. Kuitenkin alan taitaja kykenee tekemään valinnan näiden vektorien, ilmentämisen kontrollisekvenssien ja isäntien välillä ilman ylenpalttista kokeilua. Esimerkiksi valittaessa vektoria isäntää on harkittava, koska vektorin on replikoiduttava siinä. Myös tulisi harkita vektorin kopiolukua, mahdollisuutta kontrolloida tuota kopiolukua, ja vektorin mahdollisesti koodittamien muiden proteiinien ilmentymistä, kuten antibioottimerkit. Esimerkiksi edullisia vektoreita tässä keksinnössä käytettäväksi ovat ne, jotka sallivat IFN-ß-muteiineja koodittavan DNA:n monistua kopioluvulla. Tällaisia monistuvia vektoreita tunnetaan alalla

hyvin. Niitä ovat esimerkiksi vektorit, joita voidaan monistaa DHFR-monistuksella [katso esim. Kaufman, US-patenttijulkaisu 4 470 461, Kaufman ja Sharp, "Construction Of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis of Signals Utilized For Efficient Expression" ("Modulaarisen dihydrofolaattireduktaasi-cDNA-geenin rakentaminen: Tehokkaaseen ilmentymiseen käytettyjen signaalien analyysi"), **Mol. Cell. Biol. 2** (1982) s. 1304 - 1319] tai glutamiinisyntetaasi ("GS") -monistuksella (katso esim. US-patenttijulkaisu 5 122 464 ja EP-patenttihakemusjulkaisu nro 338 841).

Ilmentämisen kontrollisekvenssiä valittaessa tulisi myös harkita lukuisia erilaisia tekijöitä. Näitä ovat esimerkiksi sekvenssin suhteellinen voimakkuus, sen kontrolloitavuus ja sen yhteensopivuus tosiasiallisen DNA-sekvenssin kanssa, joka koodittaa tämän keksinnön mukaista IFN-ß-muteiinia, erityisesti mitä tulee mahdollisiin sekundaarirakenteisiin. Isännät tulisi valita tarkastelemalla niiden yhteensopivuutta valitun vektorin kanssa, tämän keksinnön mukaisten DNA-sekvenssien koodittaman tuotteen toksisuutta, niiden eritysominaisuuksia, niiden kykyä laskostaa polypeptidit oikein, niiden fermentointi- ja viljelyvaatimuksia, ja DNA-sekvenssien koodittamien tuotteiden puhdistuksen helppoutta.

Näiden parametrien puitteissa alan taitaja voi valita erilaisia vektori/ilmentämisen kontrollisekvenssi/isäntäyhdistelmiä, jotka ilmentävät halutut DNA-sekvenssit fermentoitaessa tai suuren mittakaavan eläinviljelmässä käyttäen esimerkiksi CHO-soluja tai COS-7-soluja.

Esillä olevan keksinnön mukaan saadut IFN-ß-muteiinit voivat olla glykosyloituja tai ei-glykosyloituja riippuen muteiinin tuottamiseksi käytetystä iäsntäorganismista. Jos bakteerit valitaan isännäksi, tuotettu IFN-ß-muteiini on ei-glykosyloitu. Toisaalta eukaryoottiset solut

glykosyloivat IFN-ß-muteiinit, vaikkakaan mahdollisesti eivät samalla tavalla kuin natiivi IFN-ß on glykosyloitu.

Transformoidun isännän tuottamaa IFN-ß-muteiinia voidaan puhdistaa millä tahansa sopivalla menetelmällä. Erilaisia menetelmiä IFN-ß:n puhdistamiseksi tunnetaan. Katso esim. US-patenttijulkaisut 4 289 689, 4 359 389, 4 172 071, 4 551 271, 5 244 655, 4 485 017, 4 257 938 ja 4 541 952. Pidämme edullisena immuuniaffiniteettipuhdistusta. Katso esim. Okamura *et al.*, "Human Fibroblastoid Interferon: Immunosorbent Column Chromatography And N-Terminal Amino Acid Sequence" ("Ihmisen sidekudosmuodostussoluinterferoni: Immuunisorbenttikolonnikromatografia ja N-pään aminohapposekvenssi"), *Biochem. 19* (1980) s. 3831 - 3835.

Tämän keksinnön mukaisten IFN-ß-muteiinien biologinen aktiivisuus voidaan määrittää millä tahansa, alalla tunnetulla sopivalla menetelmällä. Tällaisiin määrityksiin lukeutuvat virusvastaisen aktiivisuuden neutralointi vasta-aineilla, proteiinikinaasi-, oligoadenylaatti-2,5-A-syntetaasi- tai fosfodiesteraasiaktiivisuuksien indusointi, kuten kuvataan julkaisussa EP-B1-41 313. Tällaisiin määrityksiin lukeutuvat myös immuunimodulatoriset määritykset (katso esim. US-patenttijulkaisu 4 753 795), kasvuinhibitiomääritykset ja sitoutumisen interferonireseptoreita ilmentäviin soluihin mittaus.

Tämän keksinnön mukaista IFN-ß-muteiinia annetaan annos, joka suurin piirtein vastaa annosta, jota käytetään terapiassa villityypin natiivi- tai yhdistelmä-DNA-IFN-ß:lla. Edullisesti annetaan IFN-ß-muteiinia tehokas määrä. "Tehokas määrä" tarkoittaa määrää, joka kykenee estämään tai vähentämään hoidettavan tilan tai indikaation vakavuutta tai leviämistä. Alan taitajille on ilmeistä, että tehokas määrä IFN-ß-muteiinia riippuu muun muassa sairaudesta, annoksesta, IFN-ß-muteiinin anto-ohjelmasta, siitä, annetaanko IFN-ß-muteiinia yksinään vain muiden terapeuttisten

aineiden yhteydessä, koostumuksen puoliintumisajasta seerumissa ja potilaan yleisestä terveydentilasta.

IFN-ß-muteiini annetaan edullisesti koostumuksessa, joka sisältää farmaseuttisesti hyväksyttävää kantajaa. "Farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja" tarkoittaa kantajaa, joka ei aiheuta mitään kielteistä vaikutusta potilaissa, joille sitä annetaan. Tällaiset farmaseuttisesti hyväksyttävät kantajat ovat alalla tuttuja. Pidämme edullisena seerumialbumiinia.

Esillä olevan keksinnön mukaiset IFN-ß-muteiinit voidaan koostaa farmaseuttisiksi koostumuksiksi tutuilla menetelmillä. Katso esim. "Remington's Pharmaceutical Sciences", E. W. Martin, joka sisällytetään tähän viitteeksi, ja jossa kuvataan sopivia koostumuksia. IFN-ß-muteiinin farmaseuttinen kostumus voidaan kostaa erilaisiin muotoihin, mukaan lukien nesteeksi, geeliksi, kylmäkuivatuksi tuotteeksi tai johonkin muuhun sopivaan muotoon. Edullinen muoto riippuu hoidettavasta nimenomaisesta indikaatiosta ja on alan taitajalle ilmeinen.

IFN-ß-muteiinin farmaseuttinen koostumus voidaan antaa oraalisesti, laskimonsisäisesti, lihaksensisäisesti, vatsaontelon sisäisesti, ihonsisäisesti tai ihon alaisesti tai jollain muulla hyväksyttävällä tavalla. Edullinen antomuoto riippuu hoidettavasta nimenomaisesta indikaatiosta ja on ilmeinen alan taitajalle.

IFN-ß:n farmaseuttinen koostumus voidaan antaa muiden terapeuttisten aineiden yhteydessä. Nämä aineet voidaan sisällyttää osaksi samaa farmaseuttist koostumusta tai ne voidaan antaa IFN-ß-muteiinista erillisinä, joko samanaikaisesti tai jonkin muun hyväksyttävän hoito-ohjelman mukaan. Lisäksi IFN-ß-muteiinin farmaseuttista koostumusta voidaan käyttää muiden terapioiden lisänä.

Täten tämä keksintö antaa käyttöön koostumuksia ja menetelmiä virustartuntojen, syöpien tai kasvainten, epänormaalin solukasvun hoitamiseksi, tai immuunimodulaation

saamiseksi missä tahansa sopivassa eläimessä, edullisesti nisäkkäässä, edullisimmin ihmisessä.

Samoin tarkastellaan tämän keksinnön mukaisia IFN-ß-muteiineja koodittavien DNA-sekvenssien käyttöä geeniterapiasovellutuksissa.

Tarkastellut geeniterapiasovellutukset käsittävät niiden sairauksien hoidon, joissa IFN-ß:n odotetaan tuottavan tehokkaan terapian virusvastaisen aktiivisuutensa johdosta, esim. virussairaudet, mukaan lukien hepatiitti ja erityisesti HBV, tai muut tarttuvat sairaudet, jotka reagoivat IFN-ß:aan, tai IFN-ß:lle herkät tarttuvat aineet. Samoin tämä keksintö tarkastelee geeniterapiasovellutuksia immuunimodulaatioon, sekä niiden sairauksien hoitoon, joissa IFN-ß:n odotetaan tuottavan tehokkaan terapian lisääntymistä vastustavan aktiivisuutensa johdosta, esim. kasvaimet tai syövät, tai muut tilat, joille on karakteristista epätoivottava solukasvu, kuten verisuonten uudelleenahtautuminen.

IFN-ß:n paikallinen perille kuljettaminen geeniterapiaa käyttäen voi viedä terapeuttisen aineen kohdealueelle siten, että vältetään mahdolliset myrkyllisyysongelmat, jotka liittyvät ei-spesifiseen antoon.

Tarkastellaan sekä *in vitro* että *in vivo* -geeniterapiamenettelytapoja.

Tunnetaan useita menetelmiä mahdollisesti terapeuttisten geenien siirtämiseksi määriteltyihin solupopulaatioihin. Katso esim. Mulligan, "The Basic Science Of Gene Therapy" ("Geeniterapian perustietämys"), *Science 260* (1993) s. 926 - 931. Näitä menetelmiä ovat:

1) Suora geenisiirto. Katso esim. Wolff *et al.*, "Direct Gene Transfer Into Mouse Muscle In Vivo" ("Suora geenisiirto hiirilihakseen *in vivo*"), *Science 247* (1990) s. 1465 - 1468;

2) Liposomivälitteinen DNA:n siirto. Katso esim. Caplen *et al.*, "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The

Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis" ("Liposomivälitteinen CFTR-geenisiirto kystistä fibroosia sairastavien potilaiden nenän epiteeliin"), *Nature Med. 3* (1995) s. 39 - 46; Crystal, "The Gene As A Drug" ("Geeni lääkkeenä"), *Nature Med. 1* (1995) s. 15 - 17; Gao ja Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection Of Mammalian Cells" ("Uusi kationinen liposomireagenssi nisäkässolujen tehokkaaseen transfektointiin"), *Biochem. Biophys. Res. Comm. 179* (1991) s. 280 - 285;

3) Retrovirusvälitteinen DNA:n siirtäminen. Katso esim. Kay *et al.*, "In Vivo Gene Therapy Of Hemophilia B: Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs" ("Hemofiilia-B:n geeniterapia *in vivo*: Pysyvä osittainen korjaus tekijä IX -vajaissa koirissa"), *Science 262* (1993) s. 117 - 119; Anderson, "Human Gene Therapy", *Science 256* (1992) s. 808 - 813;

4) DNA-virusvälitteinen DNA:n siirtäminen. Tällaisia DNA-viruksia ovat adenovirukset (edullisesti Ad-2- tai Ad-5-pohjaiset vektorit), herpesvirukset (edullisesti herpes simplex -viruspohjaiset vektorit) ja parvovirukset (edullisesti "puutteelliseen" tai ei-autonomiseen parvovirukseen pohjautuvat vektorit, edullisemmin adenoliitteisiin viruksiin pohjautuvat vektorit, edullisimmin AAV-2-pohjaiset vektorit). Katso esim. Ali *et al.*, "The Use Of DNA Viruses As Vectors For Gene Therapy" ("DNA-virusten käyttä vektoreina geeniterapiaan"), *Gene Therapy 1* (1994) s. 367 - 384; US-patenttijulkaisu nro 4 797 368, joka sisällytetään tähän viitteeksi, ja US-patenttijulkaisu nro 5 139 941, joka sisällytetään tähän viitteeksi.

Nimenomaisen vektorisysteemin valinta kiinnostavan geenin siirtämiseksi riippuu lukuisista erilaisista tekijöistä. Yksi tärkeä tekijä on kohdesolupopulaation luonne. Vaikka retrovirusvektoreita on tutkittu laajalti ja käytetty lukuisissa geeniterapiasovellutuksissa, nämä vektorit

eivät yleensä sovi ei-jakautuvien solujen tartutukseen. Lisäksi retrovirukset ovat mahdollisesti onkogeenisiä.

Adenovirusten etu on, että niiden isäntäskaala on laaja, ne voivat tartuttaa lepotilassa olevia tai terminaalisesti differentioituneita soluja, kuten hermosolut tai maksasolut, ja ne vaikuttavat oleellisesti ei-onkogeenisiltä. Katso esim. Ali *et al.*, *supra*, s. 367. Vaikuttaa siltä, etteivät adenovirukset integroidu isännän genomiin. Koska ne esiintyvät kromosomin ulkopuolisina, insertimutaation vaara vähenee huomattavasti. Ali *et al.*, *supra*, s. 373.

Adenoliitteiset virukset osoittavat samankaltaisia etuja kuin adenoviruspohjaiset vektorit. Kuitenkin AAV:t osoittavat paikkaspesifistä integraatiota ihmisen kromosomiin 19. Ali *et al.*, *supra*, s. 377.

Edullisessa suoritusmuodossa tämän keksinnön mukainen IFN-ß-muteiinia koodittavaa DNA:ta käytetään geeniterapiassa valtimovaurion jälkeisessä suonen sileälihassolulisääntymisessä. Vaurio valtimon seinälle johtaa sileälihassolujen migraatioon valtimon seinän sisäkalvoon, jossa ne lisääntyvät ja syntetisoivat solunulkoisia matriisikomponentteja. Katso esim. Chang *et al.*, "Cytostatic Gene Therapy For Vascular Proliferative Disorders With A Constitutively Active Form Of The Retinoblastoma Gene Product" ("Sytostaattinen geeniterapia suonilisääntymishäiriöihin retinoblastoomageenituotteen konstitutiivisesti aktiivisella muodolla"), *Science 267* (1995) s. 518. Tämä lisääntymisvaste on osoitettu valtimoiden kovettumisen patogeneesissä.

Yksi kliinisesti merkittävä ympäristö valtimovauriolle seuraa sepelvaltimoiden ihonalaista pallouudelleenmuovausta. Valtimon mekaanista laajentamista seuraa monissa tapauksissa solulisääntymisvaste, joka johtaa solujen paikalliseen uudiskasvuun, joka tukkii aukkoa, ja haittaa veren virtaamista. Tämä vaste, joka tunnetaan uudelleenahtautumisena, ei ole ihmisellä reagoinut tavan-

omaisiin hoitoihin mukaan lukien verihiutaleita vastustavat aineet, angiotensiiniä konvertoivan entsyymin antagonistit tai sytotoksiset lääkkeet. Katso esim. Ohno *et al.*, "Gene Therapy For Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation After Arterial Injury" ("Geeniterapia suonen sileän lihaksen solujen lisääntymiseen valtimovaurion jälkeen"), *Science 265* (1994) s. 781.

Tämän suoritusmuodon mukaan geeniterapiaa tämän keksinnön mukaisia IFN-ß-muteiineja koodittavalla DNA:lla annetaan sitä tarvitsevalle potilaalle samanaikaisesti sepelvaltimoiden pallolaajentamisen kanssa tai välittömästi tämän jälkeen. Tässä lähestymistavassa hyödynnetään tämän keksinnön mukaisten IFN-ß-muteiinien lisääntymistä vastustavaa aktiivisuutta epätoivottavan SMC-lisääntymisen estämiseksi. Alan taitaja ymmärtää, että mitä tahansa sopivaa geeniterapiavektoria, joka sisältää IFN-ß-muteiini-DNA:ta, voidaan käyttää tämän suoritusmuodon mukaan. Tekniikat tällaisen vektorin rakentamiseksi ovat tuttuja. Katso esim. Ohno *et al.*, *supra*, s. 784; Chang et *al.*, *supra*, s. 522. Menettely sepelvaltimoiden uudelleenmuovaamiseksi pallolla laajentamalla on tuttu. IFN-ß-muteiini-DNA:ta sisältävä vektori voidaan viedä kohdevaltimoon tunnetuilla tekniikoilla, esim. kuten kuvataan julkaisussa Ohno *et al.*, *supra*, s. 784.

Jotta tämä keksintö tulisi ymmärrettävämmäksi, esitetään seuraavat esimerkit. Nämä esimerkit esitetään vain havainnollistamistarkoituksessa, eikä niiden tule tulkita rajoittavan keksinnön suojapiiriä millään tavalla.

Esimerkkejä

Ihmis-IFN-ß(phe_{101}):n sisältävä ilmentämisvektori

Käytimme plasmidia pBG311 ilmentämisvektorina. Täydellinen kuvaus pBG311:stä esitetään julkaisussa Cate *et al.*, "Isolation Of The Bovine And Human Genes For Mullerian Inhibiting Substance And Expression Of The Human Gene In Animal Cells" ("Nauta- ja ihmisgeenien eristäminen

Mullerian-inhibointiaineelle ja ihmisgeenin ilmentäminen eläinsoluissa"), *Cell 45* (1986) s. 685 - 698. Vektori käyttää SV40:n varhaispromoottoria, silmukointisignaalia ja polyadenylaatiosignaalia, ja se rakennettiin käyttäen runkona pAT153:a.

DNA-fragmentti, joka sisälsi kuviossa 2 esitetyn DNA-sekvenssin (sekvenssi tunnusnumero 2), kloonattiin pBG311:een ja kytkettiin operatiivisesti SV40:n varhaispromoottoriin DNA-sekvenssin välityksellä, joka koodittaa signaalisekvenssin natiiville IFN-ß:lle, tavanomaisin menettelyin. Saatu ilmentämisvektori nimettiin pBeta-phe:ksi. IFN-ß-muteiini-DNA-sekvenssi (sekvenssi tunnusnumero 2) koodittaa IFN-ß-muteiinin, jonka aminohapposekvenssi on identtinen villityypin IFN-ß:aan nähden lukuun ottamatta, että val (V) asemassa 101 numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F). Tämän sekvenssi koodittama muteiini nimetään IFN-ß(phe_{101}):ksi.

Transformoitumiskelpoisia *Escherichia coli* -soluja (SURE™, Stratagene) transformoitiin pBeta-phe-plasmidilla tavanomaisiin menettelyin. pBeta-phe-plasmidin sisältävät pesäkkeet [eli pesäkkeet, jotka sisälsivät IFN-ß(phe_{101}):tä koodittavan DNA-sekvenssin] identifioitiin hybridisoimalla IFN-ß(phe_{101}):lle spesifiseen oligonukleotidikoettimeen käyttäen tavanomaista menettelyä (Grunstein ja Hogness, 1975).

Monistamisvektori

Käytimme plasmidia pAdD26SV(A)-3 IFN-ß(phe_{101})-geenin monistamiseksi lopullisissa transformanteissamme. Tätä plasmidia kuvataan julkaisussa Kaufman ja Sharp, "Construction Of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression" ("Modulaarisen dihydrofolaattireduktaasi-cDNA-geenin rakentaminen: Tehokkaaseen ilmentämiseen käytettyjen signaalien analyysi"), *Mol. Cell. Biol. 2* (1982) s. 1304 - 1319, sekä US-patenttijulkaisussa 4 740 461. Plasmidi ilmentää hiiren

dihydrofolaattireduktaasin (DHFR) adenovirus-2:n (Ad2) pääasiallisen myöhäispromoottorin (MLP) transkriptionaalisessa kontrollissa. 5'-silmukoitumiskohta, joka on peräisin immunoglobuliinin vaihtuvan alueen geenistä, sijaitsee Ad2 MLP- ja DHFR-kooditussekvenssien välissä. SV40-polyadenylaatiokohta sijaitsee DHFR-geenistä alavirtaan. Plasmidi sisältää prokaryoottisen replikaatioalkukohdan (ori) ja tetrasykliiniresistenssigeenin pBR322:sta.

Solulinjan transformointi

CHO-DUKX-B1 DHFR$^-$ -solulinja kotransformoitiin pBeta-phe-plasmidilla ja plasmidilla pAdD26SV(a)-3. Tämä solulinja saatiin villityyppi-CHO-K1-solulinjasta etyylimetaanisulfonaatilla ja UV-säteilytyksellä indusoidulla mutagenisoinnilla. Katso Chasin ja Urlaub, "Isolation Of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient In Dihydrofolate Reductase Activity" ("Kiinalaisen hamsterin solumutanttien eristäminen, joilta puuttuu dihydrofolaattireduktaasiaktiivisuus"), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) s. 4216 - 4220. Dihydrofolaattireduktaasi katalysoi folaatin konversiota tetrahydrofolaatiksi. Solut, joilla ei ole funktionaalista DHFR:ää, tarvitsevat eksogeenisiä ribonukleosidejä ja deoksiribonukleosidejä kasvuunsa. Kasvun inhibitio voidaan indusoida metotreksaatilla, joka on folaattianalogi, joka sitoutuu DHFR:ään ja inhiboi sen. Metotreksaatin titraaminen voi johtaa metotreksaattiresistenssiin DHFR-geenin monistuksen välityksellä (Kaufman ja Sharp, *supra*, 1982). Lähellä DHFR:ää sijaitsevien geenien monistumista ja lisääntynyttä ilmentymistä esiintyy usein DHFR monistettaessa. Tämän vuoksi solut, jotka ovat resistenttejä korkeille metotreksaattitasoille, osoittavat usein liikeisten geenien kasvanutta spesifistä tuotteliaisuutta.

pBeta-phe-plasmidia (restriktio Xmn1:llä) ja plasmidia pAdD26SV(a)-3 (restriktio Stu1:llä) sekoitettiin vastaavasti suhteessa 10:1. DNA transformoitiin CHO-DUKX-B1 DHFR$^-$ -soluihin elektroporaatiolla. Solut maljattiin ei-

selektiiviseen α+-kasvualustaan [α-MEM-kasvualusta, jossa oli ribonukleosidejä ja deoksiribonukleosidejä, 10 % nautasikiöseerumia (FBS), pitoisuus 4 mM glutamiini], ja annettiin kasvaa 2 päivän ajan. Sitten kasvualusta vaihdettiin α⁻-kasvualustaksi [α-MEM-kasvualusta ilman ribonukleosidejä ja deoksiribonukleosidejä, 10 % nautasikiöseerumia (FBS), pitoisuus 4 mM glutamiini], jota oli täydennetty pitoisuudella 50 nM metotreksaatti (MTX). Solut poistettiin trypsinoimalla ja maljattiin tiheydeksi noin 8 x 10^5 solua/10 cm:n kudosviljelylevy. 14 päivän kuluttua kloonit noukittiin ja niitä kasvatettiin 96-kuoppaisilla kudosviljelylevyillä. Yksi klooni laajennettiin 12-kuoppaiselle kudosviljelylevylle, mistä 7 päivän kuluttua se siirrettiin 6 kuopan kudosviljelylevylle, jossa kasvualusta sisälsi pitoisuuden 250 nM MTX. Tämä klooni laajennettiin T75-kolviin (kasvutus α⁻-kasvualustassa + 250 nM MTX), minkä jälkeen suoritettiin monistus pitoisuuden 750 nM MTX läsnä ollessa. Alaklooni noukittiin 96-kuoppaiselle kudosviljelylevylle, se lisäännytettiin 48-kuopaiselle kudosviljelylevylle, sitten 6-kuoppaiselle kudosviljelylevylle ja sitten T75-kudosviljelykolviin.

IFN-ß(phe_{101}):n puhdistus

IFN-ß(phe_{101}):tä, joka on tuotettu viljelemällä edeltävää alakloonia (tai siihen nähden samankaltaisia klooneja) ja sitten erittynyt kasvualustaan, voidaan puhdistaa immuuniaffiniteettikromatografialla oleellisesti kuten kuvaavat Okamura *et al.*, "Human Fibroblastoid Interferon: Immunosorbent Column Chromatography And N-Terminal Amino Acid Sequence" ("Ihmisen sidekudosmuodostusinterferoni: Immuunisorbenttikolonnikromatografia ja N-pään aminohapposekvenssi"), *Biochem. 19* (1980) s. 3831 - 3835.

CNBr-Sepharose 4B -hartsi (2 g, 7 ml) valmistetaan suspendoimalla 1 mM HCl:ään. Geeliä pestään 1 mM HCl:llä 15 minuutin ajan lasisintterillä. Monoklonaalisia anti-IFN-ß-vasta-aineita (kuten B02, Yamasa, Japani) kytketään CNBr-

Sepharose 4B -hartsiin inkuboimalla kytkemispuskurissa (100 mM $NaHCO_3$, pH 8,3, 500 mM NaCl) 2 tunnin ajan huoneenlämpötilassa keinulevyllä. Tyypillisesti kytketään 1 - 2 mg IFN-ß-MAb:tä/ml hartsia, mutta tämä määrä voi vaihdella. Reagoimatta jäänyttä CNBr:ää salvataan 100 mM Tris-HCl:ssä, pH 8, 500 mM NaCl, yön yli 4 °C:ssa. Vaihtoehtoisesti reagoimatta jäänyt CNBr salvataan 100 mM etanoliamiiniliuoksessa oleellisesti samoissa olosuhteissa.

Kytketylle hartsille suoritetaan 3 pesusyliä vaihtelevassa pH:ssa. Kukin sykli käsittää pesun asetaattipuskurissa (100 mM, pH 4), joka sisältää pitoisuuden 500 mM NaCl, ja sitten pesun Tris-puskurissa (100 mM, pH 8), joka sisältää pitoisuuden 500 mM NaCl.

Kytketystä hartsista valmistetaan 1 x 3 cm:n kolonni (petitilavuus 2,3 ml). Kolonnia tasapainoitetaan PBS:llä (yli 5 kolonnitilavuutta). IFN-ß(phe_{101}):tä sisältävät näytteet laimennetaan suhteessa 1:3 tasapainoituspuskuriin, pH 6,8, ja panostetaan. Panostusta ajetaan PBS:llä, kolonnia pestään 20 mM K_2HPO_4-liuoksella, 1 M NaCl, pH 6,8, ja eluoidaan 200 mM Na-sitraattiliuoksella, pH 2. Eluaatin pH säädettiin 6:ksi laimentamalla näytettä 500 mM Mes-liuoksella, pH 6.

Karakterisointi peptidikartoituksella

IFN-ß(phe_{101})-muteiinia, joka oli tuotettu ja jota oli puhdistettu erilaisella ja vähemmän edullisella tavalla kuin kuvattiin edellä, karakterisoitiin peptidikartoituksella. 30 µg:n näyte-erä IFN-ß(phe_{101}):tä tai villityypin IFN-ß-näyte kylmäkuivattiin, lyofilisaatti suspendoitiin 200 µl:aan endoproteinaasi-Lys-C-pilkkomispuskuria (100 mM Tris, pH 9, 0,5 mM EDTA) ja suspensiota inkuboitiin 12 tunnin ajan 22 °C:ssa 1,5 µg:lla endoproteinaasi-Lys-C:tä ja suoritettiinkartoitusanalyysi C_8-käänteisfaasi-HPLC-kolonnilla (0,45 x 25 cm). Kolonnia kehitettiin ajamalla 30 minuutin ajan gradientilla 0 → 70 % asetonitriili/0,1-%:inen TFA virtauksella 1,4 ml/min. Kolonnin ulosvirtausta tark-

kailtiin 214 nm:ssä. Kuvion 4 paneelissa A esitetään osa IFN-ß(phe_{101}):n peptidikartasta nuolenpään osoittaessa peptidiä TFLEEK (sekvenssi tunnusnumero 3). Tätä piikkiä ei esiintynyt villityyppi-IFN-ß:n peptidikartassa. Kuvion 4 paneelissa B esitetään vastaava alue villityyppi-IFN-ß:n peptidikartasta nuolenpään osoittaessa peptidiä TVLEEK (sekvenssi tunnusnumero 4). Sekvenssien TFLEEK ja TVLEEK identiteetit vahvistettiin proteiinisekvenssianalyysillä. Arvioimme, että ß-Phe_{101}:n ja villityypin ß-IFN:n puhtausaste oli yli 98 %. Proteiinipitoisuudet arvioitiin absorbanssista 280 nm:ssä käyttäen ekstinktiokerrointa 1,5 1 mg:n liuokselle. Proteiinien stabiloimiseksi biologisiin tutkimuksiin ne laimennettiin pitoisuuteen 4 µg/ml PBS:ään, joka sisälsi 5 % FBS:ää ja pitoisuuden 5 mM Hepes, pH 7,5.

IFN-ß(phe_{101}):n virusvastainen aktiivisuus CPE-määrityksessä

Peptidikartoituksella karakterisoidun IFN-ß(phe_{101})-valmisteen virusvastaista aktiivisuutta analysoitiin sytopaattisen vaikutuksen (CPE) määrityksellä. Villityypin yhdistelmä-DNA-IFN-ß-standardi valmistettiin Dulbeccon modifioituun Eagle-kasvualustaan (DMEM), jossa oli pitoisuudet 10 % FBS, 4 mM glutamiini, pitoisuuteen 10 000 yksikköä/ml, ja varastoitiin erinä -70 °C:seen. Päivänä 1 standardia, verrokkia ja IFN-$ß_{Phe}$-näytteitä laimennettiin DMEM-kasvualustaan, 10 % FBS:ää, 4 mM glutamiini, kolmessa laimennossarjassa: i) aloitus 64 yksiköstä/ml, sitten 2-kertaiset laimennokset; ii) aloitus 12 yksiköstä/ml, sitten 1,5-kertaiset laimennokset; ja iii) aloitus 6 yksiköstä/ml, sitten 1,2-kertaiset laimennokset. 50 µl laimennoksia lisättiin sitten riveissä 96-kuoppaisten mikrotiitterilevyjen kuoppiin. Kuhunkin kuoppaan lisättiin A549-soluja pitoisuuteen 10^5 solua/ml, 50 µl/kuoppa, DMEM-kasvualustassa, 10 % FBS:ää, 4 mM glutamiini, ja soluja inkuboitiin 37 °C:ssa ilmakehässä, joka sisälsi 5 % CO_2:ta, 15 - 20 tunnin ajan.

Levyn sisältö ravistettiin valkaisuämpäriin, ja kuhunkin kuoppaan lisättiin 100 µl enkefalomyokardiittivirusta (EMC-virus) sopivana laimennoksena kasvualustassa. Virusta ja soluja inkuboitiin 37 °C:ssa ilmakehässä, joka sisälsi 5 % CO_2:ta, 30 tunnin ajan. Sitten levyn sisältö ravistettiin valkaisuämpäriin ja levyille lisättiin 0,75-%:ista kristalliviolettiväriliuosta. 5 - 10 minuutin kuluttua levyt pestiin tislatulla vedellä ja niiden annettiin kuivaa ennen visuaalista lukemista.

Näytteet ja standardit testattiin kaksinkertaisin määrityksin kullakin määrityslevyllä, jolloin saatiin kaksi tulostietopistettä/laimennossarja/määrityspäivä.

IFN-ß(phe_{101}):tä testattiin 14 määrityksessä kaksinkertaisin määrityksin. Standardina käytettiin villityypin yhdistelmä-DNA-IFN-ß:aa. Näiden kokeiden perusteella IFN-ß(phe_{101}):n spesifinen aktiivisuus oli 4,8 x 10^8 U/mg 95 %:n luotettavuusvälillä 3,5 - 6,7 x 10^8. Villityyppi-IFN-ß:n spesifinen aktiivisuus oli noin 2,0 x 10^8 yksikköä/mg luotettavuusvälin ollessa 1,6 - 2,5 x 10^8. Tulostiedot kuviossa 5 esittävät samankaltaisen tuloksen.

Yhdistelmä-DNA-IFN-ß(phe_{101}):n spesifinen aktiivisuus on keskimäärin noin 2,5 kertaa korkeampi kuin villityyppi-IFN-ß:n mitattuna virusvastaisella määrityksellämme.

IFN-ß(phe_{101}):n reseptorisitoutumisanalyysi

Edellä CPE-määrityksessä käytetyn IFN-ß(phe_{101}):n kykyä sitoutua interferonireseptoreita ilmentäviin soluihin analysoitiin myös. Näissä tutkimuksissa tarkastelimme joko villityyppi-^{125}I-IFN-ß:n tai ^{125}I-IFN-ß(phe_{101}):n sitoutumista Daudi-soluihin tai A549-soluihin (kuvio 3). Kantajavapaa IFN-ß jodattiin oleellisesti kloramiini-T-menetelmän mukaan. Reagoimatta jäänyt jodi poistettiin kokoekskluusiokromatografisesti Superdex 75 -kolonnissa, jota oli tasapainoitettu PBS:ssä, joka sisälsi 1 mg/m nautaseerumialbumiinia. Jodatun IFN-ß:n pitoisuus määritettiin CPE-määrityksellä olettaen spesifiseksi aktiivisuudeksi 2 x 10^8 yk-

sikköä/mg. Normaalisti 5 ng (1 µl, 300 000 cpm) jodattua IFN-ß:aa (joko yksinään tai 50-kertaisen ylimäärän ei-jodattua interferonia läsnä ollessa) lisättiin 1,7 ml:n eppendorf-putkiin alle 10 µl:n kokonaistilavuutena. Leimatun ligandin annettiin sitoutua yksinään (-) tai sitä kilpailutettiin ei-leimatun IFN-ß(phe_{101}):n, α2-IFN:n (α2), γ-IFN:n (γ) tai villityyppi-yhdistelmä-DNA-IFN-ß:n (WT) kanssa.

Käytettiin sekä Daudi-soluja että A549-soluja (American Type Culture Collection). Solut suspendoitiin DMEM-kasvualustaan, 5 % FBS:ää, pitoisuuteen 2 x 10^6 solua/ml. IFN-ß-näytteisiin lisättiin 0,5 ml solususpensiota. Putkia sekoitettiin kääntelemällä niitä ylösalaisin ja inkuboitiin ympäristön lämpötilassa 45 minuutin ajan. Sitten soluja pelletoitiin 1 000 x g:ssä 2 minuutin ajan ja ne pestiin 2 kertaan 0,5 ml:lla DMEM:ä, joka sisälsi 10 % FBS:ää. Kutakin pesua seurasi 2 minuuttia kestänyt sentrifugointivaihe 1 000 x g:ssä. Solut uudelleensuspendoitiin 0,1 ml:aan, ne siirrettiin tuikelaskentaputkiin ja sitoutuminen kvantitoitiin Beckmanin γ-407-laskijalla.

Tulokset viittaavat siihen, että IFN-ß(phe_{101}):n sitoutuminen on hyvin samankaltainen kuin villityyppi-IFN-ß:n kumpaankin solutyyppiin. Verrattavia määriä villityypin ^{125}I-IFN-ß:aa ja ^{125}I-IFN-ß(phe_{101}):tä sitoutui ja kilpaili samalla tavalla ei-jodatun α-IFN:n, villityyppi-IFN-ß:n ja IFN-ß(phe_{101}):n kanssa. Yhdistelmä-DNA-ihmis-γ-IFN:n lisääminen ei vaikuttanut sitoutumiseen.

Villityyppi-IFN-ß:n vastaiset vasta-aineet neutraloivat oleellisesti IFN-ß(phe_{101}):n virusvastaisen aktiivisuuden

Lukuisia yhdistelmä-DNA-muteiini-IFN-ß(phe_{101})-valmisteita, jotka oli tuotettu CHO-soluissa edellä kuvatun mukaisesti, puhdistettiin noin 90 %:n puhtauteen kolonnikromatografiaa käyttäen. Nämä näytteet laimennettiin pitoisuuteen 25 pg/ml. Villityypin yhdistelmä-DNA-IFN-ß, jota

kutsutaan tässä IFN-ß(val_{101}):ksi, tuotettiin ja sitä puhdistettiin oleellisesti samalla tavalla.

Tavanomaisia antiviraalisia ja vasta-aineneutralointimäärityksiä käytettiin sen osoittamiseksi, että villityyppi-IFN-ß(val_{101}):n vastaiset vasta-aineet ainakin osittain neutraloivat IFN-ß(phe_{101}):n. Nimenomaisesti käytetyt antiviraalinen määritys ja neutralointimääritys, joita kuvataan yksityiskohtaisesti alla, ovat oleellisesti samat, kuin antiviraaliset ja vasta-aineneutralointimääritykset, joita kuvataan EP-patenttijulkaisussa B1 41 313. Katso s. 26, rivit 1 - 21; s. 29, rivi 48; s. 32, rivi 3.

A. Soluja sisältävien levyjen valmistus

A549-soluja (ATCC CCL185) siirrostettiin 96-kuoppaisille levyille pitoisuuteen 3 x 10^4 solua/100 µl kasvualustaa/kuoppa. Käytetty kasvualusta oli Dulbeccon modifioitu Eagle-kasvualusta (DMEM), jossa oli 10 % FBS:ää ja pitoisuus 4 mM glutamiini. Sitten soluja sisältäviä levyjä inkuboitiin 37 °C:ssa ilmakehässä, joka sisälsi 5 % CO_2:ta, noin 24 tunnin ajan.

B. Master-levyjen valmistaminen

Sitten luotiin master-levyjä, jotka sisälsivät joko näytettä tai standardia käyttäen sarjalaimennettuja kuoppia (2-kertaisin rinnakkaismäärityksin). Näytekuopat sisälsivät joko puhdistettua yhdistelmä-DNA-muteiinia IFN-ß(phe_{101}) tai villityypin yhdistelmä-DNA-IFN-ß-(val_{101}):tä kanin polyklonaalisen anti-IFN-ß-seerumin läsnä ollessa tai puuttuessa. Verrokkikuopat sisälsivät joko pelkästään puskuria tai villityypin yhdistelmä-DNA-IFN-ß:aa (standardina) anti-LFA3-vasta-aineen läsnä ollessa tai puuttuessa (tuloksia ei ole esitetty).

Sarjalaimennokset suoritettiin seuraavasti. 200 µl verrokkia tai villityyppi- tai muteiini-IFN-ß-näytettä (pitoisuutena noin 25 pg/ml) lisättiin kunkin levyn kuhunkin kuoppaan rivillä A. Näytteen loppupitoisuus rivillä A oli

8,5 pg/ml. Laimennoksia 1:1,5 suoritettiin sitten poikki kunkin levyn.

C. Villityyppi-IFN-ß-vastaiset vasta-aineet

Vasta-aineita villityypin IFN-ß(val_{101}):lle tuotettiin kaneissa, jotka oli immunoitu yhdistelmä-DNA-villityyppi-IFN-ß(val_{101}):llä. Kanin IFN-ß-vastaista polyklonaalista seerumia kerättiin immunoiduista kaneista sopivin välein, yhdistettiin pooliksi ja varastoitiin käyttöön asti (kanin IFN-ß-seerumipooli 6/25/93; 5 ml/ampulli, 0,02 % atsidia; ref. 0.01742.062).

D. Näyte/Ab-inkubointi

Kanin IFN-ß-vastaista polyklonaalista seerumia lisättiin tarkoituksenmukaisiin kuoppiin master-levyillä. Vasta-aineen lopullinen laimennos oli 1:1 000. Vasta-aine/IFN-ß-seosta inkuboitiin huoneenlämpötilassa 45 minuutin ajan.

E. Solujen inkubointi verrokilla, näytteellä tai näyte/Ab:llä

Sitten kasvualusta imettiin pois valmistetuilta soluja sisältäviltä levyiltä ja se korvattiin erillä (100 µl/kuoppa) verrokkia, IFN-ß-näytettä tai IFN-ß/Ab-näytettä kuten tarkoituksenmukaista valmistetuilta master-levyiltä. Soluja sisältäviä levyjä inkuboitiin 37 °C:ssa 5 % CO_2:ta sisältävässä ilmakehässä 16 - 24 tunnin ajan.

F. Virushaaste

Seuraava vaihe oli virushaaste. Tällöin soluja sisältävien levyjen sisällöt imettiin pois ja kuhunkin kuoppaan lisättiin 100 µl enkefalomyokardiittiviruksen (EMCV) liuosta sopivana laimennoksena. Virusta ja soluja inkuboitiin 37 °C:ssa 5 % CO_2:ta sisältävässä ilmakehässä 41 - 45 tunnin ajan.

Soluja sisältävät levyt kehitettiin käyttäen kolorimetristä XTT/PMS-menetelmää. Fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen valmistettiin XTT:n {3,3-[1-(fenyyliamino)-karbonyyli]-3,4-tetratsolium]-bis-(4-metoksi-6-nitro)-

bentseenisulfonihappo, Sigma) 1 mg/ml -liuos. Veteen valmistettiin PMS:n (fenatsiinimetosulfaatti) 1 mg/ml -liuos. Valmistettiin PMS/XTT-liuos suhteessa 1:50. Kehitysliuos valmistettiin laimentamalla PMS/XTT:tä 1:3 fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen. Elävät solut pelkistävät tetratsoliumyhdisteen XTT, jolloin muodostuu väriltään oranssia formatsonia. Värin muodostuminen korreloi suoraan elävien solujen lukumäärään.

Soluja sisältävät levyt imettiin tyhjiksi ja pestiin 150 µl:lla/kuoppa fosfaattipuskuroitua suolaliuosta. Sitten kuhunkin kuoppaan lisättiin 150 µl kehitysliuosta. Levyjä inkuboitiin 37 °C:ssa 5 % CO_2:ta sisältävässä ilmakehässä 30 - 60 minuutin ajan.

Mitattiin absorbanssi 450 nm:ssä Molecular Devices $Thermo_{max}$ -mikrolevylukijalla käyttäen Softmax-ohjelmaa. Tulokset esitetään graafisesti kuviossa 5. Absorbanssi esitetään IFN-ß-pitoisuuden funktiona.

Kuviosta 5 ilmenee, että kanin IFN-ß-vastaisen polyklonaalisen seerumin puuttuessa muteiini-IFN-ß(phe_{101})-näytteet (umpinainen neliö ■) ja villityyppi-IFN-ß(val_{101})-näytteet (umpinainen vinoneliö ♦) suojasivat A549-soluja EMCV:ltä. Tämän osoittaa kohoaminen absorbanssissa (mikä on osoitus suuremmasta määrästä eläviä soluja) muteiini-IFN-ß- tai villityyppi-IFN-ß-pitoisuuden kohotessa.

Kuviosta 5 ilmenee myös, että kanin IFN-ß-vastaisen polyklonaalisen seerumin läsnä ollessa muteiini-IFN-ß(phe_{101})-näytteet (avoin neliö □) ja villityyppi-IFN-ß-(val_{101})-näytteet (avoin vinoneliö ◊) eivät suojanneet A549-soluja EMCV:ltä. Tämän osoittaa perustason absorbanssiarvo mille tahansa muteiini-IFN-ß- tai villityyppi-IFN-ß-pitoisuudelle, mikä osoittaa, että lähes kaikki A549-solut olivat kuolleet.

Yhteenvetona kuvio 5 osoittaa, että villityyppi-IFN-ß-vastaiset vasta-aineet (eli kanin anti-IFN-ß-vasta-

aineet) neutraloivat muteiinin IFN-ß(phe_{101}) virusvastaisen aktiivisuuden.

Uudelleenahtautumisen hoito IFN-ß-muteiinigeeniterapialla

Uudelleenahtautumisen geeniterapian alustava testaus suoritetaan sikamallissa käyttäen yhdistelmä-DNA-villityyppi-sika-IFN-ß:aa seuraavan protokollan mukaan.

Solulisääntyminen mitataan immuunihistokemiallisesti. Kaikki eläimet saavat laskimonsisäisenä infuusiona BrdC:tä (Sigma, St. Louis, MO), kokonaisannos 25 mg/kg, tuntia ennen kuolemaa. Immuunihistokemia BrdC-vastaisella monoklonaalisella vasta-aineella (laimennos 1:1 000, Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL) suoritetaan tumien leimaamiseksi lisääntyvissä soluissa kuten kuvataan julkaisussa Goncharoff *et al., J. Immunol. Methods 93* (1988) s. 97. Suonen sileälihassolujen identifiointi suoritetaan immuunihistokemiallisesti sileälihaksen α-aktiinin vasta-aineella (laimennos 1:500, Boehringer Mannheim, Saksa) kuten kuvataan julkaisussa Islk *et al., Am. J. Pathol. 141* (1992) s. 1139.

Yorkshiren kotieläinsiat (12 - 15 kg) nukutetaan zolatsepamiini-tiletamiinilla (6,0 mg/kg) yhdistettynä (2,2 mg/kg lihaksensisäisesti) Rompun-valmisteeseen, jossa on 1 % typpioksiduulia. Ohutsuoli-reisiluuvaltimot paljastetaan steriilein kirurgisin menettelyin, ja kaksoispallokatetri insertoidaan ohutsuoli-reisiluuvaltimoon kuten kuvataan julkaisussa Nabel *et al., Science 249* (1990) s. 1285. Proksimaalinen pallo täytetään 300 mmHg:n paineeseen mitattuna on-line-painetransduktorilla 5 minuutiksi. Pallo tyhjennetään ja katetria työnnetään eteenpäin siten, että keskitila proksimaalisen ja distaalisen pallon välissä sijaitsee nyt aiemman pallovaurion alueella. Molemmat pallot täytetään, ja segmenttiä kastellaan hepariinilla käsitellyllä suolaliuoksella. Adenovirusymppiä annetaan 20 minuu-

tin ajan katetrin keskitilaan. Katetri poistetaan ja virran suuntainen verivirta palautuu.

Kaikkien sikojen vaurioitutet valtimot tartutetaan 10^{10}:llä plakin muodostavalla yksiköllä (pmy)/ml ADV-Δ-E1-vektoria, joka sisältää sian IFN-ß:aa koodittavan insertin, tai ADV-delta-E1-vektoria, josta puuttuu insertti. Kussakin eläimessä molemmat ohutsuoli-reisiluuvaltimot transfektoidaan samalla vektorilla tiitterinä 1 x 10^{10} pmy/ml, ja kussakin eläimessä käytetään 0,7 ml (lopullinen annos 7 x 10^9 pmy).

Suonisegmentit näissä sioissa leikataan 21 tai 42 päivän kuluttua. Kukin valtimo prosessoidaan samalla tavalla. Kahden kaksoispallon välinen syöttöalue leikataan viideksi samankokoiseksi poikkileikkaukseksi. Palat 1 ja 4 kiinnitetään metyyli-Carnoy-valmisteessa ja palat 3 ja 5 kiinnitetään formaliinissa, ja kaikki palat varastoidaan parafiiniin ja värjätään hematoksyliini-eosiinilla. Lisää vasta-ainetutkimuksia suoritetaan metyyli-Carnoy-valmisteella ja formaliinilla kiinnitetyillä valtimoilla. Kudos palasta 2 salamajäädytetään nestetypessä ja varastoidaan 80 °C:seen DNA:n eristämistä varten. Suonen sisäkalvon ja valtimon seinämän keskikerroksen alueen mittaukset määritetään neljälle palalle kustakin valtimosta sokkotapaan kahden riippumattoman lukijan toimesta, ja mittauksista kullekin valtimolle otetaan keskiarvo. Valtimonäytteitä käsittäviä objektilaseja tutkitaan mikroskooppipohjaisella videokuvannusanalyysisysteemillä (Image-1 System, Universal Imaging, Weschester, PA) kuten kuvataan julkaisussa Nabel *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90* (1993) s. 10759.

Vaihtoehtona edellä kuvatulle adenoviruspohjaiselle Ad-Δ-E1-vektorille voidaan käyttää myös suoraa geenisiirtoa. Yksi sopiva rakenne on plasmidi, joka on saatu RSV-rungosta, jolloin RSV-LTR-promoottori ohjaa IFN-ß:n ilmentymistä ja SV-40-poly-A'-signaali sijaitsee 3' IFN-ß-DNA-

sekvenssiin nähden. Katso esim. Gorman *et al.*, *Science 221* (1983) s. 551 - 553.

Edeltävää protokollaa modifioidaan sitten siten, että vektori sisältää DNA-insertin, joka koodittaa tämän keksinnön mukaisia ihmis-IFN-ß-muteiineja, geeniterapiaan ihmisissä.

Sekvenssit

Seuraava on yhteenveto sekvenssiluettelossa esitetyistä sekvensseistä:

sekvenssi tunnusnumero 1: IFN-ß(phe_{101}):n aminohapposekvenssi;

sekvenssi tunnusnumero 2: DNA-sekvenssi, joka koodittaa IFN-ß(phe_{101}):tä, mukaan lukien DNA-sekvenssi, joka koodittaa natiivin IFN-ß:n signaalisekvenssiä;

sekvenssi tunnusnumero 3: peptidin TFLEEK aminohapposekvenssi.

sekvenssi tunnusnumero 4: peptidin TVLEEK aminohapposekvenssi.

Talletukset

E. coli K-12, joka sisältää plasmidin pBeta-phe [joka sisältää IFN-ß(phe_{101}):tä koodittavan DNA-sekvenssin ja natiivin IFN-ß:n signaalisekvenssin], on talletettu. Talletus suoritettiin Budapestin sopimuksen mukaan ja talletuspaikka oli the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, 11. maaliskuuta 1994. Talletus sai hakunumeron 69584.

Edeltävä kuvaus on esitetty vain havainnollistamis- ja kuvausmielessä. Tämän kuvauksen ei tarkoiteta rajoittavan keksintöä julkistettuun tarkkaan muotoon. Tarkoitus on, että keksinnön suojapiirin määrittelevät oheiset patenttivaatimukset.

Sekvenssilista

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Biogen, Inc.
Goelz, Susan E
Cate, Richard L
Pepinsky, Blake R
Chow, Pingchang E

(ii) TITLE OF INVENTION: Novel Muteins Of IFN-Beta

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 5

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: James F. Haley, Jr.
(B) STREET: Fish & Neave, 1251 Avenue of the Americas
(C) CITY: New York
(D) STATE: New York
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 10020-1104

(v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
(A) NAME: Haley Jr., James F
(B) REGISTRATION NUMBER: 27,794
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: B179

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
(A) TELEPHONE: (212) 596-9000
(B) TELEFAX: (212) 596-9090

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 166 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

```
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 Phe 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
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 561 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 1..63

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 64..561

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1..561

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

```
ATG ACC AAC AAG TGT CTC CTC CAA ATT GCT CTC CTG TTG TGC TTC TCC      48
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
-21 -20                 -15                 -10

ACT ACA GCT CTT TCC ATG AGC TAC AAC TTG CTT GGA TTC CTA CAA AGA      96
Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 -5                  1                   5                  10

AGC AGC AAT TTT CAG TGT CAG AAG CTC CTG TGG CAA TTG AAT GGG AGG     144
Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
             15                  20                  25

CTT GAA TAC TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC CCT GAG GAG     192
Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
         30                  35                  40

ATT AAG CAG CTG CAG CAG TTC CAG AAG GAG GAC GCC GCA TTG ACC ATC     240
Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
     45                  50                  55

TAT GAG ATG CTC CAG AAC ATC TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT     288
Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 60                  65                  70                  75

AGC ACT GGC TGG AAT GAG ACT ATT GTT GAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC     336
Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
                 80                  85                  90

TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA TTC CTG GAA GAA AAA CTG GAG     384
Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Phe Leu Glu Glu Lys Leu Glu
             95                  100                 105

AAA GAA GAT TTC ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA     432
Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
        110                 115                 120
```

```
AGA TAT TAT GGG AGG ATT CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AGT      480
Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
    125                 130                 135

CAC TGT GCC TGG ACC ATA GTC AGA GTG GAA ATC CTA AGG AAC TTT TAC      528
His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
140                 145                 150                 155

TTC ATT AAC AGA CTT ACA GGT TAC CTC CGA AAC                          561
Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
                160                 165
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 187 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

```
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
-21 -20                 -15                 -10

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 -5                  1                   5                  10

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
             15                  20                  25

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
         30                  35                  40

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
     45                  50                  55

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 60                  65                  70                  75

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
                 80                  85                  90

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Phe Leu Glu Glu Lys Leu Glu
             95                  100                 105

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
        110                 115                 120
```

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
125 130 135

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
140 145 150 155

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
160 165

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 6 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Thr Phe Leu Glu Glu Lys
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 6 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

Thr Val Leu Glu Glu Lys
1 5

Patenttivaatimukset

1. IFN-ß-muteiini, jossa val (V) asemassa 101 villityyppi-IFN-ß:ssa numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F), jolloin mainittu muteiini osoittaa virusvastaista aktiivisuutta, jonka neutraloivat villityyppi-IFN-ß:n vastaiset vasta-aineet.

2. IFN-ß-muteiini, jonka aminohapposekvenssi on identtinen villityyppi-IFN-ß:aan nähden lukuun ottamatta, että val (V) asemassa 101 villityyppi-IFN-ß:ssa numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F).

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen IFN-ß-muteiini, jonka kaava on:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (sekvenssi tunnusnumero 1)

4. DNA, joka koodittaa IFN-ß-muteiinin, jossa val (V) asemassa 101 villityyppi-IFN-ß:ssa numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F), jolloin mainittu muteiini osoittaa virusvastaista aktiivisuutta, jonka neutraloivat villityyppi-IFN-ß:n vastaiset vasta-aineet.

5. DNA-sekvenssi, joka koodittaa IFN-ß-muteiinin, jonka aminohapposekvenssi on identtinen villityyppi-IFN-ß:aan nähden lukuun ottamatta, että val (V) asemassa 101 villi-

tyyppi-IFN-ß:ssa numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F).

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen DNA, joka koodittaa IFN-ß-muteiinia, jonka kaava on:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (sekvenssi tunnusnumero 1)

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen DNA, jossa aminohappoa asemassa 101 koodittava kodoni on TTC.

8. DNA, jonka kaava on sekvenssin tunnusnumero 2 mukainen.

9. Yhdistelmä-DNA-molekyyli, jolle on karakteristinen jonkin patenttivaatimuksen 4 - 8 mukainen DNA, joka DNA on operatiivisesti kytketty ilmentämisen kontrollisekvenssiin yhdistelmä-DNA-molekyylissä.

10. Isäntäsolu, joka käsittää patenttivaatimuksen 9 mukaisen yhdistelmä-DNA-molekyylin.

11. Menetelmä IFN-ß-muteiinin tuottamiseksi, jossa val (V) asemassa 101 villityyppi-IFN-ß:ssa numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F), jolloin mainittu muteiini osoittaa virusvastaista aktiivisuutta, jonka neutraloivat villityyppi-IFN-ß:n vastaiset vasta-aineet, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa vil-

jellään patenttivaatimuksen 10 mukaista isäntäsolua ja kerätään talteen IFN-ß-muteiini.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, jossa IFN-ß-muteiinia koodittaa DNA-sekvenssi, joka koostuu sekvenssin tunnusnumero 2 mukaisesta sekvenssistä, ja isäntäsolu on eläinsolu viljelmässä.

13. Farmaseuttinen koostumus, joka käsittää jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukaista IFN-ß-muteiinia, ja farmaseuttisesti hyväksyttävää kantajaa.

14. IFN-ß-muteiinin käyttö farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi virustartuntojen hoitamiseksi, jolle IFN-ß-muteiinille on karakteristista, että val (V) asemassa 101 villityyppi-IFN-ß:ssa numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F), jolloin mainittu muteiini osoittaa virusvastaista aktiivisuutta, jonka neutraloivat villityyppi-IFN-ß:n vastaiset vasta-aineet.

15. IFN-ß-muteiinin käyttö farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi virustartuntojen hoitamiseksi, jonka IFN-ß-muteiinin aminohapposekvenssi on identtinen villityyppi-IFN-ß:aan nähden lukuun ottamatta, että val (V) asemassa 101 villityyppi-IFN-ß:ssa numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F).

16. Jonkin patenttivaatimuksen 14 - 15 mukainen käyttö, jossa muteiinin kaava on:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (sekvenssi tunnusnumero 1)

17. IFN-ß-muteiinia koodaavan DNA:n käyttö farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi geeniterapiaan virustartuntojen hoitamiseksi potilaassa, joka DNA koodittaa IFN-ß-muteiinin, jossa val (V) asemassa 101 villityyppi-IFN-ß:ssa numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F), jolloin mainittu muteiini osoittaa virusvastaista aktiivisuutta, jonka neutraloivat villityyppi-IFN-ß:n vastaiset vasta-aineet.

18. IFN-ß-muteiinia koodaavan DNA:n käyttö farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi geeniterapiaan virustartuntojen hoitamiseksi potilaassa, joka mainittu DNA koodittaa IFN-ß-muteiinia, jonka aminohapposekvenssi on identtinen villityyppi-IFN-ß:aan nähden lukuun ottamatta, että val (V) asemassa 101 villityyppi-IFN-ß:ssa numeroinnin ollessa villityyppi-IFN-ß:n mukainen on korvattu phe:llä (F).

19. Jonkin patenttivaatimuksen 17 - 18 mukainen käyttö, jossa DNA koodittaa IFN-ß-muteiinia, jonka kaava on:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (sekvenssi tunnusnumero 1).

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen käyttö, jossa aminohappoa asemassa 101 koodittava kodoni on TTC.

21. DNA:n, jonka sekvenssi vastaa nukleotidejä 1 - 561 sekvenssissä tunnusnro 2 tai nukleotidejä 64 - 561 sekvenssissä tunnusnumero 2, käyttö geeniterapiaan virustartuntojen hoitamiseksi potilaassa.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen käyttö, jolloin DNA:lla on sekvenssi, joka vastaa nukleotidejä 1 - 561 sekvenssissä tunnusnumero 2.

Patentkrav

1. IFN-ß-mutein, där val (V) i position 101 i vildtyps-IFN-ß, då numreringen är enligt vildtyps-IFN-ß, är ersatt med phe (F), varvid nämnda mutein uttrycker en antivirusaktivitet, som neutraliseras av antikroppar mot vildtyps-IFN-ß.

2. IFN-ß-mutein, vars aminosyrasekvens är identisk i förhållande till vildtyps-IFN-ß bortsett från att val (V) i position 101 i vildtyps-IFN-ß, då numreringen är vildtyps-IFN-ß, är ersatt med phe (F).

3. IFN-ß-mutein enligt patentkrav 2 med formeln:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (SEQ id nr 1).

4. DNA, som kodar en IFN-β-mutein, där val (V) i position 101 i vildtyps-IFN-β, då numreringen är enligt vildtyps-IFN-ß, är ersatt med phe (F), varvid nämnda mutein uttrycker en antivirusaktivitet, som neutraliseras av antikroppar mot vildtyps-IFN-ß.

5. DNA-sekvens, som kodar en IFN-ß-mutein, vars aminosyrasekvens är identisk i förhållande till vildtyps-IFN-ß bortsett från att val (V) i position 101 i vildtyps-IFN-ß, då numreringen är enligt vildtyps-IFN-ß, är ersatt

med phe (F).

6. DNA enligt patentkrav 5, som kodar en IFN-ß-mutein med formeln:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (SEQ id nr 1).

7. DNA enligt patentkrav 6, där kodonen som kodar aminosyra i position 101 är TTC.

8. DNA med formel enligt sekvensens id nr 2.

9. Rekombinant DNA-molekyl, kännetecknad av en DNA enligt något av patentkraven 4 - 8, vilken DNA är operativt länkad till en expressionskontrollsekvens i den rekombinanta DNA-molekylen.

10. Värdcell, som omfattar en rekombinant DNA-molekyl enligt patentkrav 9.

11. Förfarande för producering av en IFN-β-mutein, där val (V) i position 101 i vildtyps-IFN-ß, då numreringen är enligt vildtyps-IFN-ß, är ersatt med phe (F), varvid nämnda mutein uttrycker en antivirusaktivitet, som neutraliseras av antikroppar mot vildtyps-IFN-ß, vilket förfarande omfattar steg för odling av en värdcell enligt patentkrav 10 och insamling av IFN-ß-muteinen.

12. Förfarande enligt patentkrav 11, där IFN-ß-muteinen kodas av en DNA-sekvens, som består av en sekvens

enligt sekvensens id nr 2, och värdcellen är en djurcell i en odling.

13. Farmaceutisk komposition, som omfattar en IFN-ß-mutein enligt något av patentkraven 1 - 3 samt en farmaceutiskt acceptabel bärare.

14. Användning av en IFN-ß-mutein för framställning av en farmaceutisk komposition för behandling av virusinfektioner, vilken IFN-ß-mutein är kännetecknad av att val (V) i position 101 i vildtyps-IFN-ß, då numreringen är enligt vildtyps-IFN-ß, är ersatt med phe (F), varvid nämnda mutein uttrycker en antivirusaktivitet, som neutraliseras av antikroppar mot vildtyps-IFN-ß.

15. Användning av en IFN-ß-mutein för framställning av en farmaceutisk komposition för behandling av virusinfektioner, vilken IFN-ß-muteins aminosyrasekvens är identisk i förhållande till vildtyps-IFN-ß bortsett från att val (V) i position 101 i vildtyps-IFN-ß, då numreringen är enligt vildtyps-IFN-ß, är ersatt med phe (F).

16. Användning enligt något av patentkraven 14 - 15, där muteinen har formeln:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu- Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (SEQ id nr 1).

17. Användning av en DNA som kodar en IFN-ß-mutein för framställning av en farmaceutisk komposition för genterapi för behandling av virusinfektioner i en patient, vars DNA kodar en IFN-ß-mutein, där val (V) i position 101 i vildtyps-IFN-ß, då numreringen är enligt vildtyps-IFN-ß, är ersatt med phe (F), varvid nämnda mutein uttrycker en antivirusaktivitet, som neutraliseras av antikroppar mot vildtyps-IFN-ß.

18. Användning av en DNA som kodar en IFN-ß-mutein för framställning av en farmaceutisk komposition för genterapi för behandling av virusinfektioner i en patient, varvid nämnda DNA kodar en IFN-ß-mutein, vars aminosyrasekvens är identisk i förhållande till vildtyps-IFN-ß bortsett från att val (V) i position 101 i vildtyps-IFN-ß, då numreringen är enligt vildtyps-IFN-ß, är ersatt med phe (F).

19. Användning enligt något av patentkraven 17 - 18, där DNAn kodar en IFN-ß-mutein med formeln:

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Phe-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn (SEQ id nr 1).

20. Användning enligt patentkrav 19, där kodonen som kodar aminosyran i position 101 är TTC.

21. Användning av en DNA, vars sekvens motsvarar nukleotider 1 - 561 i sekvens id nr 2 eller nukleotider

64 - 561 i sekvens id nr 2, för genterapi för behandling av virusinfektioner i en patient.

22. Användning enligt patentkrav 21, varvid DNAn har en sekvens, som motsvarar nukleotider 1 - 561 i sekvens id nr 2.

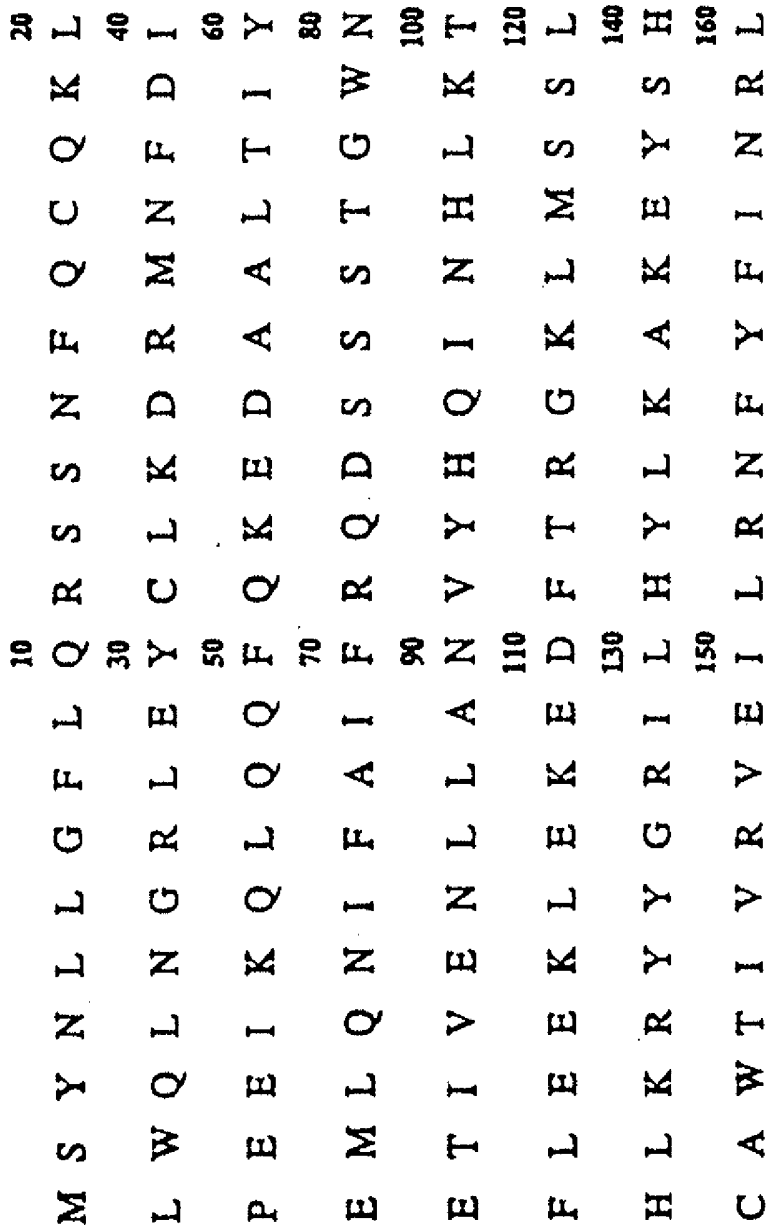
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160
M S Y N L L G F L Q R S S N F Q C Q K L
L W Q L N G R L E Y C L K D R M N F D I
P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A L T I Y
E M L Q N I F A I F R Q D S S S T G W N
E T I V E N L L A N V Y H Q I N H L K T
F L E E K L E E K E D F T R G K L M S S L
H L K R Y Y G R I L H Y L K A K E Y S H
C A W T I V R V E I L R N F Y F I N R L
T G Y L R N

FIG. 1

```
  -20              -15              -10              -5
ATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAATTGCTCTCCTGTTGTGCTTCTCCACTACAGCT
M  T  N  K  C  L  L  Q  I  A  L  L  L  C  F  S  T  T  A

       1           5                10               15
CTTTCCATGAGCTACAACTTGCTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGCAATTTTCAGTGT
L  S  M  S  Y  N  L  L  G  F  L  Q  R  S  S  N  F  Q  C

      20               25               30               35
CAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATG
Q  K  L  L  W  Q  L  N  G  R  L  E  Y  C  L  K  D  R  M

          40               45               50               55
AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCC
N  F  D  I  P  E  E  I  K  Q  L  Q  Q  F  Q  K  E  D  A

             60               65               70
GCATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCA
A  L  T  I  Y  E  M  L  Q  N  I  F  A  I  F  R  Q  D  S

75               80               85               90
TCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCTATCAT
S  S  T  G  W  N  E  T  I  V  E  N  L  L  A  N  V  Y  H

  95              100              105              110
CAGATAAACCATCTGAAGACATTCCTGGAAGAAAAACTGGAGAAAGAAGATTTCACC
Q  I  N  H  L  K  T  F  L  E  E  K  L  E  K  E  D  F  T

      115              120              125              130
AGGGGAAAACTCATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCAT
R  G  K  L  M  S  S  L  H  L  K  R  Y  Y  G  R  I  L  H

         135              140              145              150
TACCTGAAGGCCAAGGAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATC
Y  L  K  A  K  E  Y  S  H  C  A  W  T  I  V  R  V  E  I

             155              160              165
CTAAGGAACTTTTACTTCATTAACAGACTTACAGGTTACCTCCGAAAC
L  R  N  F  Y  F  I  N  R  L  T  G  Y  L  R  N
```

FIG. 2

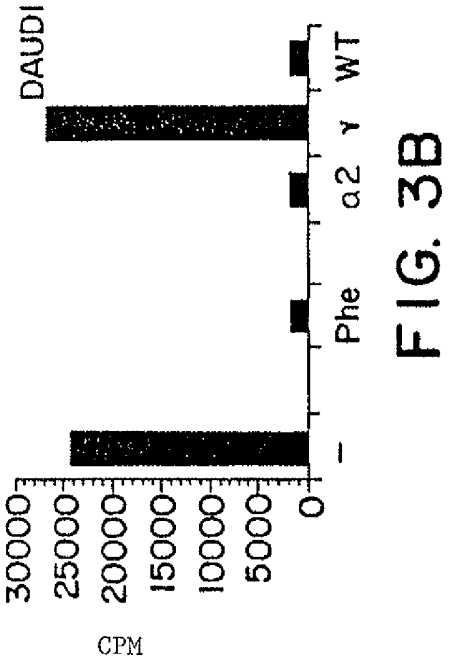

FIG. 3B

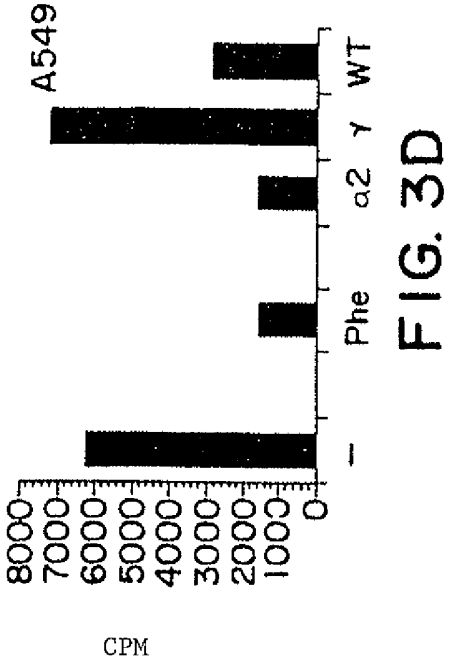

FIG. 3D

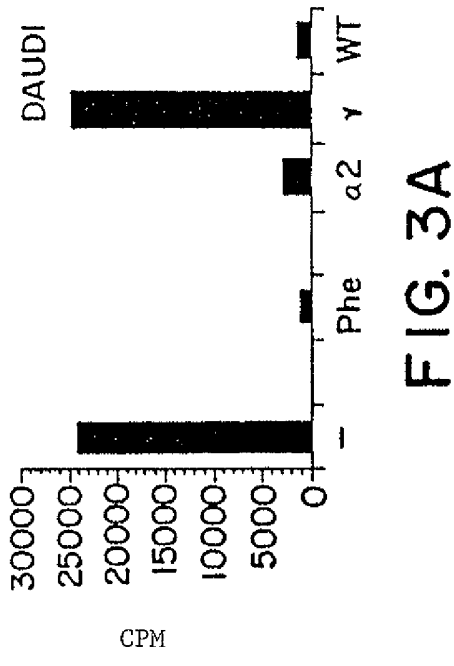

FIG. 3A

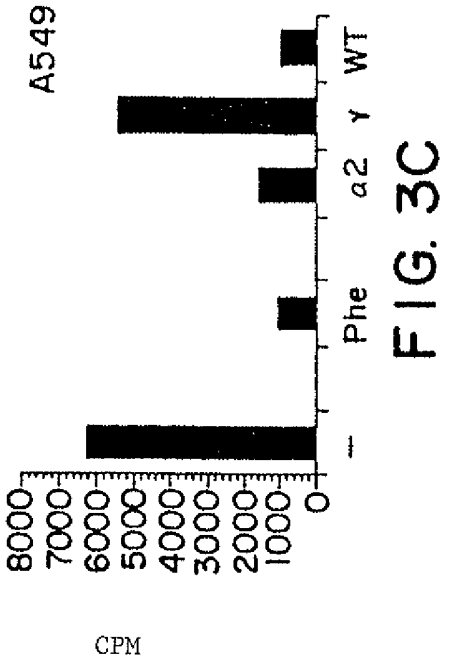

FIG. 3C

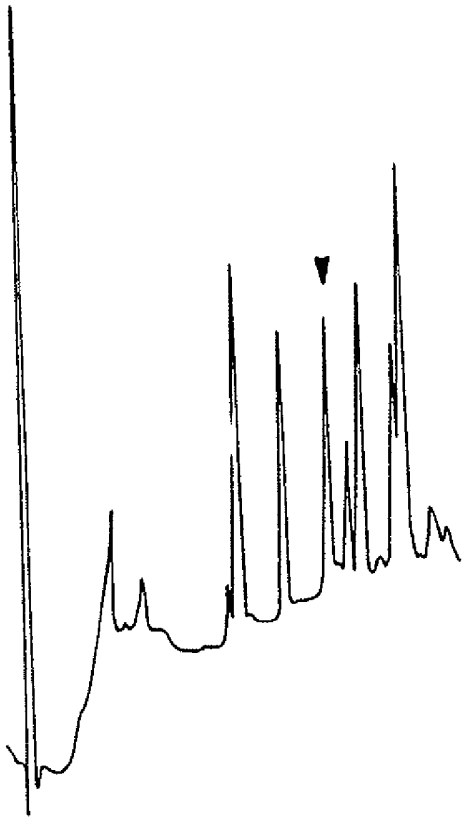

FIG. 4A

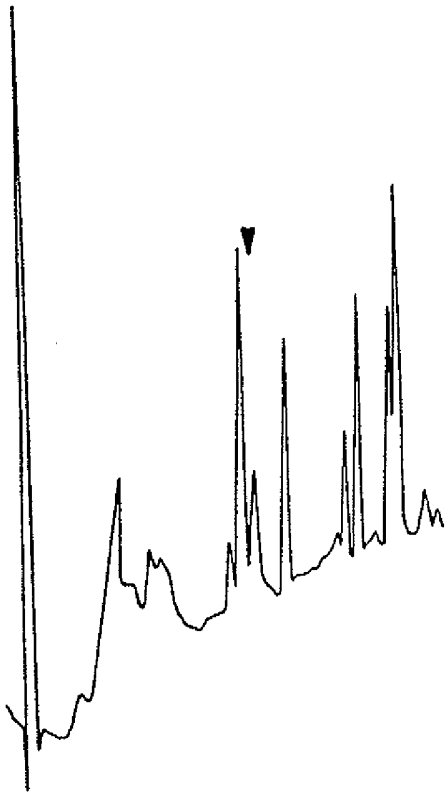

FIG. 4B

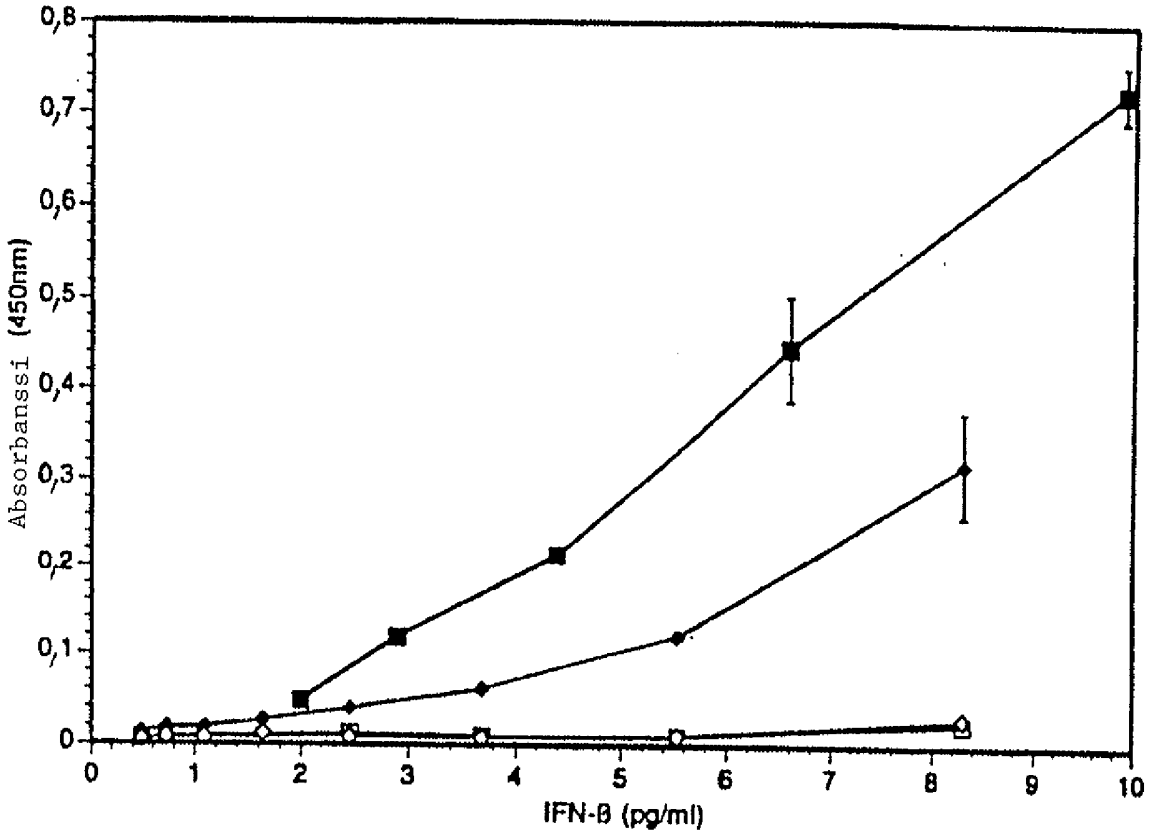
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Absorbanssi (450nm)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
IFN-β (pg/ml)
IFN-β(phe 101)
IFN-β(phe 101) / kanin anti-IFN-β-seerumi (1:1000)
IFN-β(val 101)
IFN-β(val 101) /kanin anti-IFN-β-seerumi (1:1000)

FIG. 5