

Béta-interferon-szerű molekulák

Kivonat

- 5 A találmány tárgya interferon- β aktivitást mutató konjugátum, amely legalább egy nem polipeptid molekularészt tartalmaz kovalensen kapcsolva interferon- β polipeptidhez, és amelynek az aminosav-szekvenciája különbözik a vad típusú humán interferon- β -étől legalább egy beépített és legalább egy eltávolított aminosav-oldalláncban, amely a nem polipeptid molekularész számára kapcsolócsoporthoz tartozik. Az első nem polipeptid molekularész például polimer molekula vagy cukor-molekularész. A konjugátum különösen alkalmazható terápiában. A találmány tárgyát képezi szülői interferon- β (IFNB) polipeptid glikozilált variánsa is, amely legalább egy *in vivo* glikozilációs helyet tartalmaz, és amelyben a szülői polipeptid glikozilációs helyhez közel elhelyezkedő aminosav-oldallánca módosítva lett úgy, hogy megnövekedett glikozilációjú polipeptid keletkezzen a szülői polipeptid glikozilációjához viszonyítva.
- 10

Jellemező alvira 0

Zoltán Andor



Béta-interferon-szerű molekulák

A találmány tárgyát új interferon- β (IFNB) molekulák képezik, eljárások ilyen moleku-
lák előállítására, és ilyen molekulák alkalmazása terápiában, különösen szklerózis multiplex,
5 virális fertőzés és rák kezelésére.

Az interferonok fontos citokinek, amelyeket antivirális, antiproliferatív és immunmodu-
láns aktivitások jellemeznek. Ezek az aktivitások képezik a klinikai előnyök alapját, amelyeket
sok betegségben megfigyeltek, köztük hepatitiszben, különféle rákokban és szklerózis multip-
lexben. Az interferonokat I. típusú és II. típusú osztályokba osztják szét. Az IFNB az I. típusú
10 interferonok osztályába tartozik, amely tartalmazza továbbá az interferon- α -t, τ -t és ω -t, míg
az interferon- γ az egyetlen ismert tagja a különálló II. osztálynak.

A humán IFNB egy szabályozó polipeptid, amelynek a molekulatömege 22 kDa, és 166
aminosavból áll. A test legtöbb sejtjében termelődik, különösen fibroblasztokban, virális fertő-
zés vagy más biológiailag aktív anyagokkal történő találkozás hatására. Kötődik egy multimer
15 sejtfelszíni receptorhoz, és a sikeres receptorkötés intracelluláris események sorozatát indítja
be, ami az IFNB által indukált gének expressziójához vezet, amelyek pedig olyan hatásokat
hoznak létre, amelyeket antivirális, antiproliferatív és immunmoduláns hatásokként osztályoz-
hatunk.

A humán IFNB aminosav-szekvenciáját Taniguchi közölte [Gene 10, 11-15. old.
20 (1980)] és az EP 83069. és EP 41313. számú európai szabadalmi iratok és 4 686 191. számú
amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat.

Leközölték a humán és eger IFNB kristályszerkezetét is [Proc. Natl. Acad. Sci. USA
94, 11813-11818. old. (1997) és J. Mol. Biol. 253, 187-207. old. (1995)]. Összefoglalót kö-
zöltek róluk az alábbi irodalmi helyen: Cell Mol. Life Sci. 54, 1203-1206. old. (1998).

25 Az IFNB-nek viszonylag kevés génsebészeti úton módosított variánsát írták le
[WO 95/25170., WO 98/48018. számú nemzetközi közzétételi iratok, 5 545 723., 4 914 033.
számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok, EP 260350. számú európai szabadalmi
irat, 4 588 585., 4 769 233. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok; Stewart és
mtsai., DNA 6, 119-128. old. (1987); Runkel és mtsai., Jour. Biol. Chem. 273, 8003-8008.
30 old. (1998)].

Beszámoltak IFNB expresszáltatásáról CHO sejtekben (4 966 843., 5 376 567. és
5 795 779. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok).

Redlich és mtsai. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4040-4044. old. (1991)] immunreaktív ellenanyagokat tárnak fel olyan szintetikus peptidek ellen, amelyek rekombináns humán IFNB szakaszának felelnek meg a C17S mutációval.

Feltártak meghatározott glikozilációs mintázatú IFNB molekulákat, és eljárásokat azok előállítására (EP 287075. és EP 529300. számú európai szabadalmi iratok).

Különféle irodalmi helyek tárnak fel polipeptid-módosításokat polimer-konjugációval vagy glikozilációval. Beszámoltak a natív IFNB vagy a C17S variánsának a polimer módosításáról (EP 229108., EP 593868. számú európai szabadalmi iratok, 5 382 657. és 4 917 888. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok és WO 99/55377. számú nemzetközi közzétételi irat). A 4 904 584. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban PEG-ilált, lizin-depletált polipeptideket tárnak fel, amelyekben legalább egy lizin deletálva lett vagy helyettesítve bármilyen más aminosav-oldalláncsal. A WO 99/67291. számú nemzetközi közzétételi iratban eljárást tárnak fel fehérjének PEG-gel történő konjugálására, amelyben a fehérje legalább egy aminosav-oldalláncát deletálták, és a fehérjét érintkezésbe hozták PEG-gel olyan körülmények között, amelyek megfelelőek a fehérje konjugálásához. A WO 99/03887. számú nemzetközi közzétételi iratban a növekedési hormon szupercsaládba tartozó polipeptidek PEG-ilált variánsait tárják fel, amelyekben cisztein-oldalláncot szubsztituáltak a polipeptid egy meghatározott régiójában található nem esszenciális aminosav-oldalláncával. Az IFNB-t megemlíti, mint a növekedési hormon szupercsaládba tartozó polipeptidek egy példáját. A WO 00/23114. számú nemzetközi közzétételi iratban glikozilált és PEG-ilált IFNB-t tárnak fel. A WO 00/23472. számú nemzetközi közzétételi iratban IFNB fúziós fehérjéket tárnak fel. A WO 00/26354. számú nemzetközi közzétételi iratban eljárást tárnak fel csökkent allergénitású glikozilált polipeptid-variánsok előállítására, amelyek a megfelelő szülői polipeptidhez hasonlítva legalább egy további glikozilációs helyet tartalmaznak. Az 5 218 092. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban a granulocita kolónia-stimuláló faktor (G-CSF) és más fehérjék módosításait tárják fel, oly módon, hogy legalább egy további szénhidrát-láncot építenek be a natív polipeptidhez képest. Megemlíti az IFNB-t, mint sok polipeptid egyikét, amelyek állítólag módosíthatók az 5 218 092. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban feltárt technológia alkalmazásával.

Az IFNB kereskedelmi forgalomban kapható készítményeiről — amelyeket *Betaseron*[®] (amit interferon β 1b-nek is neveznek, és amely nem glikozilált, rekombináns bakteriális sejtek alkalmazásával állítják elő, és nem tartalmaz N-terminális metionint és tartalmazza a C17S mutációt) és Avonex[™] és Rebif[®] (amit interferon- β 1a-nak is neveznek, és amely glikozilált,

rekombináns emlős sejtek alkalmazásával állítják kelő) név alatt árulnak szklerózis multiplexben szenvedő páciensek kezelésére — kimutatták, hogy hatásosak a súlyosbodás sebességének a csökkentésére, és több páciens nem súlyosbodik hosszú időn keresztül, a placeboval kezelt páciensekhez hasonlítva. Ezenfelül a betegség akkumulációs sebessége is csökkent [Neurol. 51, 682-689. old. (1998)].

A Pharmaceut. Res. 15, 641-649. old. (1998) irodalmi helyen leközölték az interferon β 1a és β 1b összehasonlítását szerkezet és funkció vonatkozásában.

Az IFNB az első terápiás beavatkozás, amelyről kimutatták, hogy késlelteti a szklerózis multiplex (MS) előrehaladását, ami a központi idegrendszer egy visszaeső, majd előrehaladó inflammatorikus degeneratív betegsége. A hatásmechanizmusa azonban nagyrészt továbbra is tisztázatlan. Úgy tűnik, hogy az IFNB gátló hatású a leukociták proliferációjára és antigénprezentációjára. Ezenfelül az IFNB modulálhatja a citokin-termelés profilját az anti-inflammatorikus fenotípus irányába. Végezetül az IFNB csökkentheti T-sejtek migrációját a T-sejtek mátrix-metalloproteinázainak aktivitásának gátlásával. Ezek az aktivitások valószínűleg együttesen hatnak az IFNB MS-ben mutatott mechanizmusában [Neurol. 51, 682-689. old. (1998)].

Ezenfelül az IFNB-t alkalmazhatjuk oszteosarkóma, bazális sejt karcinóma, cervikális diszplázia, glióma, akut mieloid leukémia, többszörös mielóma, Hodgkin-szindróma, emlőkarcinóma, melanóma, és virális fertőzések, mint például papillómavírus, virális hepatitisz, *Herpes genitalis*, *Herpes zoster*, herpeszesz keratitisz, *Herpes simplex*, virális encefalitisz, citomegalovírus, tüdőgyulladás és rinovírus kezelésére. Különbőféle mellékhatások kapcsolódnak a jelenlegi IFNB-készítmények alkalmazásához, beleértve az injekció helyének reakcióit, lázat, hidegrázást, izomfájást, ízületi fájdalmat, és más megfázás-szerű tüneteket [Clin. Therapeutics, 19, 883-893. old. (1997)].

Ezenfelül a páciensek 6-40%-ában alakulnak ki semlegesítő ellenanyagok az IFNB ellen [Int. Arch. Allergy Immunol. 118. 368-371. old. (1999)]. Kimutatták, hogy az IFNB-t semlegesítő ellenanyagok termelése csökkenti az IFNB-re adott biológiai választ, és csökkenő tendenciát okoz a kezelés hatásában [Neurol. 50, 1266-1272, 1998. old. (1998)]. A semlegesítő ellenanyagok valószínűleg akadályozhatják az IFNB terápiás alkalmazhatóságát más betegségek kezelésével kapcsolatban is [Immunol. Immunother. 39, 263-268. old. (1994)].

Figyelembe véve a jelenlegi IFNB termékek mellékhatásainak a nagyságrendjét, azok gyakori injekciós beadását, a semlegesítő ellenanyagok termelésének a kockázatát, amelyek akadályozzák az IFNB terápiás hatását és a fokozott terápiás hatással együtt járó optimális te-

rapiás IFNB-szintek elérésének lehetőségét, nyilvánvalóan szükség van javított IFNB-szerű molekulákra.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés új IFNB konjugátumokat tár fel, amelyek nem polipeptid molekularészt tartalmaznak IFNB-polipeptidhez kapcsolódva, amely módosítva lett nem polipeptid molekularész, mint például PEG kapcsolására szolgáló helyek és glikozilációs helyek beépítésével és/vagy deléciójával. A molekuláknak javított tulajdonságaik vannak, mint például javított féléletidő és/vagy csökkent reaktivitás a jelenleg kapható IFNB termékekkel szemben termelődő semlegesítő ellenanyagokkal.

A jelen bejelentésben kívánt tulajdonságú javított IFNB-molekulákat tárunk fel.

Ennek megfelelően egy első megvalósítási mód szerint a találmány tárgya szülői IFNB-polipeptid glikozilált variánsa, amely legalább egy *in vivo* glikozilációs helyet tartalmaz, és amelyben a szülői polipeptid glikozilációs helyhez közel elhelyezkedő aminosav-oldallánca módosítva lett úgy, hogy megnövekedett glikozilációjú polipeptid keletkezzen a szülői IFNB-polipeptid glikozilációjához viszonyítva.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás legalább egy *in vivo* glikozilációs helyet tartalmazó szülői IFNB-molekula *in vivo* glikozilációjának növelésére, amely szerint

i) a szülői IFNB-molekula *in vivo* glikozilációs helyének közelében elhelyezkedő első pozíciót elfoglaló aminosav-oldalláncot szubsztituálunk egy második aminosav-oldallánccal, variáns IFNB-molekulát előállítva;

ii) mérjük a variáns glikozilációjának mértékét a szülői IFNB-molekulához viszonyítva, összehasonlítható körülmények között glikoziláló gazdasejtben történő expresszió vizsgálatával,

iii) szükség esetén megismételjük az i) lépést a második aminosavnak egy harmadik aminosavval történő helyettesítésére és/vagy a glikozilációs hely közelében elhelyezkedő második pozíciót elfoglaló aminosav-oldalláncnak egy második aminosav-oldallánccal történő szubsztitúciójára, és megismételjük az ii) lépést akár a szülői molekulán, akár az i) lépésben előállított variáns molekulán, és az i-iii) lépéseket addig ismételjük, amíg megnövekedett *in vivo* glikozilációt nem kapunk.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya interferon- β polipeptid, amelynek az aminosav-szekvenciája különbözik a 2. azonosítószámú szekvencián bemutatott szekvenciájú vad típusú humán interferon- β szekvenciájától, és az alábbi mutációk legalább egyikét tartalmazza:

D110F;

C17S+D110F;

C17S+Q49N+Q51T;

C17S+F111N+R113T;

5 C17S+Q49N+Q51T+F111N+R113T;

D110F+F111N+R113T;

C17S+D110F+F111N+R113T;

C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T;

C17S+K19R;

10 C17S+K33R;

C17S+K45R;

C17S+K19R+K33R+K45R; vagy

C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T,

és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG-et tartalmaz.

15 Egy specifikus megvalósítási mód szerint a találmány tárgya interferon- β polipeptid, amelynek az aminosav-szekvenciája az alábbi:

MSYNLLGFLQ RSSNFQSQKL LWQLNGRLEY CLKDRMNFDI PEEIKQLQNF
TKEDAALTIY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN ETIVENLLAN VYHQINHLKT
VLEEKLEKEF NTTGKLMSSL HLKRYYYGRIL HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI
20 LRNFYFINRL TGYLRN,

és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG-et tartalmaz.

Egy másik specifikus megvalósítási mód szerint a találmány tárgya interferon- β polipeptid, amelynek az aminosav-szekvenciája az alábbi:

MSYNLLGFLQ RSSNFQSQRL LWQLNGRLEY CLRDRMNFDI PEEIRQLQNF
25 TKEDAALTIY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN ETIVENLLAN VYHQINHLKT
VLEEKLEKEF NTTGKLMSSL HLKRYYYGRIL HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI
LRNFYFINRL TGYLRN,

és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG-et tartalmaz.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya interferon- β polipeptid glikozilált variánsa, amelynek az aminosav-szekvenciája különbözik a 2. azonosítószámú szekvencián bemutatott szekvenciájú vad típusú humán interferon- β szekvenciájától, és az alábbi mutációk legalább egyikét tartalmazza:

D110F;

C17S+D110F;
 C17S+Q49N+Q51T;
 C17S+F111N+R113T;
 C17S+Q49N+Q51T+F111N+R113T;
 5 D110F+F111N+R113T;
 C17S+D110F+F111N+R113T;
 C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T;
 C17S+K19R;
 C17S+K33R;
 10 C17S+K45R;
 C17S+K19R+K33R+K45R; vagy
 C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T,

és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG-et tartalmaz.

Egy specifikus megvalósítási mód szerint a találmány tárgya interferon- β polipeptid gli-

15 kozilált variánsa, amelynek az aminosav-szekvenciája az alábbi:

MSYNLLGFLQ RSSNFQSQKL LWQLNGRLEY CLKDRMNFDI PEEIKQLQNF
 TKEDAALTIY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN ETIVENLLAN VYHQINHLKT
 VLEEKLEKEF NTTGKLMSSL HLKRYYYGRIL HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI
 LRNFYFINRL TGYLRN,

20 és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG-et tartalmaz.

Egy másik specifikus megvalósítási mód szerint a találmány tárgya interferon- β polipep-

tid glikozilált variánsa, amelynek az aminosav-szekvenciája az alábbi:

MSYNLLGFLQ RSSNFQSQRL LWQLNGRLEY CLRDRMNFDI PEEIRQLQNF
 TKEDAALTIY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN ETIVENLLAN VYHQINHLKT
 25 VLEEKLEKEF NTTGKLMSSL HLKRYYYGRIL HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI
 LRNFYFINRL TGYLRN,

és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG-et tartalmaz.

Egy még további megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát képezik eszközök és
 eljárások találmány szerinti variáns polipeptid előállítására, beleértve a polipeptideket kódoló
 30 nukleotid-szekvenciákat és expressziós vektorokat, valamint eljárásokat a polipeptid előállítá-
 sára.

Végezetül a találmány tárgya találmány szerinti variánst tartalmazó terápiás készítmény, találmány szerinti készítmény terápiában történő alkalmazásra, készítmény alkalmazása terápiában és betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerek gyártásában.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrát:

5 Az 1. ábrán hIFNB optimalizált glikozilációs variánsainak a Western-blotját mutatjuk be (amint a 7. és 8. példában leírjuk). 1. sáv, vad típusú hIFNB, 2. sáv, [Q49N, Q51T] hIFNB, 3. sáv, [Q48F, Q49N, Q51T] hIFNB, 4. sáv, [Q48V, Q49N, Q51T] hIFNB, 5. sáv, [Q48W, Q49N, Q51T] hIFNB, 6. sáv, marker, 7. sáv, [F11 IN, R113T] hIFNB, 8. sáv, [D110F, F111N, R113T] hIFNB és 9. sáv [D110V, F111N, R113T] hIFNB.

10 A jelen bejelentésben számos irodalmi helyre hivatkozunk. Ezek mindegyike hivatkozás útján a kitanítás részét képezi.

A párhuzamosan függő PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés esszenciális a jelen találmány teljes ismertetéséhez, és ezáltal beépítettük a jelen bejelentésbe. Ezeket a részeket a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentésre való hivatkozással megjelöltük. Nyilvánvaló, hogy azok a részek a jelen bejelentés részét képezik olyan mértékben, hogy például a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentésben feltárt polipeptid-variánsok alkalmazhatók szülői IFNB-molekulákként a találmány szerinti módosításokhoz. Továbbá, a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentésben feltárt konjugátumokon vagy polipeptideken alapuló új találmányokat is feltárunk a jelen bejelentésben.

20 **Definíciók**

A jelen bejelentés és találmány (és ahol releváns, a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány) vonatkozásában az alábbi definíciókat alkalmazzuk:

A „konjugátum” (vagy felcserélhető módon a „konjugált polipeptid”) kifejezés alatt heterogén molekulát értünk (összetett vagy kiméra értelemben), amely egy vagy több polipeptidnek egy vagy több nem polipeptid molekularészhez történő kovalens kapcsolásával jön létre. A kovalens kapcsolat kifejezés alatt azt értjük, hogy a polipeptid és nem polipeptid molekularész akár közvetlenül kovalensen kapcsolódnak, akár közvetve kovalensen kapcsolódnak egymáshoz közbelső molekularészen vagy molekularészeken keresztül, mint például hídon, távtartón vagy kapcsoló molekularészen vagy molekularészeken keresztül, a polipeptidben található kapcsolócsoporthoz alkalmazásával. Előnyösen a konjugátum oldható releváns koncentrációk mellett és körülmények között, azaz oldható fiziológiai folyadékokban, mint például vérben. Találmány szerinti konjugált polipeptidek példái közé tartoznak glikozilált és/vagy PEG-ilált

polipeptidek. A „nem konjugált polipeptid” kifejezést alkalmazhatjuk a konjugátum polipeptid részével kapcsolatban.

A „nem polipeptid molekularész” kifejezés alatt olyan molekulát értünk, amely konjugálható a találmány szerinti polipeptiden található kapcsolócsoporthoz. Ilyen molekula előnyös példái közé tartoznak polimer molekulák, cukor molekulák, lipofil vegyületek vagy szerves derivatizáló ágensek. Amikor a találmány szerinti konjugátummal kapcsolatban alkalmazzuk, nyilvánvaló, hogy a nem polipeptid molekularész kapcsolódik a konjugátum polipeptid részéhez a polipeptid kapcsolócsoportján keresztül.

A „polimer molekula” kifejezés alatt két vagy több monomer kovalens kapcsolódásával kialakult molekulát értünk, amelyben a monomerek egyike sem aminosav-oldallánc, kivéve ahol a polimer humán albumin vagy másféle nagy mennyiségben előforduló plazmafehérje. A „polimer” kifejezést felcserélhető módon alkalmazhatjuk a „polimer molekula” kifejezéssel. A kifejezés alatt *in vitro* glikozilációval kapcsolt szénhidrát-molekulákat is értünk, azaz *in vitro* szintetikus glikozilációt hajtunk végre, amely normálisan szénhidrát molekula kovalens kötését foglalja magában a polipeptid kapcsolócsoportjához, adott esetben keresztkötő ágens alkalmazásával. Az *in vivo* glikozilációval, mint például N- vagy O-glikozilációval (amint az alább leírjuk) kapcsolt szénhidrát-molekulákat a leírás szerinti értelemben „cukor-molekularésznek” nevezzük. Kivéve ahol a nem polipeptid molekularészek, mint például polimer-molekulák vagy cukor-molekularészek számát kifejezetten megadjuk, a leírás szerinti értelemben minden hivatkozás a konjugátumban található vagy másként alkalmazott „nem polipeptid molekularészre” a konjugátumban található egy vagy több nem polipeptid molekularészre, mint például polimer-molekulára vagy cukor-molekularészre vonatkozik.

A „kapcsolócsoporthoz” kifejezés alatt a polipeptid olyan aminosav-oldallancát értjük, amely képes kapcsolódni a releváns nem polipeptid molekularészhez. Például polimer, különösen PEG konjugálása esetében egy gyakran alkalmazott kapcsolócsoporthoz a lizin aminosav-csoportja vagy az N-terminális aminosav-csoport. Más polimer-kapcsoló csoportok közé tartozik a szabad karboxilsav-csoport (például a C-terminális aminosav-oldallánc vagy egy aszparaginsav- vagy glutaminsav-oldallánc), megfelelő módon aktivált karbonil-csoportok, merkaptocsoportok (például cisztein-oldallánc), aromás oldalláncok (például Phe, Tyr, Trp), hidroxilcsoportok (például Ser, Thr vagy OH-Lys hidroxil-csoportja), guanidin (például Arg), imidazol (például His), és oxidált szénhidrát-molekularészek.

Az *in vivo* glikoziláció esetében a „kapcsolócsoporthoz” kifejezést nem hagyományos értelemben alkalmazzuk, N-glikozilációs helyet alkotó aminosavak jelzésére (amelynek a szekven-

ciája N-X'-S/T/C-X", ahol X' jelentése bármely aminosav-oldallánc prolin kivételével, X" jelentése bármely aminosav-oldallánc, amely vagy azonos, vagy sem X'-vel, és előnyösen különbözik prolintól, N jelentése aszparagin és S/T/C jelentése akár szerin, treonin vagy cisztein, előnyösen szerin vagy treonin, és legelőnyösebben treonin). Habár az N-glikozilációs hely aszparagin oldallánca az, amelyhez a cukor-molekularész kapcsolódik a glikoziláció folyamán, az ilyen kapcsolódás nem érhető el, csak ha az N-glikozilációs hely többi oldallánca is jelen van. Ennek megfelelően, amikor a nem polipeptid molekularész egy N-hez kötött cukor-molekularész, a „nem polipeptid molekularész kapcsolására szolgáló kapcsolócsoporthoz tartozó aminosav-oldallánc” kifejezés alatt a szülői polipeptid aminosav-szekvenciájának a megváltoztatásával kapcsolatban N-glikozilációs helyet alkotó aminosav-oldallancok értendők, amelyek olyan módon változtathatók meg, hogy vagy funkcionális N-glikozilációs helyet építünk be az aminosav-szekvenciába, vagy azt eltávolítjuk a szekvenciából. Egy „O-glikozilációs hely” esetében az kapcsolócsoporthoz szerin vagy treonin oldallánc OH-csoportja.

A "különbség" vagy „különbözik” kifejezés alatt specifikus mutációkkal kapcsolatban azt értjük, hogy további különbségek jelenléte is megengedett a meghatározott aminosav-különbség mellett. Például a nem polipeptid molekularész számára kapcsolócsoporthoz tartozó aminosav-oldallánc eltávolítása és/vagy beépítése mellett az IFNB polipeptid tartalmazhat más szubsztitúciókat, amelyek nem kapcsolatosak ilyen aminosav-oldallancok beépítésével és/vagy eltávolításával. A „legalább egy” kifejezés alatt nem polipeptid molekularész, aminosav-oldallánc, szubsztitúció, stb. vonatkozásában egyet vagy többet értünk. A „mutáció” és „szubsztitúció” kifejezéseket felcserélhető módon alkalmazzuk a leírásban.

A jelen bejelentésben az aminosav-neveket és atomneveket (például CA, CB, CD, CG, SG, NZ, N, O, C, stb.) a Protein DataBank (PDB) (www.pdb.org) definíciója szerint alkalmazzuk, ami a IUPAC nomenklatúrán alapszik [„IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (residue names, atom names e.t.c.)”, Eur. J. Biochem. 138, 9-37. old. (1984)], együtt a helyesbítéseikkel [Eur. J. Biochem. 152, 1. old. (1985)]. A CA-t néha C α -nak nevezzük, a CB-t C β -nak. Az „aminosav-oldallánc” kifejezés alatt az alábbi aminosavak bármelyike értendő: alanin (Ala vagy A), cisztein (Cys vagy C), aszparaginsav (Asp vagy D), glutaminsav (Glu vagy E), fenilalanin (Phe vagy F), glicin (Gly vagy G), hisztidin (His vagy H), izoleucin (Ile vagy I), lizin (Lys vagy K), leucin (Leu vagy L), metionin (Met vagy M), aszparagin (Asn vagy N), prolin (Pro vagy P), glutamin (Gln vagy Q), arginin (Arg vagy R), szerin (Ser vagy S), treonin (Thr vagy T), valin (Val vagy V), triptofán (Trp vagy W) vagy tirozin (Tyr vagy Y). Az aminosav-pozíciók/szubsztitúciók azonosítására alkalmazott termi-

nológiát az alábbiakban szemléltetjük: C17 (ami a 17. pozícióban elhelyezkedő cisztein oldalláncot jelzi a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciában). C17S (ami azt jelzi, hogy a 17. pozícióban lévő cisztein-oldallánc helyettesítve lett szerinnel). A leírás szerinti értelemben az aminosav-oldalláncok számozását a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciához viszonyítjuk. Az „M1del” kifejezést alkalmazzuk annak jelölésére, hogy az 1. pozíciót elfoglaló metionin oldalláncot deletáltuk. Több szubsztitúciót egy „+” jellel jelölünk, például a „R71N+D73T/S” kifejezés azt jelenti, hogy az aminosav-szekvenciában a 71. pozícióban lévő arginin oldallánc helyettesítve van aszparaginnal és a 73. pozícióban lévő aszparaginsav helyettesítve van treonin vagy szerin oldallánccal. előnyösen treonin oldallánccal. A „T/S” kifejezés egy adott szubsztitúció esetében vagy T vagy S oldalláncot jelent, előnyösen T oldalláncot.

A „nukleotid-szekvencia” kifejezés alatt két vagy több nukleotid-molekula összefüggő szakaszát értjük. A nukleotid-szekvencia lehet genomiális, cDNS, RNS, szemiszintetikus, szintetikus eredetű, vagy ezek bármilyen kombinációja.

Az „IFNB fehérjeszekvencia-család” kifejezést a hagyományos értelemben alkalmazzuk, azaz polipeptidek egy olyan csoportjának a jelölésére, amelyek elegendően homológ aminosav-szekvenciákat tartalmaznak ahhoz, hogy lehetővé tegyék a szekvenciák egymás alá rendezését például a CLUSTALW program alkalmazásával. Az IFNB szekvencia-család elérhető például a PFAM családokból (version 4.0), vagy előállíthatjuk megfelelő számítógépes program, mint például a CLUSTALW (version 1.74) és az alapértelmezett paraméterek alkalmazásával [Thompson és mtsai., „CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice”, Nucleic Acids Research 22, 4673-4680. old. (1994)].

A „sejt”, „gazdasejt”, „sejtvonal” és „sejtenyészet” kifejezéseket felcserélhető módon alkalmazzuk a leírásban, és mindegyik ilyen kifejezésbe beleértendő a sejt növesztéséből vagy tenyésztéséből származó utódok. A „transzformáció” és „transzfekció” kifejezéseket felcserélhető módon alkalmazzuk, és DNS sejtbe történő bejuttatásának a folyamatát értjük alattuk.

A „működőképesen kapcsolt” kifejezés alatt két vagy több nukleotid-szekvencia kovalens kapcsolását értjük, enzimatis ligálással vagy másképpen, egymáshoz viszonyítva olyan konfigurációban, hogy a szekvenciák normális funkciója végrehajtható legyen. Például egy pre-szekvenciát vagy szekréción vezetőszekvenciát kódoló nukleotid-szekvencia működőképesen kapcsolt egy polipeptid nukleotid-szekvenciájához, ha az olyan preproteinként expresszálódik, amely részt vesz a polipeptid szekrécijában; egy promóter vagy enhancer működőképesen

5

10

15

30

a még mindig jelen van a testben/célszervben, vagy az az idő, amelynél a polipeptid vagy konjugátum aktivitása a kiindulási érték 50%-a). A funkcionális *in vivo* féléletidő meghatározásának az alternatívája, meghatározhatjuk a „szérum féléletidőt”, azaz azt az időt, ameddig a polipeptid vagy a konjugátum molekula kering a plazmában vagy a véráramban, mielőtt kiürül.

5 A szérum féléletidő meghatározása gyakran egyszerűbb, mint a funkcionális *in vivo* féléletidő meghatározása, és a szérum féléletidő nagyságrendje gyakran jó jelzője a funkcionális *in vivo* féléletidő nagyságrendjének. A szérum féléletidő alternatív kifejezései közé tartozik a „plazma féléletidő”, „keringési féléletidő” „szérum-kiürülés”, „plazma-kiürülés” és „kiürülési féléletidő”. A megtartandó funkcionalitás normálisan antivirális, antiproliferatív, immunmoduláns
10 vagy receptorkötő aktivitások bármelyike. A funkcionális *in vivo* féléletidőt és szérum féléletidőt bármilyen, a szakterületen ismert alkalmas eljárás alkalmazásával meghatározhatjuk, amint azt tovább tárgyaljuk az alábbi 'Anyagok és eljárások' szakaszban.

A polipeptid vagy konjugátum normális esetben kiürül a retikuloendotéliális rendszer (RES), vese, lép vagy máj közül egy vagy több működésének a következtében, vagy specifikus
15 vagy nem specifikus proteolízis következtében. A vesében lejátszódó kiürülést „renális kiürülésnek” is nevezhetjük, és például glomeruláris szűrés, tubuláris kiválasztás vagy tubuláris elimináció révén történhet. Normális esetben a kiürülés a polipeptid vagy konjugátum fizikai jellegzetességeitől függ, mint például molekulatömegétől, méretétől (átmérőjétől)(a glomeruláris szűrés vágási értékhez viszonyítva), töltésétől, szimmetriájától, alakjától/merevségétől, a kap-
20 csolódó szénhidrátláncoktól, és a fehérje celluláris receptorainak a jelenlététől. A körülbelül 67 kDa molekulatömeget tekintik a renális kiürülés vágási értékének.

A csökkent renális kiürülést bármilyen alkalmas vizsgálati eljárás alkalmazásával megállapíthatjuk, például egy elfogadott *in vivo* vizsgálati eljárással. Tipikusan a renális kiürülést jelzett (például radioaktívan vagy fluoreszcensen jelzett) polipeptid vagy polipeptid-konjugátum
25 páciensnek történő beadásával, és a jel aktivitásának a páciensből gyűjtött vizeletben való mérésével állapítjuk meg. A csökkent renális kiürülést a megfelelő nem konjugált polipeptidhez vagy nem konjugált vad típusú polipeptidhez vagy kereskedelmi forgalomban kapható IFNB termékhez viszonyítva határozzuk meg összehasonlítható körülmények között.

A „megnövekedett” kifejezés alatt funkcionális *in vivo* féléletidő vagy szérum féléletidő
30 vonatkozásában azt értjük, hogy a konjugátum vagy polipeptid releváns féléletideje szignifikánsan megnövekedett egy referenciamolekulához viszonyítva, mint például nem konjugált humán vad típusú IFNB-hez (például Avonex vagy Rebif), vagy nem konjugált vad típusú humán

IFNB-hez viszonyítva (például Betaseron), összehasonlítható körülmények között meghatározva.

A „csökkent immunogenitás és/vagy megnövekedett funkcionális *in vivo* féléletidő és/vagy megnövekedett szérum féléletidő” kifejezés alatt bármelyik, bármelyik kettő, vagy mindhárom tulajdonságot értjük. Előnyösen egy találmány szerinti konjugátum vagy polipeptid ezek közül legalább kettővel rendelkezik, azaz csökkent az immunogenitása és megnövekedett a funkcionális *in vivo* féléletideje, vagy megnövekedett a funkcionális féléletideje és megnövekedett a szérum féléletideje. Legelőnyösebben a konjugátum vagy polipeptid rendelkezik mindhárom tulajdonsággal.

Az „összehasonlítható körülmények között” kifejezés alatt egy találmány szerinti molekula és egy referenciamolekula relatív (semmint abszolút) tulajdonságainak mérése vonatkozásában azt értjük, hogy a két molekula releváns tulajdonságát ugyanakkor a vizsgálati eljárásnak az alkalmazásával mérjük (azaz a vizsgálati eljárást ugyanolyan körülmények között hajtjuk végre ugyanakkor a belső standardnak az alkalmazásával), és — ahol ez releváns — ugyanolyan típusú állatok alkalmazásával.

Az „IFNB aktivitást mutat” kifejezés alatt azt értjük, hogy a polipeptid vagy konjugátum rendelkezik a natív IFNB, előnyösen a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosavszekvenciájú, adott esetben glikoziláló gazdasejtben expresszálatott humán vad típusú IFNB (amely az érett szekvencia), vagy kereskedelmi forgalomban kapható IFNB termék egy vagy több funkciójával. Az ilyen funkciók közé tartozik IFNB-t kötni képes és a receptorról intracelluláris jeltovábbítás kiváltására képes interferon-receptorhoz való kötődés képessége, különösen az I. típusú interferon-receptorhoz, amely az IFNAR-2 és IFNAR-1 alegységekből áll [Domanski és mtsai., The Journal of Biological Chemistry 273, 3144-3147. old. (1998); Mogensen és mtsai., Journal of Interferon and Cytokine Research 19, 1069-1098. old. (1999)], és antivirális, antiproliferatív vagy immunmoduláns aktivitása van (amelyet a szakterületen ismert vizsgálati eljárások alkalmazásával határozhatunk meg, például az alábbi kitanításban idézettekkel). Az IFNB aktivitást a szakterületen ismert eljárásokkal mérhetjük, amint az szemlétjük az alábbi 'Anyagok és eljárások' szakaszban.

A polipeptid vagy konjugátum akkor „mutat” IFNB aktivitást vagy „rendelkezik” azzal, ha mérhető funkciót, például mérhető receptorkötést és stimuláló aktivitást mutat (például az 'Anyagok és eljárások' szakaszban leírt elsődleges és másodlagos vizsgálati eljárásokkal meghatározva). Az IFNB aktivitást mutató polipeptidet a leírás szerinti értelemben nevezhetjük „IFNB molekulának”, „IFNB variáns polipeptidnek” vagy „IFNB polipeptidnek” is. Az „IFNB

polipeptid”, „IFNB variáns polipeptid” és „variáns polipeptid” kifejezéseket elsősorban a találmány szerinti módosított polipeptidek vonatkozásában alkalmazzuk a leírásban.

A „szülői IFNB” kifejezés alatt a javítandó, találmány szerinti vagy — ahol ez releváns — a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti kiindulási molekulát értjük. Előnyösen a szülői IFNB az IFNB szekvencia-családba tartozik. Míg a szülői IFNB bármilyen eredetű lehet, mint például gerinces vagy emlős eredetű (például a WO 00/23472. számú nemzetközi közzétételi iratban definiált bármilyen eredetű), a szülői IFNB előnyösen a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvencián bemutatott vad típusú humán IFNB, vagy annak variánsa. A szülői IFNB polipeptid vonatkozásában egy „variáns” olyan polipeptid, amely egy vagy több aminosav-oldalláncban, normális esetben 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 vagy 15 aminosav-oldalláncban különbözik a szülői polipeptidtől. A vad típusú humán IFNB példái közé tartozik az Avonex vagy Rebif polipeptid része. Szülői IFNB variáns példája a Betaseron. Más megoldásképpen a szülői IFNB polipeptid olyan aminosav-szekvenciát tartalmazhat, amely hibrid molekula az IFNB és egy másik homológ polipeptid, mint például interferon- α között, adott esetben egy vagy több további szubsztitúcióval a hibrid molekulában. Egy ilyen hibrid molekula olyan aminosav-szekvenciát tartalmazhat, amely több mint 10 aminosav-oldalláncban különbözik a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciától. Annak érdekében, hogy szülői polipeptidként hasznos legyen, a hibrid molekula IFNB aktivitást mutat (például az 'Anyagok és eljárások' szakaszban leírt másodlagos vizsgálati eljárással meghatározva). Találmány szerinti szülői IFNB molekulaként szolgáló vad típusú humán IFNB variánsok más példái közé tartoznak a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentésben leírt variánsok, amelyekbe beépítettünk és/vagy amelyekből eltávolítottunk nem polipeptid molekularész számára kapcsolócsoporthoz tartozó aminosav-oldalláncokat, mint például bármilyen, a WO 00/23114., WO 00/23472., WO 99/3887. számú nemzetközi közzétételi iratokban leírt, vagy a szakterületen másképpen hozzáférhető IFNB molekula.

A „funkcionális hely” kifejezés alatt a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti vagy a jelen találmány szerinti polipeptid vagy konjugátum vonatkozásában egy vagy több olyan aminosav-oldalláncot értünk, amely esszenciális vagy másképpen részt vesz az IFNB funkciójában vagy teljesítményében, és ily módon a funkcionális helyen „helyezkedik el”. A funkcionális hely például egy receptorkötő hely, és a szakterületen ismert eljárások alkalmazásával határozhatjuk meg, előnyösen a polipeptidnek releváns receptorral, mint például az IFNAR-1 és IFNAR-2 alegységekből álló I. típusú interferon-receptorral alkotott komplexének szerkezetének az elemzésével.

Találmány szerinti polipeptid-variánsok

Megnövekedett glikozilációjú variánsok

Meglepő módon azt találtuk, hogy egy IFNB molekula egy adott glikozilációs helyén a glikoziláció megnövelhető a glikozilációs helyhez közeli egy vagy több aminosav-oldallánc módosításával, függetlenül attól, hogy az egy beépített hely vagy természetben előforduló hely.

Ennek megfelelően egy megvalósítási mód szerint a találmány tárgya szülői IFNB-polipeptid glikozilált variánsa, amely legalább egy *in vivo* glikozilációs helyet tartalmaz, és amelyben a szülői polipeptid glikozilációs helyhez közel elhelyezkedő aminosav-oldallánca módosítva lett úgy, hogy megnövekedett glikozilációjú polipeptid keletkezzen a szülői polipeptid glikozilációjához viszonyítva.

A „variáns” kifejezés alatt azt értjük, hogy a szülői polipeptid aminosav-oldalláncai megváltoztak. A glikozilált variánst nevezhetjük IFNB konjugátumnak is (amely egy nem polipeptid molekularészt tartalmaz, amely a konjugátum polipeptid részéhez kapcsolódó cukor-molekularész).

Normális esetben az *in vivo* glikozilációs hely egy N-glikozilációs hely, de O-glikozilációs hely is a találmány tárgykörébe tartozik.

A leírás vonatkozásában a "megnövekedett glikoziláció" kifejezés alatt a kapcsolódó szénhidrát-molekulák megnövekedett szintjét értjük, ami normális esetben a glikozilációs hely(ek) megnövekedett (vagy jobb) kihasználásának a következménye. A megnövekedett glikozilációt bármilyen, a szakterületen kapcsolódó szénhidrát-szerkezetek elemzésére ismert alkalmas eljárás alkalmazásával meghatározhatjuk. Egy kényelmes vizsgálati eljárás kapcsolódó szénhidrát-szerkezetek meghatározására az alábbiakban a 7. és 8. példában leírt eljárás.

Egy glikozilációs helyhez „közeli” aminosav-oldallánc általában a -4., -3., -2., -1., +1., +2., +3. vagy +4. pozícióban helyezkedik el azon glikozilációs hely aminosav-oldallancához viszonyítva, amelyhez az adott szénhidrát kapcsolódik, előnyösen a -2., -1., +1. vagy +2. pozícióban, mint például a -1. vagy +1. pozícióban. Ily módon egy N-glikozilációs helyhez (amelynek a szekvenciája N-X'-S/T/C-X'') közel lévő aminosav-oldallánc elhelyezkedhet a -4., -3., -2., -1. pozícióban az N oldallánchoz viszonyítva, az X' vagy X'' pozícióban (amely esetben a beépítendő aminosav-oldallánc előnyösen nem prolin), vagy a +1. pozícióban az X'' oldallánchoz viszonyítva.

Az aminosav-módosítás normális esetben szubsztitúció, amely szubsztitúciót bármilyen más olyan aminosav-oldallánccal hajtunk végre, amely az IFNB variáns megnövekedett glikozilációját eredményezi a szülői IFNB polipeptidhez viszonyítva. Az ilyen aminosav-

oldalláncot a fokozatos megközelítés („trial and error”) módszerével határozhatjuk meg (azaz a releváns pozícióban lévő aminosav-oldallánc szubsztitúciójával bármilyen más aminosav-oldallánccal, és a kapott variáns elért glikozilációjának a meghatározásával).

5 Elvileg a találmány szerint módosítandó szülői polipeptid lehet bármilyen, IFNB aktivitást mutató polipeptid, amelynek van legalább egy glikozilációs helye, előnyösen N-glikozilációs helye. Alkalmas szülői polipeptideket bemutatunk fentebb a 'Definíciók' szakaszban, és közéjük tartozhat a vad típusú IFNB, például vad típusú humán IFNB, vagy természetben nem előforduló IFNB polipeptid, például vad típusú humán IFNB variánsa vagy fragmense.

10 A szülői IFNB polipeptid tartalmazhat egynél több glikozilációs helyet, például 2-10, mint például 2-7 vagy 2-5 glikozilációs helyet. A glikozilációs hely lehet természetben előforduló glikozilációs hely, vagy lehet egy beépített glikozilációs hely, előnyösen egy N-glikozilációs hely. A vad típusú humán IFNB N80 és T82 pozícióival meghatározott N-glikozilációs hely a természetben előforduló glikozilációs hely egy példája.

15 Amikor a szülői IFNB polipeptid legalább egy beépített N-glikozilációs helyet tartalmaz, a hely előnyösen olyan pozícióban található, amely ekvivalens az 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum' vagy az 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekularész cukor-molekularész' szakaszokban leírtak bármelyikével, vagy azonos azok bármelyikével.

20 Az „ekvivalens pozíció” kifejezés alatt olyan pozíciót értünk egy adott IFNB polipeptid aminosav-szekvenciájában, amely homológ (azaz pozíciója megfelel akár az elsődleges, akár a harmadlagos szerkezetben) a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvencián bemutatott releváns pozícióval. Az „ekvivalens pozíciót” kényelmesen az IFNB fehérjeszekvencia-család egymás alá rendezésének alapján határozzuk meg, például a CLUSTALW program 25 (version 1.74) és az alapértelmezett paraméterek alkalmazásával [Thompson és mtsai., „CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice”, Nucleic Acids Research 22, 4673-4680. old. (1994)], vagy közzétett egymás alá rendezésekből.

30 Egy specifikus megvalósítási mód szerint a szülői IFNB polipeptid vad típusú humán IFNB, amely egy vagy több beépített glikozilációs helyet tartalmaz, amely hely(ek)et az 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekularész cukor-molekularész' szakaszban meghatározott szubsztitúció(k) útján építjük be. Amikor a szülői IFNB polipeptid vad típusú humán IFNB-ből származik,

zik, az normális esetben természetben előforduló glikozilációs helyet tartalmaz az N80 pozícióban.

Például, a szülői IFNB polipeptid egy beépített glikozilációs helyet tartalmaz a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciájú vad típusú humán IFNB aminosav-szekvenciájának a 2., 49., 51. vagy 111. pozíciója közül legalább eggyel ekvivalens pozícióban (amelyeket sorrendben az S2N+N4T/S, Q49N+Q51T/S, Q51N+E53T/S vagy F111N+R113T/S aminosav-szubsztitúciók határoznak meg) és/vagy egy glikozilációs helyet tartalmaz a vad típusú humán IFNB polipeptid N80+T82 pozíciójának megfelelő pozícióban. Az ilyen szülői IFNB polipeptidből előállított találmány szerinti variáns továbbá tartalmaz egy aminosav-szubsztitúciót az N-glikozilációs hely közelében elhelyezkedő pozícióban, például a 2. azonosítószámú szekvencia 1., 48., 50., 79. vagy 110. pozíciónak megfelelő, vagy azzal azonos pozícióban, és a szubsztitúció olyan aminosavval történik, amely különbözik a szülői polipeptid releváns pozícióját elfoglaló aminosav-oldallánctól, és képes megnövekedett glikozilációt eredményezni a releváns glikozilációs helyen a szülői IFNB polipeptidhez viszonyítva.

Közelebről, a találmány egy megvalósítási módja szerint a variánst olyan szülői IFNB polipeptidből állítjuk elő, amely egy, a 2. azonosítószámú szekvencia Q49N+Q51T/S szubsztitúciójával meghatározott beépített glikozilációs helyet tartalmaz, és a variáns tovább tartalmazza a 2. azonosítószámú szekvencia K45, Q46, L47, Q48, F50 vagy K52 pozícióival ekvivalens vagy azokkal azonos aminosav-oldallancok szubsztitúcióját, amely szubsztitúciók olyan aminosav-oldallancokon történik, amely megnövekedett glikozilációt eredményez a glikozilációs helyen a szülői IFNB polipeptidhez viszonyítva. Előnyösen a szubsztituálandó aminosav-oldallánc a Q48 pozícióval ekvivalens vagy azzal azonos pozícióban található.

Egy másik megvalósítási mód szerint a variánst olyan szülői IFNB polipeptidből állítjuk elő, amely egy, a 2. azonosítószámú szekvencia F111N+R113T/S szubsztitúciójával meghatározott beépített glikozilációs helyet tartalmaz, és a variáns tovább tartalmazza a 2. azonosítószámú szekvencia E107, K108, E109, D110, T112 vagy G114 pozícióival ekvivalens vagy azokkal azonos aminosav-oldallancok szubsztitúcióját, amely szubsztitúciók olyan aminosav-oldallancokon történik, amely megnövekedett glikozilációt eredményez a glikozilációs helyen a szülői IFNB polipeptidhez viszonyítva. Előnyösen a szubsztituálandó aminosav-oldallánc a D110 pozícióval ekvivalens vagy azzal azonos pozícióban található.

Egy még másik megvalósítási mód szerint a variánst olyan szülői IFNB polipeptidből állítjuk elő, amely egy, a 2. azonosítószámú szekvencia Q51N+E53T/S szubsztitúciójával meg-

határozott beépített glikozilációs helyet tartalmaz, és a variáns tovább tartalmazza a 2. azonosítószámú szekvencia L47, Q48, Q49, F50, K52 vagy D54 pozícióival ekvivalens vagy azokkal azonos aminosav-oldalláncok szubsztitúcióját, amely szubsztitúciók olyan aminosav-oldalláncokon történik, amely megnövekedett glikozilációt eredményez a glikozilációs helyen a szülői IFNB polipeptidhez viszonyítva. Előnyösen a szubsztituálandó aminosav-oldallánc a Q49 pozícióval ekvivalens vagy azzal azonos pozícióban található.

Egy még másik megvalósítási mód szerint a variánst olyan szülői IFNB polipeptidből állítjuk elő, amely egy, a 2. azonosítószámú szekvencia S2N+N4T/S szubsztitúciójával meghatározott beépített glikozilációs helyet tartalmaz, és a variáns tovább tartalmazza a 2. azonosítószámú szekvencia M1, Y3 vagy L5 pozícióival ekvivalens vagy azokkal azonos aminosav-oldalláncok szubsztitúcióját, amely szubsztitúciók olyan aminosav-oldalláncokon történik, amely megnövekedett glikozilációt eredményez a glikozilációs helyen a szülői IFNB polipeptidhez viszonyítva. Előnyösen a szubsztituálandó aminosav-oldallánc az M1 pozícióval ekvivalens vagy azzal azonos pozícióban található. A <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> internetes hely alkalmazásával igazoltuk, hogy az összes aminosav-szubsztitúció megengedett a 2. azonosítószámú szekvencia 1. pozíciójában (azaz lehetővé teszi a szignálpeptid helyes lehasítását).

Egy még másik megvalósítási mód szerint a variánst olyan szülői IFNB polipeptidből állítjuk elő, amely egy, a 2. azonosítószámú szekvencia N80. és T82 pozíciójával ekvivalens vagy azzal azonos természetben előforduló glikozilációs helyet tartalmaz, és a variáns tovább tartalmazza a 2. azonosítószámú szekvencia S76, T77, E78, W79, E81 vagy I83 pozícióival ekvivalens vagy azokkal azonos aminosav-oldalláncok szubsztitúcióját, amely szubsztitúciók olyan aminosav-oldalláncokon történik, amely megnövekedett glikozilációt eredményez a glikozilációs helyen a szülői IFNB polipeptidhez viszonyítva. Előnyösen a szubsztituálandó aminosav-oldallánc az W79 pozícióval ekvivalens vagy azzal azonos pozícióban található.

Például az ezen megvalósítási mód szerinti variáns legalább egyet tartalmaz az alábbi mutációk közül:

Q48F,V,W,Y+Q49N+Q51T/S;

D110F,V,Y+F111N+R113T/S

amely mutációk mindegyikét a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciához viszonyítva adjuk meg.

Nyilvánvaló, hogy a fent specifikusan említettektől különböző pozíciókban beépített glikozilációs helyeken történő glikoziláció (például a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi

bejelentés szerint definiált felszíni kitettségű aminosav-oldalláncok által elfoglalt pozícióban) analóg módon módosítható a fent leírtak mintájára.

Ezenfelül előnyös, ha az ezen megvalósítási mód szerint módosítandó szülői IFNB polipeptid mentes szabad cisztein oldalláncoktól, például a 2. azonosítószámú szekvencia 17. pozíciójában található cisztein oldallánctól. Amikor a szülői polipeptid vad típusú humán IFNB-ből származik, előnyösen a szülő nem cisztein aminosav-oldalláncot tartalmaz a 17. pozícióban, például a C17S mutációt, a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciához viszonyítva.

Egy még másik megvalósítási mód szerint az ezen megvalósítási mód szerint módosítandó szülői IFNB polipeptid legalább egy, második nem polipeptid molekularész kapcsolására szolgáló beépített és/vagy eltávolított aminosav-oldalláncot tartalmaz. A beépített és/vagy eltávolított aminosav-oldalláncot például az 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum', 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekularész kapcsolócsoportként lizint tartalmazó molekulát tartalmaz', 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekularész cisztein oldallánchoz kapcsolódik' vagy az 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekularész savas csoporthoz kapcsolódik' szakaszban írjuk le, és ily módon a szülői IFNB polipeptid az ezen szakaszok bármelyikében leírt konjugátum polipeptid része.

A nem polipeptid molekularész számára kapcsolócsoportot tartalmazó aminosav-oldallánc például lizin oldallánc. Egy specifikus megvalósítási mód szerint a szülői IFNB polipeptid legalább egy szubsztitúciót tartalmaz a K19, K33, K45 és K123 pozíciókkal ekvivalens vagy azokkal azonos pozícióban található aminosav-oldalláncban, ahol a lizin oldallánc előnyösen R oldallánccal van szubsztituálva.

Közelebbről a szülői IFNB polipeptid az alábbi mutáció-készletek egyikét tartalmazhatja (a 2. azonosítószámú szekvenciához viszonyítva):

C17S+Q49N+Q51T+F111N+R113T;

S2N+N4T+C17S+Q51N+E53T;

C17S+K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K129R;

C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R;

S2N+N4T+C17S+K19R+K45R+Q51N+E53T+K123R;

S2N+N4T+C17S+K19R+K33R+K45R+Q51N+E53T+K123R;

S2N+N4T+C17S+K19R+K45R+Q51N+E53T+F111N+R113T+K123R; vagy
S2N+N4T+C17S+K19R+K33R+K45R+Q51N+E53T+F111N+R113T+K123R.

Amikor a szülői IFNB polipeptid a Q49N+Q51T/S mutációt tartalmazza, az ezen megvalósítási mód szerinti variáns továbbá tartalmazza a Q48F,V,W,Y szubsztitúciót is. Amikor a szülői IFNB polipeptid az F111N+R113T/S mutációt tartalmazza, a variáns előnyösen továbbá tartalmazza a D110F,V,Y szubsztitúciót is.

Nyilvánvaló, hogy amikor a szülői IFNB polipeptid és így módon a variáns egy olyan beépített és/vagy eltávolított aminosav-oldalláncot tartalmaz, amely egy második nem polipeptid molekularész számára való kapcsolócsoporthoz tartozik, a variáns előnyösen nemcsak glikozilált, hanem konjugálva is van a második nem polipeptid molekularészhez legalább egy beépített és/vagy eltávolított kapcsolócsoporthoz keresztül. A második nem polipeptid molekularész általában nem cukor-molekularész, és normális esetben polimer, mint például PEG. Az 'A találmány szerinti konjugátum nem polipeptid molekularésze' című szakaszban alkalmas polimereket és más típusú nem polipeptid molekularészeket írunk le, amelyek alkalmazhatók második nem polipeptid molekularészként az ezen megvalósítási mód szerinti variánsok konjugálására.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya interferon-polipeptid, amelynek az aminosav-szekvenciája különbözik a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciájú vad típusú humán interferon- β -étől, és az alábbi mutáció-készletek egyikét tartalmazza:

D110F;
C17S+D110F;
C17S+Q49N+Q51T;
C17S+F111N+R113T;
C17S+Q49N+Q51T+F111N+R113T;
D110F+F111N+R113T;
C17S+D110F+F111N+R113T;
C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T;
C17S+K19R;
C17S+K33R;
C17S+K45R;
C17S+K19R+K33R+K45R; vagy
C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T,

és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG molekulát tartalmaz.

Ezen mutáció-készletek mindegyikét egy egyedi megvalósítási módnak tekinthetjük, és egy igénypont tárgyát képezhetik.

5 Egy specifikus megvalósítási mód szerint a találmány tárgya interferon- β polipeptid, amelynek az aminosav-szekvenciája az alábbi:

MSYNLLGFLQ RSSNFQSQKL LWQLNGRLEY CLKDRMNFDI PEEIKQLQNF
TKEDAALTIY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN ETIVENLLAN VYHQINHLKT
VLEEKLEKEF NTTGKLMSSL HLKRYYYGRIL HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI
10 LRNFYFINRL TGYLRN,

és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG molekulát tartalmaz.

Egy másik specifikus megvalósítási mód szerint a találmány tárgya interferon- β polipeptid, amelynek az aminosav-szekvenciája az alábbi:

15 MSYNLLGFLQ RSSNFQSQRL LWQLNGRLEY CLRDRMNFDI PEEIRQLQNF
TKEDAALTIY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN ETIVENLLAN VYHQINHLKT
VLEEKLEKEF NTTGKLMSSL HLKRYYYGRIL HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI
LRNFYFINRL TGYLRN,

és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG molekulát tartalmaz.

20 Egy további megvalósítási mód szerint az interferon- β polipeptid továbbá PEG-molekulát tartalmaz, előnyösen 12 kDa vagy 20 kDa PEG-et, például 20 kDa mono-PEG-et. Amikor az interferon- β molekula PEG-ilált, az általában 1-5 polietilén-glikol (PEG) molekulát tartalmaz. Egy további megvalósítási mód szerint az interferon-molekula 1-5 PEG-molekulát tartalmaz, mint például 1, 2 vagy 3 PEG-molekulát. Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 5 kDa és 100 kDa közötti. Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 10 kDa és 40 kDa közötti. Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 12 kDa. Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 20 kDa. Előnyösen az interferon-molekula 1-3 PEG-molekulát tartalmaz, amelyek mindegyikének a molekulatömege körülbelül 12 kDa, vagy 1 PEG-molekulát tartalmaz, amelynek a molekulatömege körülbelül 20 kDa. Alkalmas PEG-molekulák beszerezhetők a Shearwater Polymers, Inc. és Enzon, Inc. cégektől, és például az

alábbiak lehetnek: SS-PEG, NPC-PEG, aldehid-PEG, mPEG-SPA, mPEG-SCM, mPEG-BTC, SC-PEG, trezilált mPEG (5 880 255. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat) vagy oxikarbonil-oxi-N-dikarboxiimid-PEG (5 122 614. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat).

5 Egy még további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás legalább egy *in vivo* glikozilációs helyet tartalmazó szülői IFNB polipeptid *in vivo* glikozilációjának növelésére, amely szerint

i) a szülői IFNB polipeptid *in vivo* glikozilációs helyének közelében elhelyezkedő első pozíciót elfoglaló aminosav-oldalláncot szubsztituálunk egy második aminosav-oldallánccal variáns IFNB polipeptidet előállítva;

ii) mérjük a variáns glikozilációjának mértékét a szülői IFNB polipeptidéhez viszonyítva, összehasonlítható körülmények között glikoziláló gazdasejtben történő expresszió vizsgálatával,

15 iii) szükség esetén megismételjük az i) lépést a második aminosavnak egy harmadik aminosavval történő helyettesítésére és/vagy a glikozilációs hely közelében elhelyezkedő második pozíciót elfoglaló aminosav-oldalláncnak egy második aminosav-oldallánccal történő szubsztitúciójára, és megismételjük az ii) lépést akár a szülői polipeptiden, akár az i) lépésben előállított variáns polipeptiden, és az i-iii) lépéseket addig ismételjük, amíg megnövekedett *in vivo* glikozilációt nem kapunk.

20 A szülői polipeptid tartalmazhat természetben előforduló vagy természetben nem előforduló glikozilációs helyet, és például fent definiált szülői polipeptid lehet. A glikozilációs hely közelében elhelyezkedő aminosav-oldallánc például a jelen szakaszban azonosítottak bármelyike.

25 Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya IFNB polipeptid glikozilált variánsa, amelynek az aminosav-szekvenciája különbözik a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciájú vad típusú humán interferon- β -étől, és az alábbi mutáció-készletek egyikét tartalmazza:

D110F;

C17S+D110F;

30 C17S+Q49N+Q51T;

C17S+F111N+R113T;

C17S+Q49N+Q51T+F111N+R113T;

D110F+F111N+R113T;

C17S+D110F+F111N+R113T;

C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T;

C17S+K19R;

C17S+K33R;

5 C17S+K45R;

C17S+K19R+K33R+K45R; vagy

C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T,

és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG molekulát tartalmaz.

10 Ezen mutáció-készletek mindegyikét egy egyedi megvalósítási módnak tekinthetjük, és egy igénypont tárgyát képezhetik.

Egy specifikus megvalósítási mód szerint a találmány tárgya az alábbi aminosav-szekvenciájú interferon polipeptid glikozilált variánsa:

15 MSYNLLGFLQ RSSNFQSQKL LWQLNGRLEY CLKDRMNFDI PEEIKQLQNF
TKEDAALTIY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN ETIVENLLAN VYHQINHLKT
VLEEKLEKEF NTTGKLMSSL HLKRYYYGRIL HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI
LRNFYFINRL TGYLRN,

és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG molekulát tartalmaz.

20 Egy másik specifikus megvalósítási mód szerint a találmány tárgya az alábbi aminosav-szekvenciájú ai polipeptid glikozilációs variánsa:

MSYNLLGFLQ RSSNFQSQRL LWQLNGRLEY CLRDRMNFDI PEEIRQLQNF
TKEDAALTIY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN ETIVENLLAN VYHQINHLKT
VLEEKLEKEF NTTGKLMSSL HLKRYYYGRIL HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI
25 LRNFYFINRL TGYLRN,

és adott esetben egy vagy több polimert, például egy vagy több PEG molekulát tartalmaz.

Egy megvalósítási mód szerint az IFNB-molekula glikozilált és PEG-ilált. Egy további megvalósítási mód szerint az IFNB-molekula glikozilált.

30 Egy további megvalósítási mód szerint a glikozilált interferon-β polipeptid 1-5 cukor-molekularészt tartalmaz, mint például 1-3 cukor-molekularészt. Amikor az interferon-molekula glikozilált, előnyösen N-glikozilált. Amikor az interferon-molekula glikozilált, általában 1-5 cukor-molekularészt tartalmaz, mint például 1-3 cukor-molekularészt. Egy további megvalósi-

tási mód szerint az interferon-molekula N-glikozilált, és 1-5 cukor-molekularészt tartalmaz, mint például 1-3 cukor-molekularészt. Egy további megvalósítási mód szerint az interferon-molekula N-glikozilált, és 3 cukor-molekularészt tartalmaz. A fenti specifikus megvalósítási mód szerint az interferon- β -molekula három cukor-molekularészt tartalmaz, amelyek az N49, N80 és N111 pozícióban találhatók.

Egy további megvalósítási mód szerint a glikozilált interferon- β polipeptid továbbá PEG-molekulát tartalmaz, előnyösen 12 kDa vagy 20 kDa PEG-et, például 20 kDa mono-PEG-et. Amikor az interferon-molekula PEG-ilált, az általában 1-5 polietilén-glikol (PEG) molekulát tartalmaz. Egy további megvalósítási mód szerint az interferon-molekula 1-5 PEG-molekulát tartalmaz, mint például 1, 2 vagy 3 PEG-molekulát. Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 5 kDa és 100 kDa közötti. Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 10 kDa és 40 kDa közötti. Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 12 kDa. Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 20 kDa. Előnyösen az interferon-molekula 1-3 PEG-molekulát tartalmaz, amelyek mindegyikének a molekulatömege körülbelül 12 kDa, vagy 1 PEG-molekulát tartalmaz, amelynek a molekulatömege körülbelül 20 kDa. A fenti specifikus megvalósítási módok szerint egy előnyös megvalósítási mód szerint az interferon- β polipeptid 1-3 12 kDa PEG-molekulát tartalmaz. A fenti specifikus megvalósítási módok szerint egy előnyös megvalósítási mód szerint az interferon- β polipeptid egy 20 kDa PEG-molekulát tartalmaz. Alkalmas PEG-molekulák beszerezhetők a Shearwater Polymers, Inc. és Enzon, Inc. cégektől, és például az alábbiak lehetnek: SS-PEG, NPC-PEG, aldehyd-PEG, mPEG-SPA, mPEG-SCM, mPEG-BTC, SC-PEG, trezilált mPEG (5 880 255. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat) vagy oxikarbonil-oxi-N-dikarboxiimid-PEG (5 122 614. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat).

Az ezen megvalósítási mód szerint glikozilált variánsokat rekombináns úton expresszál-tatjuk glikoziláló gazdasejtben, előnyösen emlős gazdasejtben, mint például a 'Cukor-molekularészhez történő kapcsolás' szakaszban említettek bármelyikében.

Előnyösen az ezen megvalósítási mód szerinti variáns megtartotta a szülői IFNB polipeptid IFNB expressziós szintjének (IU/ml) legnagyobb részét vagy egészét. Azonban amikor a glikozilációs hely közelében található aminosav-oldallánc szubsztitúciójával kapott glikoziláció-növekedés nagyon magas, az expressziós szint csökkenése elfogadható lehet, mindaddig, amíg a variáns általános teljesítménye javított a szülői IFNB polipeptidéhez viszonyítva.

Nyilvánvaló, hogy az ezen megvalósítási mód szerinti variánsok normális esetben a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti konjugátumokra leírt javított tulajdonságok bármelyikével rendelkeznek, például bármelyik olyan javított tulajdonsággal, amelyet a fenti 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátumok' című szakaszban részletesebben is leírnak.

Specifikus aminosav-szubsztitúciókat tartalmazó variánsok

A találmány egy további megvalósítási módja szerint a variáns olyan, amely az L98P mutációt tartalmazza a szülői IFNB polipeptidhez, előnyösen a vad típusú humán IFNB-hez viszonyítva, amelynek az aminosav-szekvenciáját az 1. azonosítószámú szekvencián mutatjuk be.

A variáns egyedül csak az L98P mutációt tartalmazhatja, vagy további mutációkat is tartalmazhat, például azon mutációk bármelyikét, amelyeket az 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerint konjugátum ...' szöveggel kezdődő című szakaszokban vagy a 'Megnövekedett glikozilációjú variánsok' című szakaszban mutatunk be. Például a variáns tartalmazhatja az alábbi mutációkat:

Q49N+Q51T+L98P+F111N+R113T
C17S+Q49N+Q51T+L98P+F111N+R113T

További specifikus, találmány szerinti glikozilált variánsok az alábbi aminosav-szubsztitúciókat tartalmazzák (a 2. azonosítószámú szekvenciához viszonyítva):

C17S+Q49N+Q51T+F111N+R113T
S2N+N4T+C17S+Q51N+E53T;
S2N+N4T+C17S+Q51N+E53T+F111N+R113T

További specifikus, találmány szerinti glikozilált variánsok az alábbi aminosav-szubsztitúciókat tartalmazzák (a 2. azonosítószámú szekvenciához viszonyítva):

S2N+N4T+C17S+K19R+Q51N+E53T+K123R
S2N+N4T+C17S+K19R+Q51N+E53T+F111N+R113T+K123R
S2N+N4T+C17S+K19R+K45R+Q51N+E53T+F111N+R113T+K123R

Ezek a variánsok tipikusan egy második nem polipeptid molekularészhez vannak konjugálva, mint például polimerhez, például PEG-hez.

Nyilvánvaló, hogy az ezen megvalósítási mód szerinti variánsok normális esetben a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti konjugátumokra leírt javított tulajdonságok bármelyikével rendelkeznek, például bármelyik olyan javított tulajdonsággal, amelyet a fenti 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátumok' című szakaszban részletesebben is leírnak.

Variánsok, amelyek fúziós fehérjék

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya variáns IFNB polipeptid, amely fúziós fehérje, amely a) IFNB polipeptidet és b) humán szérumalbumin polipeptidet (HSA) tartalmaz. A variáns IFNB polipeptid például a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentésben leírt konjugátum polipeptid része, vagy találmány szerinti glikozilált variáns. A HSA például vad típusú humán szérumalbumin, vagy annak egy fragmense vagy variánsa, például a WO 97/24445. számú nemzetközi közzétételi iratban feltárt humán szérumalbumin fragmensek bármelyike. Humán szérumalbuminhoz való fúziót leírnak a WO 93/15199., WO 93/15200. számú nemzetközi közzétételi iratokban és az EP 413 622. számú európai szabadalmi iratban is.

A fúziós fehérje IFNB polipeptid és humán szérumalbumin része közvetlenül lehet összekapcsolva, vagy kapcsolópeptiden keresztül lehet összekapcsolva, például amint a WO 97/24445. számú nemzetközi közzétételi irat feltárja. A HSA az IFNB polipeptid C-terminális végéhez lehet kapcsolva, vagy az N-terminális végéhez, adott esetben kapcsolópeptiden keresztül.

A találmány tárgykörébe tartozik, hogy az IFNB polipeptidnek és humán szérumalbuminnak vagy variánsának vagy fragmensének fúziója a kapott fúziós fehérje általánosan megnövekedett stabilitását eredményezi.

Nyilvánvaló, hogy az ezen megvalósítási mód szerinti variánsok normális esetben a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti konjugátumokra leírt javított tulajdonságok bármelyikével rendelkeznek, például bármelyik olyan javított tulajdonsággal, amelyet a fenti 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátumok' című szakaszban részletesebben is leírnak.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés feltárásának a részei

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány első megvalósítási módjának a tárgya IFNB aktivitást mutató konjugátum, amely legalább egy nem polipeptid molekularészt tartalmaz kovalensen kapcsolva IFNB polipeptidhez, és amelynek az aminosav-szekvenciája különbözik a vad típusú humán IFNB-től legalább egy beépített és legalább egy eltávolított aminosav-oldalláncban, amely a nem polipeptid molekularész számára kapcsolócsoportot tartalmaz.

A nem polipeptid molekularész számára kapcsolócsoporthoz hordozó aminosav-oldallán-
 cok eltávolításával és/vagy beépítésével lehetséges specifikusan adaptálni a polipeptidet oly
 módon, hogy érzékenyebb legyen a választott nem polipeptid molekularész konjugálására, a
 konjugációs mintázat optimalizálására (például a nem polipeptid molekularészek optimális el-
 5 oszlatására az IFNB-molekula felszínén és ezáltal például hatékonyan elfedni a polipeptid
 építőpajait és egyéb felszíni részeit azok funkciójának szignifikáns zavarása nélkül). Például
 kapcsolócsoporthoz beépítésével az IFNB polipeptidet erősítjük vagy másképpen megváltoz-
 tatjuk azon specifikus aminosav-oldalláncai összetételében, amelyek relevánsak a nem
 polipeptid molekularész kötésében, ezáltal hatékonyabb, specifikusabb és/vagy kiterjedtebb
 10 konjugációt érünk el. Egy vagy több kapcsolócsoporthoz eltávolításával lehetséges a nem polipep-
 tid molekularész konjugációjának elkerülése a polipeptid olyan részeihez, amelyeken a konju-
 gáció előnytelen, például a polipeptid funkciós helyének közelében található aminosav-oldallán-
 cokhoz (mivel a konjugáció az ilyen helyeken a keletkezett konjugátum inaktiválását vagy
 csökkent IFNB aktivitását eredményezheti a zavart receptor-felismerés miatt). Ezenfelül elő-
 15 nyös lehet eltávolítani másik kapcsolócsoporthoz közelében lévő kapcsolócsoporthoz annak ér-
 dekében, hogy elkerüljük az ilyen csoportokhoz történő heterogén konjugációt.

Nyilvánvaló, hogy a nem polipeptid molekularész számára kapcsolócsoporthoz tartalma-
 zó aminosav-oldallánccal — akár eltávolítjuk, akár beépítjük — a nem polipeptid molekularész
 természete alapján választjuk ki, és a legtöbb esetben az alkalmazandó konjugációs eljárás
 20 alapján. Például amikor a nem polipeptid molekularész polimer molekula, mint például polieti-
 lén-glikol vagy polialkilén-oxid eredetű molekula, a kapcsolócsoporthoz alkalmas aminosav-
 oldallánccal a lizin, cisztein, aszparaginsav, glutaminsav és arginin alkotta csoportból választ-
 hatjuk ki. Amikor a nem polipeptid molekularész cukor-molekularész, a kapcsolócsoporthoz egy
in vivo glikozilációs hely, előnyösen N-glikozilációs hely.

25 Amikor nem polipeptid molekularész számára való kapcsolócsoporthoz építünk be vagy
 akár eltávolítunk a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti
 IFNB polipeptidbe, az IFNB polipeptid módosítandó pozícióját az alábbiak szerint választjuk
 ki:

30 A pozíció előnyösen az IFNB polipeptid felszínén helyezkedik el, és előnyösebben
 olyan aminosav foglalja el, amelynek az oldallánca több mint 25%-ban érintkezik az oldószer-
 rel, előnyösen az oldallánca több mint 50%-a érintkezik az oldószerrel. Ilyen pozíciókat a hu-
 mán IFNB molekula háromdimenziós szerkezetének az elemzése alapján azonosíthatunk,
 amint azt leírjuk az 'Anyagok és eljárások' szakaszban.

Más megoldásképpen vagy ezenfelül, a módosítandó pozíciót IFNB fehérjeszekvencia-család elemzése alapján azonosítjuk. Közelebbről, a módosítandó pozíció olyan lehet, amelyet a család szülői IFNB-től eltérő tagjaiban olyan aminosav-oldallánc foglal el, amely releváns kapcsolócsoporthoz tartozik (amikor ilyen aminosav-oldalláncot akarunk beépíteni), vagy
5 amely a szülői IFNB-ben igen, de a család többi tagjában nem olyan aminosav-oldallánc foglal el, amely releváns kapcsolócsoporthoz tartozik (amikor ilyen aminosav-oldalláncot akarunk eltávolítani).

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a kapcsolócsoporthoz optimális eloszlását, az IFNB molekula felszínén elhelyezkedő aminosav-oldalláncok közötti távolságot az IFNB polipeptid háromdimenziós szerkezete alapján számítjuk ki. Közelebbről, meghatározzuk az
10 ilyen kapcsolócsoporthoz tartozó aminosav-oldalláncok CB-i közötti távolságot, vagy egy aminosav-oldallánc funkcionális csoportja (NZ lizin esetében, CG aszparaginsav esetében, CD glutaminsav esetében, SG cisztein esetében) és egy másik, kapcsolócsoporthoz tartozó aminosav-oldallánc CB-je közötti távolságot. Glicin esetében a CB helyett a CA-t alkalmazzuk. A
15 PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum IFNB-polipeptid részében bármely ilyen távolság előnyösen több mint 0,8 nm, előnyösebben több mint 1,0 nm, annak érdekében, hogy elkerüljük vagy csökkentjük a heterogén konjugációt.

Ezenfelül a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum IFNB-polipeptid részében a IFNB receptorkötő helyének közelében található kap-
20 csolócsoporthoz tartozó aminosav-oldalláncok szubsztitúciójával.

Egy még további, IFNB polipeptid módosítására általánosan alkalmazható megközelítési mód a szülői IFNB-n jelen lévő epitóp lefedése, és ezáltal annak tönkrététele vagy más módon történő inaktiválása, egy nem polipeptid molekuláris konjugálásával. A humán IFNB
25 epitópjait a szakterületen ismert eljárások alkalmazásával azonosíthatjuk, amit epitóptérképezésnek is neveznek [lásd például Romagnoli és mtsai., J. Biol. Chem. 380, 553-559. old. (1999); DeLisser, H.M., Methods Mol. Biol. 96, 11-20. old. (1999); Van de Water és mtsai., Clin. Immunol. Immunopathol. 85, 229-235. old. (1997); Saint-Remy, J.M., Toxicology 119, 77-81. old. (1997) és Lane, D.P. és Stephen, C.W., Curr. Opin. Immunol. 5, 268-271.
30 old. (1993)]. Egy eljárás fágprezentációs könyvtár létrehozása, amely például 9 aminosav-oldallánc hosszúságú véletlenszerű oligopeptideket expresszál. Humán IFNB elleni specifikus antiszérumokból IgG1 ellenanyagokat tisztítunk immunprecipitációval, és a reagáló fágokat immunblottolással azonosítjuk. A tisztított reagáló fágok DNS-ének a szekvenálásával megha-

- tározhatjuk az oligopeptid szekvenciáját, majd lokalizálhatjuk a szekvenciát az IFNB három-dimenziós szerkezetében. Más megoldásképpen epitópokat azonosíthatunk az 5 041 376. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban leírt eljárás szerint. Az így azonosított régió a szerkezetben egy epitópot képvisel, amelyet azután kiválaszthatunk célrégióként a nem
- 5 polipeptid molekularész számára szolgáló kapcsolócsoporthoz beépítésére. Előnyösen a humán rekombináns IFNB (amely adott esetben tartalmazza C17S mutációt) legalább egy epitópját, mint például kettő, három vagy négy epitópját fedjük el nem polipeptid molekularésszel a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerint. Ennek megfelelő egy megvalósítási mód szerint a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti ta-
- 10 lálalmány szerinti konjugátumban legalább egy lefedett epitóp van a vad típusú humán IFNB-hez — amely adott esetben tartalmazza a C17S mutációt —, vagy bármilyen kereskedelmi forgalomban kapható IFNB-hez hasonlítva. Előnyösen a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum olyan polipeptidet tartalmaz, amely úgy van módosítva, hogy a Q49 és/vagy F111 aminosav-oldallánc közelében található epitóp van lefedve.
- 15 Ezt nem polipeptid molekularész számára való kapcsolócsoporthoz beépítésével érhetjük el a Q49 és/vagy F111 közelében elhelyezkedő (azaz 4 aminosav-oldalláncon belül az elsődleges szekvenciában vagy 1 nm-en belül a harmadlagos szerkezetben) pozícióban. Az 1 nm távolságot a CB-k (glicin esetében CA-k) között mérjük. Ilyen specifikus beépítéseket bemutatunk az alábbi szakaszokban.
- 20 Kapcsolócsoporthoz eltávolítása esetében az ilyen csoportot tartalmazó, és fent meghatározott pozíciót elfoglaló releváns aminosav-oldalláncot előnyösen olyan eltérő aminosav-oldallánccal szubsztituálunk, amely nem tartalmaz a kérdéses nem polipeptid molekularész számára kapcsolócsoporthoz.
- Kapcsolócsoporthoz beépítése esetében ilyen kapcsolócsoporthoz tartalmazó aminosav-oldalláncot építünk be az adott pozícióba, előnyösen az ilyen pozíciót elfoglaló aminosav-oldallánc szubsztitúciójával.
- 25 A konjugáció számára hozzáférhető és az IFNB polipeptiden jelen lévő kapcsolócsoporthoz pontos száma az elérendő konjugáció kívánt hatásától függ. A kívánt hatás például függ a konjugáció természetétől és mértékétől (például a nem polipeptid molekularész típusától, a polipeptidhez konjugálható nem polipeptid molekularészek kívánt vagy lehetséges számától, hol kell azokat konjugálni vagy hol kell elkerülni a konjugációjukat, stb.). Például, ha csökkent immunogenitást kívánunk elérni, a kapcsolócsoporthoz száma (és elhelyezkedése) elég kell, hogy legyen a legtöbb vagy az összes epitóp lefedésére. Ezt normális esetben úgy érhetjük el,
- 30

hogy az IFNB polipeptid nagyobb részét elfedjük. Az epitópok hatékony lefedését normális esetben akkor érjük el, amikor a konjugálásra hozzáférhető kapcsolócsoporthoz összes száma 1-10 kapcsolócsoporthoz tartományban van, előnyösen a 2-8 tartományban, mint például 3-7.

5 A funkcionális *in vivo* féléletidő többek között függ a konjugátum molekulatömegétől és a megnövekedett féléletidő biztosításához szükséges kapcsolócsoporthoz számától, ily módon függ a kérdéses nem polipeptid molekularész molekulatömegétől. Egy megvalósítási mód szerint a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum molekulatömege legalább 67 kDa, előnyösen legalább 70 kDa, SDS-PAGE-val
10 mérve Laemmli eljárása szerint [Nature 227, 680-685. old. (1970)]. Az IFNB molekulatömeg körülbelül 20 kDa, és ezáltal körülbelül 50 kDa-ra van szükség a kívánt hatás eléréséhez. Ezt például 5, 10, 12 vagy 20 kDa PEG-molekulákkal érhetjük el, vagy mint ahogyan másképpen leírjuk a leírásban.

Annak érdekében, hogy elkerüljük a szülői humán IFNB molekula szerkezetének és
15 funkciójának a nagyobb mértékű megzavarását, a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerint megváltoztatandó aminosav-oldalláncok összes száma (a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciához viszonyítva) nem haladja meg a 15-öt. Előnyösen az IFNB polipeptid olyan aminosav-szekvenciát tartalmaz, amely 1-15 aminosav-oldalláncban különbözik a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciától, mint például 1-8 vagy 2-8 aminosav-oldalláncban, például 1-5 vagy 2-5 aminosav-oldalláncban különbözik a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciától. Ily módon normális esetben az IFNB polipeptid olyan aminosav-szekvenciát tartalmaz, amely 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 vagy 15 aminosav-oldalláncban különbözik a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciától. Előnyösen a fenti számok vagy a beépített
20 aminosavak összes számát, vagy az eltávolított aminosavak összes számát jelentik, amelyek a releváns nem polipeptid molekularész számára kapcsolócsoporthoz tartalmazzanak, vagy az ilyen csoportot tartalmazó beépített vagy eltávolított aminosav-oldalláncok összes számát jelentik.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátumban előnyös, ha a konjugálható kapcsolócsoporthoz legalább körülbelül 50%-a, mint például
30 legalább körülbelül 80%-a, és előnyösen az összes ilyen csoport el van foglalva a releváns nem polipeptid molekularész által. Ennek megfelelően egy előnyös megvalósítási mód szerint a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum például 1-10, mint például 2-8 vagy 3-6 nem polipeptid molekularészt tartalmaz.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátumnak az alábbiak közül egy vagy több javított tulajdonsága van (összehasonlítható körülmények között meghatározva):

5 csökkent immunogenitás a vad típusú humán IFNB-hez (például Avonex vagy Rebif) vagy Betaseron-hoz viszonyítva, például legalább 25%-os, mint például legalább 50%-os, és előnyösebben legalább 75%-os csökkenés;

megnövekedett funkcionális *in vivo* féléletidő és/vagy megnövekedett szérum féléletidő a vad típusú humán IFNB-hez (például Avonex vagy Rebif) vagy Betaseron-hoz viszonyítva;

10 csökkent vagy semmilyen reakció vad típusú humán IFNB-vel (például Avonex vagy Rebif) vagy Betaseron-nal kezelt páciensekből származó semlegesítő ellenanyagokkal, például a semlegesítés legalább 25%-os, mint például legalább 50%-os, és előnyösebben legalább 75%-os csökkenése;

15 A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum antivirális aktivitásának a nagyságrendje nem kritikus, és ily módon csökkent lehet (például akár 75%-kal) vagy megnövekedett lehet (például legalább 5%-kal) a vad típusú humán IFNB-hez (például Avonex vagy Rebif) vagy Betaseron-hoz viszonyítva, összehasonlítható körülmények között meghatározva.

20 Ezenfelül az antivirális aktivitás mértéke a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum anntiproliferatív aktivitásához viszonyítva változhat, és ily módon lehet magasabb, alacsonyabb vagy azonos, mint a vad típusú humán IFNB-é.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekularész olyan molekula, amelynek lizin a kapcsolócsoportja

25 A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az első nem polipeptid molekularésznek lizin a kapcsolócsoportja, és ily módon az IFNB polipeptid olyan, amely olyan aminosav-szekvenciát tartalmaz, amely különbözik a vad típusú humán IFNB-től legalább egy beépített és/vagy legalább egy eltávolított lizinben. Míg a nem polipeptid molekularész bármilyen olyan lehet, amely kötődik lizin oldallánchoz, például annak ϵ -amino csoportjához, mint például polimer molekula, lipofil csoport, 30 szerves derivatizáló ágens vagy szénhidrát molekularész, az előnyösen a 'Konjugáció polimer molekulákhoz' szakaszban említett polimer molekulák bármelyike, előnyösen elágazó vagy lineáris PEG vagy polialkilén-oxid. Legelőnyösebben a polimer molekula PEG, és a konjugálásra alkalmazandó aktivált molekula az alábbiak bármelyike: SS-PEG, NPC-PEG, aldehid-PEG,

mPEG-SPA, mPEG-SCM, mPEG-BTC a Shearwater Polymers, Inc. cégtől, SC-PEG az Enzon, Inc. cégtől, trezilált mPEG (5 880 255. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat) vagy oxikarbonil-oxi-N-dikarboxiimid-PEG (5 122 614. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat). Normális esetben a lizin oldallánchoz történő konjugálás esetén a

5 nem polipeptid molekularész molekulatömege körülbelül 5, 10, 12 vagy 20 kDa.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány egy megvalósítási módja szerint az IFNB polipeptid aminosav-szekvenciája különbözik a humán vad típusú IFNB aminosav-szekvenciájától legalább egy eltávolított lizin oldallánccban, előnyösen 1-4 vagy 1-3 eltávolított lizin oldallánccban. Az — előnyösen helyettesítéssel — eltávolítandó lizin oldallánc

10 az alábbiak bármelyike: K19, K33, K45, K52, K99, K105, K108, K115, K123, K134 vagy K136. A lizin oldallánco(ka)t helyettesíthetjük bármilyen más aminosav-oldallánccal, de előnyösen arginin vagy glutamin oldallánccal helyettesítjük annak érdekében, hogy a legkisebb szerkezeti különbséget eredményezze. Közelebbről a polipeptid rész olyan lehet, amelyben a

15 K19, K45, K52 és/vagy K123, előnyösen a K19, K45 és/vagy K123 helyettesítve van/lett bármilyen más aminosav-oldallánccal, előnyösen argininnel vagy glutaminnal. Például a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum IFNB polipeptid része az alábbi listából választott aminosav-szubsztitúciók kombinációját tartalmazza:

- K19R+K45R+K123R;
- 20 K19Q+K45R+K123R;
- K19R+K45Q+K123R;
- K19R+K45R+K123Q;
- K19Q+K45Q+K123R;
- K19R+K45Q+K123Q;
- 25 K19Q+K45R+K123Q;
- K19Q+K45Q+K123Q;
- K45R+K123R;
- K45Q+K123R;
- K45Q+K123Q;
- 30 K45R+K123Q;
- K19R+K123R;
- K19Q+K123R;
- K19R+K123Q;

K19Q+K123Q;

K19R+K45R;

K19Q+K45R;

K19R+K45Q; vagy

5 K19Q+K45Q.

Ezenfelül vagy más megoldásképpen a fenti listában említett aminosav-szubsztitúciók mellett a polipeptid rész legalább egy szubsztitúciót tartalmazhat az alábbiak közül: K33R, K33Q, K52R, K52Q, K99R, K99Q, K105R, K105Q, K108R, K108Q, K115R, K115Q, K134R, K134Q, K136R vagy K136Q, például legalább egyet az alábbi szubsztitúciók közül:

10 K52R+K134R;

K99R+K136R;

K33R+K105R+K136R;

K52R+K108R+K134R;

K99R+K115R+K136R;

15 K19R+K33R+K45R+K123R;

K19R+K45R+K52R+K123R;

K19R+K33R+K45R+K52R+K123R; vagy

K19R+K45R+K52R+K99R+K123R.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány egy további megvalósítási módja szerint az IFNB polipeptid aminosav-szekvenciája különbözik a 2. azonosító-számú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciától annyiban, hogy a lizin oldalláncot legalább egy olyan aminosav-oldallánc szubsztitúciójával építettük be, amely a szülői IFNB molekulában felszíni kitettségű aminosav-oldallánc által elfoglalt pozíciót foglal el, előnyösen olyan aminosav-oldallánc által elfoglalt pozíciót, amelynek az oldalláncának legalább 25%-a, mint például

25 legalább 50%-a felszíni kitettségű. Előnyösen a szubsztituálandó aminosav-oldallánc a 2. azonosító-számú szekvencia N4, F8, L9, R11, S12, F15, Q16, Q18, L20, W22, Q23, G26, R27, L28, E29, Y30, L32, R35, M36, N37, D39, P41, E42, E43, L47, Q48, Q49, T58, Q64, N65, F67, A68, R71, Q72, D73, S75, S76, G78, N80, E81, 183, E85, N86, A89, N90, Y92, H93, H97, T100, L102, E103, L106, E107, E109, D110, F111, R113, G114, L116, M117, L120,

30 H121, R124, G127, R128, L130, H131, E137, Y138, H140, I145, R147, V148, E149, R152, Y155, F156, N158, R159, G162, Y163, R165 vagy N166 aminosavának bármelyike.

Előnyösebben, az IFNB polipeptid aminosav-szekvenciája annyiban különbözik a 2. azonosító-számú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciától, hogy egy lizin oldallánc lett —

szubsztitúcióval — beépítve az alábbi pozíciók bármelyikét elfoglaló legalább egy aminosav-oldallánc helyére: N4, F8, L9, R11, S12, G26, R27, E29, R35, N37, D39, E42, L47, Q48, Q49, A68, R71, Q72, D73, S75, G78, N80, E85, N86, A89, Y92, H93, DI 10, F111, R113, L116, H121, R124, G127, R128, R147, V148, Y155, N158, R159, G162 vagy R165, és még
5 előnyösebben az alábbiak bármelyikének a helyére: N4, R11, G26, R27, Q48, Q49, R71, D73, S75, N80, E85, A89, Y92, H93, F111, R113, L116, R124, G127, R128, Y155, N158 vagy G162, és legelőnyösebben az alábbiak bármelyikének a helyére: R11, Q49, R71, S75, N80, E85, A89, H93, F111, R113, L116 vagy Y155, és legelőnyösebben Q49 vagy F111.

10 A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány ezen megvalósítási módja szerint az IFNB polipeptid lizinre történő szubsztitúciót tartalmaz a fenti pozíciók közül egyben vagy többen, előnyösen 1-15, mint például 1-8 vagy 1-5 pozícióban, és előnyösebben legalább két pozícióban, mint például 2-8 vagy 2-5 pozícióban.

15 A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány egy további megvalósítási módja szerint a konjugátum IFNB polipeptid része legalább egy eltávolított és legalább egy beépített lizin oldalláncban különbözik, mint például 1-5 vagy 2-5 eltávolított lizin oldalláncban és 1-5 vagy 2-5 beépített lizin oldalláncban. Nyilvánvaló, hogy az eltávolítandó és beépítendő lizin oldalláncokat előnyösen az ebben a szakaszban feltártak közül választjuk ki.

20 A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány ezen megvalósítási módja szerint a konjugálható lizin oldalláncok összes száma előnyösen az 1-10 tartományban van, mint például 2-8 vagy 3-7.

Például a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány ezen megvalósítási módja szerinti konjugátum IFNB polipeptid része az alábbi szubsztitúciók legalább egyikét tartalmazhatja: R11K, Q48K, Q49K, R71K, S75K, N80K, E85K, A89K, H93K, F111K, R113K, L116K vagy Y155K; előnyösebben R11K, Q49K, R71K, S75K, N80K, E85K, A89K, H93K, F111K, R113K, L116K vagy Y155K, kombinálva az alábbi szubsztitúciók legalább egyikével: K19R/Q K33R/Q K45R/Q, K52R/Q, K99R/Q, K105R/Q, K108R/Q, K115R/Q, K123R/Q, K134R/Q vagy K136R/Q, ahol R/Q jelentése szubsztitúció R vagy Q oldalláncra, előnyösen R oldalláncra. Előnyösebben az IFNB polipeptid legalább egyet tartalmaz az alábbi szubsztitúciók közül: R11K, Q49K, R71K, S75K, N80K, E85K, A89K, H93K, F111K, R113K, L116K vagy Y155K, előnyösen Q49K, F111K és/vagy N80K, kombinálva a K19, K45, K52 és/vagy K123 legalább egyikének szubsztitúciójával előnyösen R vagy Q oldalláncra. Közelebbről az IFNB polipeptid Q49K, F111K vagy N80K szubsztitúciók legalább

együkét tartalmazza, kombinálva a lizin oldallánc eltávolítására fent említett szubsztitúciók legalább egyikével. Például az IFNB polipeptid tartalmazhatja az alábbi szubsztitúciókat:

- Y+Z+K19R+K45R+K123R;
- Y+Z+K19Q+K45R+K123R;
- 5 Y+Z+K19R+K45Q+K123R;
- Y+Z+K19R+K45R+K123Q;
- Y+Z+K19Q+K45Q+K123R;
- Y+Z+K19R+K45Q+K123Q;
- Y+Z+K19Q+K45R+K123Q;
- 10 Y+Z+K19Q+K45Q+K123Q;
- Y+Z+K45R+K123R;
- Y+Z+K45Q+K123R;
- Y+Z+K45Q+K123Q;
- Y+Z+K45R+K123Q;
- 15 Y+Z+K19R+K123R;
- Y+Z+K19Q+K123R;
- Y+Z+K19R+K123Q;
- Y+Z+K19Q+K123Q;
- Y+Z+K19R+K45R;
- 20 Y+Z+K19Q+K45R;
- Y+Z+K19R+K45Q; vagy
- Y+Z+K19Q+K45Q,

ahol Y jelentése a Q49K, F111K, N80K, Q49K+F111K, Q49K+N80K, F111K+N80K vagy Q49K+F111K+N80K szubsztitúciók bármelyike, és Z hiányzik vagy a legalább egy szubsztitúciót jelent az alábbiak közül: K33R, K33Q, K52R, K52Q, K99R, K99Q, K105R, K105Q, K108R, K108Q, K115R, K115Q, K134R, K134Q, K136R vagy K136Q. Előnyösen az IFNB polipeptid az Y+Z+K19R+K45Q+K123R szubsztitúciót tartalmazza, ahol Y és Z jelentése a fent megadott.

Közelebbről a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány ezen megvalósítási módja szerint az IFNB polipeptid az alábbi szubsztitúciók egyikét tartalmazhatja:

- K19R+K45R+F111K+K123R;
- K19R+K45R+Q49K+F111K+K123R;
- K19R+K45R+Q49K+K123R;

K19R+K45R+ F111K;
 K19R+K45R+Q49K+F111K;
 K19R+Q49K+K123R;
 K19R+Q49K+F111K+K123R;
 5 K45Q+F111K+K123Q;
 K45R+Q49K+K123R; vagy
 K45R+Q49K+F111K+K123R.

10 Különösen nem glikolizáló gazdában, mint például *E. coli*-ban történő expresszáltatás esetén az IFNB polipeptid tartalmazhatja a N80K vagy C17S+N80K szubsztitúciót, adott esetben kombinálva a K19R/Q; K45R/Q; K52R/Q vagy K123R/Q szubsztitúciók közül eggyel vagy többel. Az N80K szubsztitúció különös jelentőséggel bír, amikor az IFNB polipeptidet nem glikoziláló gazdasejtben expresszáltatjuk, mivel az N80 a humán IFNB elválaszthatatlan glikozilációs helyének részét képezi, és az ilyen helyen végzett konjugáció utánoszhatja a természetes glikozilációt.

15 Ezenfelül előnyös, hogy a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány ezen megvalósítási módja szerint konjugátum legalább kettő első nem polipeptid molekularészt tartalmaz, mint például 2-8 molekularészt.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekularész cisztein oldallánchoz kapcsolódik

20 Egy még további megvalósítási mód szerint a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány tárgya IFNB-aktivitást mutató konjugátum, amely legalább egy első nem polipeptid molekularészt tartalmaz, amely az IFNB polipeptid legalább egy cisztein oldalláncahoz kapcsolódik, és amelynek az aminosav-szekvenciája annyiban különbözik a vad típusú humán IFNB-étől, hogy legalább egy cisztein oldallánc lett beépítve előnyösen szubsztitúcióval egy olyan pozícióba, amelyet a szülői IFNB molekulában olyan aminosav-oldallánc foglalt el, amely a molekula felszínén található, és amely oldalláncának előnyösen legalább 25%-a, mint például legalább 50%-a a felszínen található. Például az aminosav-oldallánc a 2. azonosítószámú szekvencia F8, L9, R11, S12, F15, Q16, Q18, L20, W22, L28, L32, M36, P41, T58, Q64, N65, F67, I83, E85, N86, A89, N90, Y92, H93, H97, T100, L102, E103, L106, 25 M117, L120, H121, R124, G127, R128, L130, H131, H140, I145, R147, V148, E149, R152, 30 Y155 vagy F156 oldalláncainak bármelyike.

Ezenfelül vagy más megoldásképpen a szubsztitúciót előnyösen treonin vagy szerin oldallánc által elfoglalt pozícióban hajtjuk végre. Például ilyen pozíció az alábbiak bármelyike:

S2, S12, S13, T58, S74, S75, S76, T77, T82, T100, T112, S118, S119, S139, T144 vagy T161, előnyösebben S2, S12, S13, S74, S75, S76, T77, T82, T100, T112, S118, S119, S139 vagy T144 (felszíni kitettségű oldallánc), még előnyösebben S2, S12, S75, S76, T82, T100, S119 vagy S139 (amelyek oldalláncának legalább 25%-a felszíni kitettségű), és még előnyösebben S12, S75, T82 vagy T100 (amelyek oldalláncának legalább 50%-a felszíni kitettségű).

A fenti treonin vagy szerin szubsztitúciók közül a szerin szubsztitúciók előnyösek. Ennek megfelelően a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány még előnyösebb megvalósítási módjai szerint a pozíció az alábbiak bármelyike: S2, S12, S13, S74, S75, S76, S118, S119 vagy S139, előnyösebben S2, S12, S13, S74, S75, S76, S118, S119 vagy S139, még előnyösebben S2, S12, S75, S76, S 119 vagy S139, és még előnyösebben S12 vagy S75.

Egy megvalósítási mód szerint csak egy cisztein oldalláncot építünk be az IFNB polipeptid annak érdekében, hogy elkerüljük a diszulfid-hidak kialakulását két vagy több beépített cisztein oldallánc között. Ebben a vonatkozásban a vad típusú humán IFNB-ben megtalálható C17-et eltávolíthatjuk, előnyösen szubsztitúcióval, különösen S-el vagy A-val történő szubsztitúcióval. Egy másik megvalósítási mód szerint két vagy több cisztein oldalláncot építünk be, mint például 2-6 vagy 2-4 cisztein oldalláncot. Előnyösen a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány ezen megvalósítási módja szerinti konjugátum IFNB polipeptid része az L47C, Q48C, Q49C, D110C, F111C vagy R113C mutációt tartalmazza, előnyösen ezen mutációk közül csak egyet, adott esetben kombinálva a C17S mutációval. Az IFNB polipeptid tartalmazhatja a C17S+N80C szubsztitúciót is.

Bár A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány ezen megvalósítási módja szerinti első nem polipeptid molekularész bármilyen olyan molekula lehet, amely — az adott konjugációs eljárást alkalmazva — ciszteint tartalmaz kapcsolócsoporthoz (mint például szénhidrát molekularész, lipofil csoport vagy szerves derivatizáló ágens), előnyös, ha a nem polipeptid molekularész polimer molekula. A polimer molekula a 'Konjugálás polimer molekulához' szakaszban említett bármelyik molekula lehet, de előnyösen lineáris vagy elágazó polietilén-glikol vagy polialkán-oxid. Legelőnyösebben a polimer molekula VS-PEG. A polipeptid és a polimer közötti konjugálást bármilyen alkalmas módon elvégezhetjük, például a 'Konjugálás polimer molekulához' szakaszban leírt módon, például az említett szakaszban ismertett egylépéses eljárással vagy lépésenként. Amikor az IFNB polipeptid csak egy konjugálható cisztein oldalláncot tartalmaz, ezt előnyösen egy körülbelül 20 kDa molekulatömegű első nem polipeptid molekularészhez konjugáljuk, akár közvetlenül, akár közvetve alacsony

molekulatömegű polimeren keresztül (amint azt a WO 99/55377. számú nemzetközi közzételti irat feltárja). Amikor a konjugátum két vagy több első nem polipeptid molekularészt tartalmaz, normális esetben ezek mindegyikének 5 vagy 10 kDa a molekulatömege.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugá-
5 tum, amelyben a nem polipeptid molekularész savas csoporthoz kapcsolódik

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány egy még további előnyös megvalósítási módja szerint a találmány tárgya IFNB aktivitást mutató konjugátum, amely legalább egy, savas kapcsolócsoportot tartalmazó első nem polipeptid molekularészt tartalmaz, amely molekularész az IFNB polipeptid legalább egy aszparaginsav vagy glutaminsav oldalláncához van konjugálva, és amelynek az aminosav-szekvenciája sorrendben legalább egy beépített és/vagy eltávolított aszparaginsav vagy glutaminsav oldalláncban különbözik a vad típusú humán IFNB-étől. A releváns aminosav-oldalláncot bármilyen felszíni kitettségű aminosav-oldallánc által elfoglalt pozícióba beépíthetjük, előnyösen olyan aminosavéba, amely oldalláncának legalább 25%-a felszíni kitettségű. Előnyösen az alábbi pozíciók bármelyikét elfoglaló legalább egy aminosav-oldallánc lett szubsztituálva aszparaginsav oldallánccal vagy glutaminsav oldallánccal: N4, L5, L6, F8, L9, Q10, R11, S12, S13, F15, Q16, Q18, K19, L20, W22, Q23, L24, N25, G26, R27, Y30, M36, Q46, Q48, Q49, I66, F67, A68, I69, F70, R71, S75, T82, I83, L87, A89, N90, V91, Y92, H93, Q94, I95, N96, H97, K108, F111, L116, L120, K123, R124, Y126, G127, R128, L130, H131, Y132, K134, A135, H140, T144, R147, Y155, F156, N158, R159, G162, Y163 vagy R165.

Előnyösebben a pozíció az alábbiak bármelyike: N4, L5, F8, L9, R11, S12, F15, Q16, Q18, K19, W22, Q23, G26, R27, Y30, M36, Q46, Q48, Q49, A68, R71, S75, T82, A89, N90, Y92, H93, N96, H97, K108, F111, L116, L120, K123, R124, G127, R128, L130, H131, K134, A135, H140, Y155, N158, R159, G162, Y163 vagy R165, mint például N4, L5, F8, S12, F15, Q16, K19, W22, Q23, R27, Y30, M36, Q46, Q48, Q49, R71, S75, T82, A89, Y92, H93, K108, F111, L116, K123, R124, G127, H131, K134, A135, Y155 vagy R165, még előnyösebben N4, L5, F8, S12, F15, Q16, K19, W22, Q23, R27, Y30, Q46, Q48, Q49, S75, T82, A89, Y92, H93, K108, F111, L116, R124, G127, H131, K134, Y155 vagy R165, mint például L5, F8, S12, F15, Q16, K19, W22, Q23, Q48, Q49, Y92, H93, R124, G127, H131 vagy Y155, még előnyösebben S12, Q16, K19, Q23, Q48, Q49, Y92, H93, R124, G127, H131 vagy Y155, mint például S12, Q16, K19, Q23, Q48, Y92, H93, R124, G127, H131 vagy Y155, különösen S12, Q16, K19, Q23, Q48, H93 vagy H131, még előnyösebben S12, Q16, K19, Q48, H93 vagy H131, és legelőnyösebben Q16 vagy Q48.



Ezenfelül annak érdekében, hogy elegendő számú nem polipeptid molekularészt érjünk el, előnyös, ha legalább két aszparaginsav oldalláncot, vagy legalább két glutaminsav oldalláncot építünk be, előnyösen bármelyik fenti lista két pozíciójába. Ezenfelül előnyös, hogy a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány ezen megvalósítási módja szerinti konjugátum legalább kettő első nem polipeptid molekularészt tartalmaz.

Egy aminosav-oldallánc eltávolítása esetében az IFNB polipeptid aminosav-szekvenciája különbözik a humán vad típusú IFNB-étől legalább egy eltávolított aszparaginsav vagy glutaminsav oldalláncban, mint például 1-5 eltávolított oldalláncban, közelebből 1-4 vagy 1-3 eltávolított aszparaginsav vagy glutaminsav oldalláncban. Az — előnyösen helyettesítéssel — eltávolítandó oldallánc(ok) az alábbiak bármelyike: D34, D39, D54, D73, D110, E29, E42, E43, E53, E61, E81, E85, E103, E104, E107, E109, E137 vagy E149. Az aszparaginsav vagy glutaminsav oldallánc(ka)t helyettesíthetjük bármilyen másik aminosav-oldallánccal, de előnyösen arginin vagy glutamin oldallánccal helyettesítjük azokat. Bár az első nem polipeptid molekularész lehet bármilyen ilyen tulajdonságú nem polipeptid molekularész, jelenleg előnyös, ha a nem polipeptid molekularész polimer molekula vagy szerves derivatizáló ágens, amely kapcsolócsoporthoz tartozó savas csoportot tartalmaz, különösen olyan polimer molekula, mint például a PEG, és a konjugátumot például a Sakane és Pardridge által leírt módon állítjuk elő [Pharmceutical Research 14, 1085-1091. old. (1997)]. Normális esetben a savas csoporthoz történő konjugálás esetén a nem polipeptid molekularész molekulatömege körülbelül 5 vagy 10 kDa.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amely egy második nem polipeptid molekularészt tartalmaz

Az első nem polipeptid molekularész mellett (amint azt a megelőző szakaszokban leírtuk) a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum tartalmazhat egy második, az első nem polipeptid molekularésztől különböző típusú nem polipeptid molekularészt is. Előnyösen azokban a fent leírt konjugátumokban, amelyekben az első nem polipeptid molekularész például polimer molekula, mint például PEG, a második nem polipeptid molekularész cukor-molekularész, előnyösen N-kapcsolt cukor-molekularész. Míg a második nem polipeptid molekularészt a humán IFNB természetben előforduló glikozilációs helyéhez kapcsolhatjuk, például az N80 által meghatározott N-kapcsolt glikozilációs helyhez, normális esetben előnyös, ha legalább egy további glikozilációs helyet is beépítünk az IFNB polipeptidbe. Ilyen hely például a közvetlenül következő, 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekula-

rész cukor-molekularész' szakaszban leírt bármelyik hely. Ezenfelül ha esetlegesen legalább egy további glikozilációs helyet is beépítünk, ezt kísérheti egy már meglévő glikozilációs hely eltávolítása, amint alább leírjuk.

5 Nyilvánvaló, hogy a kapcsolt első és második nem polipeptid molekularesz optimális eloszlása érdekében az IFNB polipeptidet módosíthatjuk az első, valamint a második nem polipeptid molekularesz kapcsolócsoporthai számának és eloszlásának tekintetében, oly módon például, hogy az első nem polipeptid molekularesz legalább egy kapcsolócsoporthát eltávolítjuk és a második nem polipeptid molekularesz legalább egy kapcsolócsoporthát beépítjük, vagy fordítva. Például az IFNB polipeptid tartalmazza az első nem polipeptid molekularesz legalább
10 kettő (például 2-5) eltávolított kapcsolócsoporthát, és a második nem polipeptid molekularesz legalább egy (például 1-5) beépített kapcsolócsoporthát, vagy fordítva.

Különös jelentőséggel bír az olyan konjugátum, amelyben az első nem polipeptid molekularesz polimer molekula, mint például PEG, amelynek lizin a kapcsolócsoportha, és a második nem polipeptid molekularesz N-kapcsolt cukor-molekularesz.

15 Közelebbről a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum lehet IFNB aktivitású, és tartalmazhat legalább egy polimer molekulát, előnyösen PEG-et, és legalább egy cukor-molekulareszt, kovalensen kapcsolva IFNB polipeptidhez, amelynek az aminosav-szekvenciája az alábbiakban különbözik a vad típusú humán IFNB-étől:

20 a) legalább egy beépített és/vagy legalább egy eltávolított aminosav-oldallánc, amely a polimer molekula kapcsolócsoporthát tartalmazza; és

b) legalább egy beépített és/vagy legalább egy eltávolított *in vivo* glikozilációs hely, előnyösen N-kapcsolt glikozilációs hely.

Egy specifikus megvalósítási mód szerint az IFNB polipeptid az alábbi mutáció-csoport
25 egyikét tartalmazza:

K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R;

K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T; vagy

K19R+K45R+Q49N+Q51T+K123R.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekularesz cukor-molekularesz
30

Amikor a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum legalább egy cukor-molekulareszt tartalmaz egy *in vivo* glikozilációs helyhez, előnyösen N-kapcsolt glikozilációs helyhez kapcsolva, ez vagy az IFNB természetben előforduló



glikozilációs helye az N80, E81, T82 és I83 aminosav-oldalláncoknál, vagy egy új, az IFNB polipeptidbe beépített *in vivo* glikozilációs hely. Közelebbről, a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány egy megvalósítási módjának a tárgya IFNB aktivitást mutató és IFNB polipeptidet tartalmazó konjugátum, amelynek az aminosav-szekvenciája legalább egy beépített glikozilációs helyben különbözik a vad típusú humán IFNB-étől, és amely emellett legalább egy nem PEG-ilált cukor-molekularészt tartalmaz a glikozilációs helyhez kapcsolva.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány egy másik megvalósítási módja szerint a találmány tárgya IFNB aktivitást mutató és IFNB polipeptidet tartalmazó konjugátum, amelynek az aminosav-szekvenciája annyiban különbözik a vad típusú humán IFNB-étől, hogy egy glikozilációs hely lett beépítve vagy eltávolítva.

Például *in vivo* glikozilációs helyet építünk be a szülői IFNB molekula olyan pozíciójába, amelyet a molekula felszínén található aminosav-oldallánc foglal el, előnyösen az oldalláncnak több mint 25%-a érintkezik az oldószerrel, előnyösebben több mint 50%-a érintkezik az oldószerrel (ezeket a pozíciókat a leírásban található 'Eljárások' szakaszban azonosítjuk). Az N-glikozilációs helyet oly módon építjük be, hogy a hely N-oldallánca az adott pozícióban helyezkedjen el. Analóg módon, O-glikozilációs helyet úgy építünk be, hogy az ilyen helyet alkotó S vagy T oldallánc az adott pozícióban helyezkedjen el. Ezenfelül annak érdekében, hogy hatékony glikozilációt biztosítsunk, előnyös, ha az *in vivo* glikozilációs hely — előnyösen az N-glikozilációs hely N oldallánca vagy az O-glikozilációs hely S vagy T oldallánca — az IFNB polipeptid első 141 oldalláncán belül található, előnyösebben az első 116 oldalláncon belül. Még előnyösebb módon az *in vivo* glikozilációs helyet olyan pozícióba építjük be, amelyben csak egy mutáció van szükség a hely létrehozásához (azaz ahol a működőképes glikozilációs hely létrehozásához szükséges bármilyen más aminosav-oldallánc már jelen van a molekulában).

Az alábbi szubsztitúciók tartoznak azok közé, amelyek további N-glikozilációs hely beépítéséhez vezetnek az IFNB molekula felszínén található pozíciókban, amelyek aminosav-oldalláncának több mint 25%-a felszíni kitettségű:

S2N+N4S/T, L6S/T, L5N+G7S/T, F8N+Q10S/T, L9N+R11S/T, R11N, R11N+S13T, S12N+N14S/T, F15N+C17S/T, Q16N+Q18S/T, Q18N+L20S/T, K19N+L21S/T, W22N+L24S/T, Q23N+H25S/T, G26N+L28S/T, R27N+E29S/T, L28S+Y30S/T, Y30N+L32S/T, L32N+D34S/T, K33N+R35S/T, R35N+N37S/T, M36N+F38S/T, D39S/T, D39N+P41S/T, E42N+I44S/T, Q43N+K45S/T, K45N+L47S/T, Q46N+Q48S/T,

L47N+Q49T/S, Q48N+F50S/T, Q49N+Q51S/T, Q51N+E53S/T, K52N+D54S/T, L57N+I59S/T, Q64N+I66S/T, A68N+F70S/T, R71N+D73S/T, Q72N, Q72N+S74T, D73N, D73N+S75T, S75N+T77S, S75N, S76N+G78S/T, E81N+I83S/T, T82N+V84S/T, E85N+L87S/T, L88S/T, A89N+V91S/T, Y92S/T, Y92N+Q94S/T, H93N+I95S/T, L98S/T, 5 H97N+K99S/T, K99N+V101S/T, T100N+L102S/T, E103N+K105S/T, E104N+L106S/T, K105N+E107S/T, E107N+E109S/T, K108N+D110S/T, E109N+F111S/T, D110N+T112S, D110N, F111N+R113S/T, R113N+K115S/T, G114N+L116S/T, K115N+M117S/T, L116N, L116N+S118T, S119N+H212S/T, L120N+L122S/T, H121N+K123S/T, K123N+Y125S/T, R124N+Y126S/T, G127N+I129S/T, R128N+L130S/T, L130N+Y132S/T, H131N+L133S/T, 10 K134N+K136S/T, A135N+E137S/T, K136N+Y138S/T, E137N, Y138N+H140S/T, H140N+A142S/T, V148N+I150S/T, R152N+F154S/T, Y155N+I157S/T, L160S/T, R159N+T161S, R159N, G162N+L164S/T vagy Y163N+R165S/T.

Az alábbi szubsztitúciók tartoznak azok közé, amelyek további N-glikozilációs hely beépítéséhez vezetnek az IFNB molekula felszínén található pozíciókban, amelyek aminosav-oldallancának több mint 50%-a felszíni kitettségű:

L6S/T, L5N+G7S/T, F8N+Q10S/T, L9N+R11S/T, S12N+N14S/T, F15N+C17S/T, Q16N+Q18S/T, K19N+L21S/T, W22N+L24S/T, Q23N+H25S/T, G26N+L28S/T, R27N+E29S/T, Y30N+L32S/T, K33N+R35S/T, R35N+N37S/T, M36N+F38S/T, D39S/T, D39N+P41S/T, E42N+I44S/T, Q46N+Q48S/T, Q48N+F50S/T, Q49N+Q51S/T, 20 Q51N+E53S/T, K52N+D54S/T, L57N+I59S/T, R71N+D73S/T, D73N, D73N+S75T, S75N+T77S, S75N, S76N+G78S/T, E81N+I83S/T, T82N+V84S/T, E85N+L87S/T, A89N+V91S/T, Y92S/T, Y92N+Q94S/T, H93N+I95S/T, T100N+L102S/T, E103N+K105S/T, E104N+L106S/T, E107N+E109S/T, K108N+D110S/T, D110N+T112S, D110N, F111N+R113S/T, R113N+K115S/T, L116N, L116N+S118T, K123N+Y125S/T, 25 R124N+Y126S/T, G127N+I129S/T, H131N+L133S/T, K134N+K136S/T, A135N+E137S/T, E137N, V148N+I150S/T vagy Y155N+I157S/T.

A fenti listában említett szubsztitúciók között azok az előnyösek, amelyeknek a beépített N oldallanca az N-terminális 141 aminosav-oldallanc között van, előnyösen az N-terminális 116 aminosav-oldallanc között van.

30 Az alábbi szubsztitúciók tartoznak azok közé, amelyek további N-glikozilációs hely beépítéséhez vezetnek: L6S/T, R11N, D39S/T, Q72N, D73N, S75N, L88S/T, Y92S/T, L98S/T, D110N, L116N, E137N, R159N és L160S/T. Ezek közül az a szubsztitúció előnyös, amely az alábbiak bármelyike: L6S/T, R11N, D39S/T, Q72N, D73N, S75N, L88S/T, Y92S/T, L98S/T,

D110N vagy L116N, előnyösebben az L6S/T, D39S/T, D73N, S75N, L88S/T, D110N, L116N vagy E137N bármelyike; és legelőnyösebben az L6S/T, D39S/T, D73N, S75N, L88S/T, D110N vagy L116N bármelyike.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány ezen megvalósítási módja szerinti jelenlegi legelőnyösebb IFNB polipeptid az alábbi szubsztitúciók legalább egyikét tartalmazza: S2N+N4T/S, L9N+R11T/S, R11N, S12N+N14T/S, F15N+C17S/T, Q16N+Q18T/S, K19N+L21T/S, Q23N+H25T/S, G26N+L28T/S, R27N+E29T/S, L28N+Y30T/S, D39T/S, K45N+L47T/S, Q46N+Q48T/S, Q48N+F50T/S, Q49N+Q51T/S, Q51N+E53T/S, R71N+D73T/S, Q72N, D73N, S75N, S76N+G78T/S, L88T/S, Y92T/S, N93N+I95T/S, L98T/S, E103N+K105T/S, E104N+L106T/S, E107N+E109T/S, K108N+D110T/S, D110N, F111N+R113T/S vagy L116N, előnyösebben az alábbi szubsztitúciók legalább egyikét tartalmazza: S2N+N4T, L9N+R11T, 49N+Q51T vagy F111N+R113T vagy R71N+D73T, különösen 49N+Q51T vagy F111N+R113T vagy R71N+D73T. Például az IFNB polipeptid az alábbi szubsztitúció-csoportok egyikét tartalmazza:

15 Q49N+Q51T+F111N+R113T;
 Q49N+Q51T+R71N+D73T+ F111N+ R113T;
 S2N+N4T+ F111N+R113T; S2N+N4T+Q49N+Q51T;
 S2N+N4T+Q49N+Q51T+F111N+R113T;
 S2N+N4T+L9N+R11T+Q49N+Q51T;
 20 S2N+N4T+L9N+R11T+F111N+R113T;
 S2N+N4T+L9N+R11T+Q49N+Q51T+F111N+R113T;
 L9N+R11T+Q49N+Q51T;
 L9N+R11T+Q49N+Q51T+F111N+R113T; vagy
 L9N+R11 T+F 111N+R113T.

25 Nyilvánvaló, hogy annak érdekében, hogy működőképes *in vivo* glikozilációs helyet építsünk be, az N oldallánc és az S/T oldallánc közötti aminosav-oldallánc prolintól eltérő. Normális esetben a köztes aminosav-oldallánc olyan, amely a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvencia releváns pozícióját elfoglalja. Például a Q49N+Q51S szubsztitúciót tartalmazó polipeptidben az 50. pozíció a kettő közötti pozíció.

30 A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum IFNB polipeptid része egyetlen *in vivo* glikozilációs helyet is tartalmazhat. Azonban annak érdekében, hogy a szülői polipeptid felszínén található epitópok hatékony elfedését érjük el, gyakran kívánatos, hogy a polipeptid egynél több *in vivo* glikozilációs helyet tartalmazzon, elő-

nyösen 2-7 *in vivo* glikozilációs helyet, mint például 2, 3, 4, 5, 6 vagy 7 *in vivo* glikozilációs helyet tartalmazzon. Ily módon az IFNB polipeptid tartalmazhat egy további glikozilációs helyet, vagy tartalmazhat kettő, három, négy, öt, hat, hét vagy több beépített *in vivo* glikozilációs helyet, előnyösen a fenti listák bármelyikében ismertetett legalább egy szubsztitúció beépítésével.

Amint fent jeleztük, az egy vagy több beépített glikozilációs hely mellett, meglévő glikozilációs helyek el lehetnek távolítva az IFNB polipeptidből. Például bármelyik, beépítésre fent felsorolt glikozilációs helyet kombinálhatunk olyan szubsztitúcióval, amely eltávolítja a humán vad típusú IFNB természetben előforduló N-glikozilációs helyét. Például az IFNB polipeptid tartalmazhatja az N80 szubsztitúcióját, például az N80K/C/D/E szubsztitúciók egyikét, ahol az első nem polipeptid molekularésznek K, C, D, E kapcsolócsoportha van. Például az IFNB polipeptid tartalmazhatja az alábbi szubsztitúciók legalább egyikét: S2N+N4T/S, L9N+R11T/S, R11N, S12N+N14T/S, F15N+C17S/T, Q16N+Q18T/S, K19N+L21T/S, Q23N+H25T/S, G26N+L28T/S, R27N+E29T/S, L28N+Y30T/S, D39T/S, K45N+L47T/S, Q46N+Q48T/S, Q48N+F50T/S, Q49N+Q51T/S, Q51N+E53T/S, R71N+D73T/S, Q72N, D73N, S75N, S76N+G78T/S, L88T/S, Y92T/S, N93N+I95T/S, L98T/S, E103N+K105T/S, E104N+L106T/S, E107N+E109T/S, K108N+D110T/S, D110N, F111N+R113T/S vagy L116N, előnyösebben az alábbi szubsztitúciók legalább egyikét tartalmazza: Q49N+Q51T vagy F111N+R113T vagy R71N+D73T, előnyösen Q49N+Q51T+F111N+R113T vagy Q49N+Q51T+R71N+D73T+F111N+R113T, kombinálva N80K/C/D/E szubsztitúcióval.

Az ebben a szakaszban feltárt glikozilált variánsok bármelyike, amely legalább egy beépített és/vagy eltávolított glikozilációs helyet tartalmaz, mint például a Q48N+F50T/S, Q48N+F50T/S+F111N+R113T/S, Q49N+Q51T/S, F111N+R113T/S vagy Q49N+Q51T/S+F111N+R113T/S szubsztitúciókat tartalmazó, tovább konjugálható polimer molekulához, mint például PEG-hez, vagy bármilyen más nem polipeptid molekularészhez. Ebből a célból a konjugálást az IFNB polipeptiden már jelen lévő kapcsolócsoportha alkalmazásával hajthatjuk végre, vagy olyan kapcsolócsoportha, amelyeket beépítettünk és/vagy eltávolítottunk, különösen oly módon, hogy összesen 1-6, előnyösen 3-4 vagy 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6 kapcsolócsoportha legyen hozzáférhető a konjugálásra. Előnyösen a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátumban — ahol a polipeptid két glikozilációs helyet tartalmaz — a nem polipeptid molekularészek számát és molekulatömegét úgy választjuk meg, hogy a nem polipeptid molekularészek összeadott molekulatömege a 20-40 kDa tartományba essen, előnyösen körülbelül 20 kDa vagy 30 kDa legyen.

Közelebbről a glikozilációs variánst konjugálhatjuk nem polipeptid molekularészhez lizin kapcsolócsoporton keresztül, és a szülői polipeptid egy vagy több lizin oldallánca el lehet távolítva, például az 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekularész kapcsolócsoportként lizint tartalmazó molekulát tartalmaz' szakaszban említett bármelyik szubsztitúció útján, előnyösen a K19R+K45R+K123R szubsztitúciókkal. Más megoldásképpen vagy ezenfelül, lizin oldalláncot építhetünk be például az említett szakaszban említett bármelyik szubsztitúció alkalmazásával, előnyösen az R71K szubsztitúcióval. Ennek megfelelően egy PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti specifikus konjugátum olyan glikozilált IFNB polipeptidet tartalmaz, amely a Q49N+Q51T+F111N+R113T+K19R+K45R+K123R vagy Q49N+Q51T+F111N+R113T+K19R+K45R+K123R+R71K mutációkat tartalmaz, PEG-hez konjugálva. A konjugátum glikozilált polipeptid részét előnyösen CHO sejtekben állítjuk elő és a tisztítást követően PEG-iláljuk, például az alábbiak bármelyikének alkalmazásával: SS-PEG, NPC-PEG, aldehyd-PEG, mPEG-SPA, mPEG-SCM, mPEG-BTC a Shearwater Polymers, Inc. cégtől, SC-PEG az Enzon. Inc. cégtől, trezilált mPEG (5 880 255. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat) vagy oxikarbonil-oxi-N-dikarboxiimid-PEG (5 122 614. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat).

A lizin csoporton keresztül történő PEG-ilálás alternatívájaként a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány ezen megvalósítási módja szerinti glikozilált konjugátumot PEG-ilálhatjuk cisztein oldalláncon keresztül is, az 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekularész olyan molekula, amelynek cisztein a kapcsolócsoportja' című szakaszban leírt módon (ebből a célból az IFNB polipeptid például az N80C, R71C vagy C17S mutációk bármelyikét tartalmazhatja), savas csoporton keresztül, az 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekularész savas csoporthoz kapcsolódik' című szakaszban leírt módon, vagy bármely más megfelelő csoporton keresztül.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti egyéb konjugátumok

A kiválasztott nem például molekularész kapcsolócsoportját tartalmazó aminosav-oldallánc beépítése és/vagy eltávolítása mellett (amint azt leírjuk a fenti, 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum ...' című szakaszok bármelyikében) a konjugátum IFNB polipeptid része további szubsztitúciókat tartalmazhat. Elő-

nyös példa az M1, C17, N80 vagy V101 oldalláncok bármelyikének a szubsztitúciója, például az alábbi szubsztitúciók bármelyike: C17S; N80K/C/D/E; V101Y/W/F/,H; M1 delécíója; vagy M1K. Az M1K szubsztitúció különös jelentőséggel bír, amikor az IFNB polipeptidet címkével, mint például His14-címkével expresszáltatjuk, ahol az ilyen címke eltávolítandó DAP-pal (diaminopeptidáz) a tisztítást és/vagy konjugálást követően.

A találmány szerinti és a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum nem polipeptid molekularésze

Amint fent jeleztük, a találmány szerinti és a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum nem polipeptid molekularésze előnyösen polimer molekula, lipofil vegyület, cukor-molekularész (*in vivo* glikoziláció útján) vagy szerves derivatizáló ágens bármelyike. Ezeknek az ágenseknek mindegyike kívánt tulajdonságokat biztosít a konjugátum polipeptid része számára, különösen csökkent immunogenitást és/vagy megnövekedett funkcionális féléletidőt és/vagy megnövekedett szérum féléletidőt. A konjugátum polipeptid részét vagy csak egy típusú nem polipeptid molekularészhez konjugálhatjuk, de konjugálhatjuk azt két vagy több különböző típusú nem polipeptid molekularészhez is, például egy polimer molekulához és egy cukor-molekularészhez, egy lipofil vegyülethez és egy cukor-molekularészhez, egy szerves derivatizáló ágenshez és egy cukor-molekularészhez, egy lipofil csoporthoz és egy polimer molekulához, stb. A két vagy több különböző nem polipeptid molekularész konjugálását egyidejűleg vagy egymást követően hajthatjuk végre. A nem polipeptid molekularész(ek) választása függ például a konjugálás által elérni kívánt hatástól. Például a cukor-molekularészekről azt találták, hogy különösen hasznosak az immunogenitás csökkentésére, míg a polimer molekulák, mint például PEG különösen hasznosak a funkcionális *in vivo* féléletidő és/vagy szérum féléletidő növelésére. Polimer molekula alkalmazása első nem polipeptid molekularészként és cukor-molekularész alkalmazása második nem polipeptid molekularészként csökkent immunogenitást és megnövekedett funkcionális *in vivo* féléletidőt vagy szérum féléletidőt eredményezhet.

A találmány szerinti és a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum előállítására szolgáló eljárások

Az alábbi, 'Konjugálás lipofil vegyülethez', 'Konjugálás polimer molekulához', 'Konjugálás cukor-molekularészhez' és 'Konjugálás szerves derivatizáló ágenshez' című szakaszokban specifikus típusú nem polipeptid molekularészekhez történő konjugálást írunk le. Ezeknek a szakaszoknak a tartalma releváns a jelen találmány, valamint a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szempontjából is (amint az a leírásban ismertetjük).

Konjugálás lipofil vegyülethez

Lipofil vegyülethez történő konjugációban az alábbi polipeptid-csoportok működhetnek kapcsolócsoporthként: a polipeptid N-terminálisa vagy C-terminálisa, a Ser, Thr vagy Tyr aminosav-oldalláncok hidroxil-csoportja, a Lys amino ϵ -amino-csoportja, a Cys SH-csoportja, az Asp és Glu karboxil-csoportja. A polipeptidet és a lipofil vegyületet akár közvetlenül, akár kapcsolómolekula alkalmazásával konjugálhatjuk egymáshoz. A lipofil vegyület lehet természetben előforduló vegyület, mint például telített vagy telítetlen zsírsav, zsírsav-diketon, terpén, prosztaglandin, vitamin, karotenoid vagy szteroid, vagy szintetikus vegyület, mint például szénsav, alkohol, amin és szulfonsav egy vagy több alkil-, aril-, alkenil csoporttal, vagy egyéb többszörösen telítetlen vegyület. A polipeptid és lipofil vegyület közötti konjugálást — adott esetben kapcsolómolekulán keresztül — a szakterületen ismert eljárások szerint hajthatjuk végre, például a Bodanszky által [„Peptide Synthesis”, kiad.: John Wiley, New York (1976)] és a WO 96/12505. számú nemzetközi közzétételi iratban leírtakkal.

Konjugálás polimer molekulához

A polipeptidhez kapcsolandó polimer molekula bármilyen megfelelő polimer molekula lehet, mint például természetben előforduló vagy szintetikus homopolimer vagy heteropolimer, tipikusan 300-100000 Da molekulatömeg-tartományban, mint például 300-20000 Da, előnyösebben 500-10000 Da, még előnyösebben 500-5000 Da tartományban.

A homopolimerek példái közé tartozik poliol (azaz poli-OH), poliamin (azaz poli-NH₂) és polikarbonsav (azaz poli-COOH). Egy heteropolimer az olyan polimer, amely egy vagy több különböző kapcsolócsoporthot tartalmaz, mint például hidroxil-csoportot és amin-csoportot.

A megfelelő polimer molekulák példái közé tartoznak az alábbi polimer molekulák: polialkilén-oxid (PAO), köztük a polialkilén-glikol (PAG), mint például polietilén-glikol (PEG) és polipropilén-glikol (PPG), elágazó PEG-ek, polivinilalkohol (PVA), poli-karboxilát, polivinil-pirrolidon, polietilén-ko-maleinsav-anhidrid, polisztirol-ko-maleinsav-anhidrid, dextrán, beleértve karboximetil-dextránt, vagy bármilyen más olyan biopolimer, amely alkalmas immunogenitás csökkentésére és/vagy funkcionális *in vivo* féléletidő növelésére és/vagy szérum féléletidő növelésére. Polimer molekula egy másik példája a humán albumin vagy más gyakori plazmafehérje. Általában a polialkén-glikol-eredetű polimerek biokompatibilisek, nem toxikusak, nem antigenikusak, nem immunogének, különféle vízdoldhatósági tulajdonságúak, és könnyen kiválasztódnak élő szervezetekből.

A PEG az előnyös alkalmazandó polimer molekula, mivel csak néhány keresztkötésre alkalmas reaktív csoportot tartalmaz, összehasonlítva például a poliszaccharidokkal, mint például a

dául dextránnal és hasonlókkal. Előnyösen a monofunkciós PEG, például a monometoxi-polietilén-glikol (mPEG) bír jelentőséggel, mivel a kapcsolási kémiája viszonylag egyszerű (csak egy reaktív csoport férhető hozzá a polipeptiden található kapcsolócsoporthoz történő konjugálásra). Ennek megfelelően a keresztkötés kockázata megszűnik, és a kapott polipeptid konjugátumok homogénebbek, és a polimer molekulák reakcióját a polipeptiddel könnyebb szabályozni. Amikor az interferon-molekula PEG-ilált, az általában 1-5 polietilén-glikol (PEG) molekulát tartalmaz. Egy további megvalósítási mód szerint az interferon-molekula 1-5 PEG-molekulát tartalmaz, mint például 1, 2 vagy 3 PEG-molekulát. Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 5 kDa és 100 kDa közötti.

5 Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 10 kDa és 40 kDa közötti. Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 12 kDa. Egy további megvalósítási mód szerint mindegyik PEG-molekulának a molekulatömege körülbelül 20 kDa. Előnyösen az interferon-molekula 1-3 PEG-molekulát tartalmaz, amelyek mindegyikének a molekulatömege körülbelül

15 12 kDa, vagy 1 PEG-molekulát tartalmaz, amelynek a molekulatömege körülbelül 20 kDa. Alkalmas PEG-molekulák beszerezhetők a Shearwater Polymers, Inc. és Enzon, Inc. cégektől, és például az alábbiak lehetnek: SS-PEG, NPC-PEG, aldehyd-PEG, mPEG-SPA, mPEG-SCM, mPEG-BTC, SC-PEG, trezilált mPEG (5 880 255. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat) vagy oxikarbonil-oxi-N-dikarboxiimid-PEG (5 122 614. számú amerikai egyesült

20 államokbeli szabadalmi irat).

A polimer molekula polipeptidhez történő kovalens kapcsolásának előidézéséhez a polimer molekula hidroxil-csoportjait aktivált formára kell hozni, azaz azoknak reaktív funkciós csoportokat kell tartalmazniuk [amelyek példái közé tartoznak a primer amino-csoportok, hidrazid (HZ), tiol, szukcinát (SUC), szukcinimidil-szukcinát (SS), szukcinimidil-szukcinamid (SSA), szukcinimidil-propionát (SPA), szukcinimidil-karboximetilát (SCM), benzotriazol-karbonát (BTC), N-hidroxiszukcinimid (NHS), aldehyd, nitrofenilkarbonát (NPC) és trezilát (TRES)]. Megfelelő aktivált polimer molekulák kereskedelmi forgalomban kaphatók például a Shearwater Polymers, Inc. cégtől (Huntsville, AL, USA) vagy a PolyMasc cégtől (UK). Más megoldásként a polimer molekulákat a szakterületen ismert hagyományos eljárásokkal akti-

25

30 válhatjuk, például a WO 90/13540. számú nemzetközi közzétételi iratban feltárttal. A találmány szerinti alkalmazható lineáris vagy elágazó polimer molekulák specifikus példái megtalálhatók a Shearwater Polymers, Inc. cég 1997-es és 2000-es katalógusaiban („Functionalized Biocompatible Polymers for Research and pharmaceuticals”, „Polyethylene Glycol and

- Derivatives”, amelyek hivatkozás útján a kitanítás részét képezik). Aktivált PEG-ek specifikus példái közé tartoznak az alábbi lineáris PEG-ek: NHS-PEG (például SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG és SCM-PEG és NOR-PEG), BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG és MAL-PEG, és elágazó PEG-ek, mint például PEG2-NHS, és az 5 932 462. és 5 643 575. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban feltártak, amelyek mindegyike hivatkozás útján a kitanítás részét képezi. Ezenfelül az alábbi publikációk — amelyek hivatkozás útján a kitanítás részét képezik — hasznos polimer molekulákat és/vagy PEG-ilálási reakciókat tárnak fel: 5 824 778., 5 476 653. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok, WO 97/32607. számú nemzetközi közzétételi irat, EP 229 108., EP 402 378. számú európai szabadalmi iratok, 4 902 502., 5 281 698., 5 122 614., 5 219 564. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok, WO 92/16555., WO 94/04193., WO 94/14758., WO 94/17039., WO 94/18247., WO 94/28024., WO 95/00162., WO 95/11924., WO 95/13090., WO 95/33490., WO 96/00080., WO 97/18832., WO 98/41562., WO 98/48837., WO 99/32134., WO 99/32139., WO 99/32140., WO 96/40791., WO 98/32466., WO 95/06058. számú nemzetközi közzétételi iratok, EP 439 508. számú európai szabadalmi irat, WO 97/03106., WO 96/21469., WO 95/13312. számú nemzetközi közzétételi iratok, EP 921 131. számú európai szabadalmi irat, 5 736 625. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat, WO 98/05363. számú nemzetközi közzétételi irat, EP 809 996. számú európai szabadalmi irat, 5 629 384. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat, WO 96/41813., WO 96/07670. számú nemzetközi közzétételi iratok, 5 473 034., 5 516 673. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok, EP 605 963. számú európai szabadalmi irat, 5 382 657. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat, EP 510 356., EP 400 472., EP 183 503. és EP 154 316. számú európai szabadalmi iratok.
- A polipeptid és az aktivált polimer molekulák konjugálását bármilyen hagyományos eljárással végrehajthatjuk, például az alábbi hivatkozásokban leírt módon (amelyek a polimer molekulák aktiválására alkalmas eljárásokat is leírnak): „Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications”, szerk.: Harris és Zalipsky, kiad.: AZC, Washington; R. F. Taylor, „Protein immobilisation. Fundamental and applications”, kiad.: Marcel Dekker, N. Y. (1991); S. S. Wong, „Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking”, kiad.: CRC Press, Boca Raton (1992); G. T. Hermanson és mtsai., „Immobilized Affinity Ligand Techniques”, kiad.: Academic Press, N. Y. (1993). A szakember számára nyilvánvaló, hogy az alkalmazandó aktivációs eljárás és/vagy konjugációs reakció az IFNB polipeptid kapcsolócsoportjaitól, valamint

a polimer funkciós csoportjaitól (például amino, hidroxil, karboxil, aldehid vagy szulfhidril) függ. A PEG-ilálást a polipeptid összes hozzáférhető kapcsolócsoportjának konjugálására irányíthatjuk (azaz a polipeptid felszínén található kapcsolócsoportokra), vagy specifikus kapcsolócsoportok, mint például az N-terminális amino-csoportra irányíthatjuk (5 985 265. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat). Ezenfelül a konjugálást végezhetjük egy lépésben vagy lépésenként (például ahogyan a WO 99/55377. számú nemzetközi közzétételi iratban feltárják).

Nyilvánvaló, hogy a PEG-ilálást úgy tervezzük, hogy optimális molekulát állítson elő a kapcsolt PEG molekulák számának tekintetében, és hogy az ilyen molekulák méretének és alakjának tekintetében (például hogy azok lineárisak-e vagy elágazóak), és hogy az ilyen molekulák hol kapcsolódnak a polipeptidhez. Például az alkalmazandó polimer molekulatömegét az elérni kívánt hatás alapján választhatjuk meg. Például, ha a konjugálás elsődleges célja magas molekulatömegű konjugátum előállítása (például a vesében történő kiürülés csökkentése végett), általában kívánatos a lehető legkevesebb nagy molekulatömegű polimer molekula konjugálása a kívánt molekulatömeg eléréséhez. Amikor nagymértékű epitóp letakarás kívánatos, ezt elegendően nagy számú alacsony molekulatömegű polimer alkalmazásával érhetjük el (például körülbelül 5000 Da molekulatömegűekkel), hogy hatásosan lefedjük a polipeptid összes vagy legtöbb epitópját. Például 2-8, mint például 3-6 ilyen polimert alkalmazhatunk.

A fehérje csak egyetlen kapcsolócsoportjához történő konjugálás esetében (amint azt az 5 985 265. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban feltárják) előnyös lehet, ha a polimer molekulának — amely lehet lineáris vagy elágazó — magas a molekulatömege, körülbelül 20 kDa.

Normális esetben a polimer konjugálását olyan körülmények között végezzük, amelyek az összes polimer kapcsolócsoport reagáltatását célozzák a polimer molekulákkal. Tipikusan az aktivált polimer molekulák és a polipeptid molaránya 1000-1, közelebbről 200-1, előnyösen 100-1, mint például 10-1 vagy 5-1 az optimális reakció eléréséhez. Azonban ekvimoláris arányt is alkalmazhatunk.

A jelen találmány és a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány tárgykörébe tartozik a polimer molekulák polipeptidhez történő kapcsolása kapcsoló-molekulán keresztül. Alkalmas kapcsolómolekulák ismertek a szakember számára. Egy előnyös példa a cianuronsav-klorid [Abuchowski és mtsai., J. Biol. Chem. 252, 3578-3581. old. (1977); 4 179 337. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; Shafer és mtsai., J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 24, 375-378. old. (1986)].

A konjugálást követően a fennmaradó polimer molekulát blokkoljuk szakterületen ismert eljárások alkalmazásával, például primer aminnak a reakcióelegyhez történő hozzáadásával, és a kapott inaktivált polimer molekulákat eltávolítjuk megfelelő eljárás alkalmazásával.

5 Szénhidrát-molekularész és IFNB aminosav-oldalláncainak a kovalens *in vitro* kapcsolását alkalmazhatjuk a szénhidrát szubsztituensek módosítására vagy számuknak növelésére. Az alkalmazott kapcsolási eljárástól függően a szénhidráto(ka)t a) argininhez és hisztidinhez (Lundblad és Noyes, „Chemical Reagents for Protein Modification”, kiad.: CRC Press Inc. Boca Raton, Fl.), b) szabad karboxil-csoportokhoz (például a C-terminális oldallánchoz, aszparaginhoz vagy glutaminhoz), c) szabad szulfhidril-csoportokhoz, mint például ciszteinhez,
10 d) szabad hidroxil-csoportokhoz, mint például szerin, treonin, tirozin vagy hidroxiprolin hidroxiljához, e) aromás oldalláncokhoz, mint például fenilalanin vagy triptofán aromás oldalláncához, vagy f) a glutamin amid-csoportjához kapcsolhatjuk. Ezek az aminosav-oldalláncok szénhidrát-molekularész kapcsolócsoportjainak a példáit képviselik, amelyeket beépíthetünk az IFNB polipeptidbe és/vagy eltávolíthatunk abból. Az *in vitro* kapcsolat alkalmas eljárásait írják
15 le a WO 87/05330. számú nemzetközi közzétételi iratban és Aplin és mtsai. [CRC Crit Rev. Biochem., 259-306. old. (1981)]. A szénhidrát molekulareszeknek vagy PEG-nek fehérjében és peptidben található Gln-oldalláncokhoz történő kapcsolását végrehajthatjuk transzglutaminázokkal (TGáz) is, például amint azt Sato és mtsai. [Biochemistry 35, 13072-13080. old. (1996)] vagy az EP 725 145. számú európai szabadalmi iratban leírják.

20 **Kapcsolás cukor-molekularészhez**

Annak érdekében, hogy elérjük találmány szerinti IFNB polipeptid *in vivo* glikozilálását, például olyanét, amely módosítva lett egy vagy több glikozilációs hely beépítésével (lásd az 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátumok, amelyekben a nem polipeptid molekularész cukor-molekularész' című szakaszt) vagy a glikozilációs helyhez közel található aminosav-oldallánc módosításával (amint azt a 'Megnövekedett glikozilációjú variánsok' című szakaszban leírjuk), a konjugátum polipeptid részét kódoló nukleotid-szekvenciát be kell juttatni glikoziláló eukarióta expressziós gazdába. Az expressziós gazdasejtek lehetnek gomba (fonalas gomba vagy élesztő), rovar, emlős, állati és transzgenikus növényi sejtek vagy transzgenikus állati sejtek. Ezenfelül a glikozilációt elérhetjük az emberi
25 szervezetben is, amikor találmány szerinti polipeptidet kódoló nukleotid-szekvenciát génterápiára alkalmazunk. Egy megvalósítási mód szerint a gazdasejt emlőssejt, például CHO sejt, BHK vagy HEK sejt, például HEK293, vagy rovarsejt, például SF9 sejt, vagy élesztősejt, például *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* vagy bármilyen másféle glikoziláló gazda, például
30

amelyeket részletesebben leírunk alább. Adott esetben az IFNB polipeptidhez *in vivo* glikozilációval hozzákapcsolt cukor-molekularészeket tovább módosíthatjuk glikoziltranszferázok alkalmazásával, például a Neose cég (Horsham, PA, USA) által forgalmazott *glycoAdvance™* technológia alkalmazásával. Ezáltal lehetséges megnövelni a glikozilált IFNB polipeptid szialiláltságát a CHO sejtek általi expressziót és *in vivo* glikozilációt követően.

Kapcsolás szerves derivatizáló ágenshez

Az IFNB polipeptid kovalens módosítását elvégezhetjük a polipeptid kapcsolócsoportha(a)inak szerves derivatizáló ágenssel történő reagáltatásával. Alkalmas derivatizáló ágensek és eljárások jól ismertek a szakterületen. Például ciszteinil-oldalláncokat leggyakrabban α -haloacetátokkal (és a megfelelő aminokkal) reagáltatunk, mint például klórecetsavval és klóracetamiddal, karboximetil vagy karboxiamidometil származékokat létrehozva. Ciszteinil-oldalláncokat szintén derivatizálhatunk bromotrifluoroacetonnal, α -bromo-p-(4-imidazolil)-propionsavval, kloroacetyl-foszfáttal, N-alkilmaleimidekkel, 3-nitro-2-piridil-diszulfiddal, metil-2-piridil-diszulfiddal, p-kloromerkuribenzoáttal, 2-kloromerkuri-4-nitrofenollal vagy kloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazollal történő reakcióval. Hisztidil-oldalláncokat dietilpirokarbonáttal történő reakcióval derivatizálunk 5,5-7,0-es pH-n, mert ez az ágens viszonylag specifikus a hisztidil-oldalláncra. A para-bromofenacil-bromid szintén hasznos; a reakciót előnyösen 0,1 M nátrium-kakodilátban hajtjuk végre 6,0-os pH-n. Lizinil- és amino-terminális oldalláncokat szukcinil- vagy karboxilsav-anhidridekkel reagáltatunk. Az ezekkel az ágensekkel történő derivatizálás hatása a lizinil-oldalláncok töltésének a megfordítása. Más alkalmas reagensek közé tartoznak az α -amino-csoportot tartalmazó oldalláncok derivatizálására az imidoészterek, mint például metil-pikolinimidát; piridoxál-foszfát; piridoxál; kloroborohidrid; trinitrobenzol-szulfonsav; O-metilizourea; 2,4-pentándion; és transzamináz reakciók glioxiláttal. Arginil-oldalláncokat egy vagy több hagyományos reagenssel történő reakcióval módosítunk, mint például fenilglioxállal, 2,3-butándionnal, 1,2-ciklohexándionnal és ninhidrinnel. Az arginin oldalláncok derivatizálásához az szükséges, hogy a reakciót alkalikus körülmények között hajtjuk végre a guanidin funkciós csoport magas pKa értéke miatt. Ezenfelül ezek a reagensek reagálhatnak lizin csoportjaival, valamint az arginin guanidino-csoportjával is. Karboxil-oldalláncokat (aszpartil- vagy glutamil- vagy C-terminális aminosav-oldalláncot) szelektíven módosíthatunk karbodiimidekkel ($R-N=C=N-R'$), ahol R és R' jelentése különböző alkil-csoport, mint például 1-ciklohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)-karbodiimid vagy 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpenti)-karbodiimid. Ezenfelül az aszpartil- és glutamil-oldalláncokat átalakíthatjuk aszparaginil- és glutaminil-oldalláncokká ammónium-ionokkal történő reakcióval.



A találmány szerinti (vagy a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti) IFNB polipeptid előállítására szolgáló eljárások

A jelen találmány szerinti és PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti polipeptidet — adott esetben glikozilált formában — a szakterületen ismert bármilyen alkalmas eljárással előállíthatjuk. Ilyen eljárások közé tartozik a polipeptidet kódoló nukleotid-szekvencia előállítása és a szekvencia expresszáltatása megfelelő transzformált vagy transzfektált gazdában. Azonban a találmány szerinti polipeptideket előállíthatjuk — noha kevésbé hatékonyan — kémiai szintézissel vagy kémiai szintézis kombinációjával vagy kémiai szintézis és rekombináns DNS-módszerek kombinációjával.

Az IFNB polipeptidet kódoló találmány szerinti nukleotid-szekvenciát a szülői IFNB-t kódoló nukleotid-szekvencia, például a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvencia izolálásával vagy megszintetizálásával állíthatjuk elő, és azután a nukleotid-szekvencia megváltoztatásával oly módon, hogy a releváns aminosav-oldallánc(ok) beépítését (azaz inzercióját vagy szubsztitúcióját) vagy delécioját (azaz eltávolítását vagy szubsztitúcióját) érjük el.

A nukleotid-szekvenciát kényelmesen helyspecifikus mutagenézissel módosíthatjuk, jól ismert eljárások szerint [lásd például Mark és mtsai., „Site-specific Mutagenesis of the Human Fibroblast Interferon Gene”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666. old. (1984); és a 4 588 585. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratot].

Más megoldásképpen a nukleotid-szekvenciát kémiai szintézissel állítjuk elő, például oligonukleotid-szintetizátor alkalmazásával, ahol az oligonukleotidokat a kívánt polipeptid aminosav-szekvenciája alapján tervezzük meg, és előnyösen azokat a kodonokat választjuk, amelyek előnyösek abban a gazdasejtben, amelyben a rekombináns polipeptidet termelni fogjuk. Például számos, a kívánt polipeptid részleteit kódoló kis oligonukleotidot szintetizálhatunk meg, és állíthatunk össze PCR-rel, ligálással vagy ligációs-láncreakcióval (LCR). Az egyedi oligonukleotidok tipikusan 5' vagy 3' túlnyúló részeket tartalmaznak a komplementer összeállítás céljából.

Ha egyszer összeállítottuk (szintézissel, helyspecifikus mutagenézissel vagy más eljárással), az IFNB polipeptidet kódoló nukleotid-szekvenciát rekombináns vektorba inzeráljuk, és működőképesen kapcsoljuk szabályozó szekvenciákhoz, amelyek szükségesek az IFNB expresszáltatásához a kívánt transzformált gazdasejtben.

Természetesen nyilvánvaló, hogy nem minden vektor és expressziós szabályozó szekvencia működik egyformán jól a találmány szerinti polipeptid-variánst kódoló nukleotid-



- szekvencia expresszáltatására. Hasonlóképpen, nem minden gazdasejt működik egyformán jól ugyanazzal az expressziós rendszerrel. Azonban a szakember indokolatlan kísérletezés nélkül választhat ezek között a vektorok, expressziós szabályozó szekvenciák és gazdasejtek között. Például a vektor kiválasztása alkalmával a gazdát figyelembe kell venni, mert a vektornak replikálódnia kell abban, vagy képesnek kell lennie integrálódni a kromoszómába. A vektor kópiaszámát, a kópiaszám szabályozására való képességét, és a vektoron kódolt bármilyen más fehérjét, mint például antibiotikus marker expresszióját is figyelembe kell venni. Az expressziós szabályozó szekvencia kiválasztásakor különféle tényezőket is figyelembe kell venni. Ezek közé tartozik például a szekvencia viszonylagos erőssége, a szabályozhatósága, és a kompatibilitása a polipeptidet kódoló nukleotid-szekvenciával, különösen a potenciális másodlagos szerkezetek vonatkozásában. A gazdákat a kiválasztott vektorral való kompatibilitásuk, a nukleotid-szekvencia által kódolt termék toxicitása, a szekréciónak tulajdonságok, a polipeptid helyes feltekeredése, a fermentációs és tenyésztési szükségleteik, és a nukleotid-szekvencia által kódolt termékek tisztításának könnyűsége alapján kell kiválasztani.
- 15 A rekombináns vektor lehet autonóm módon replikálódó vektor, azaz olyan vektor, amely extrakromoszómális entitásként létezik, amelynek a replikációja független a kromoszómális replikációtól, mint például egy plazmid. Más megoldásként a vektor olyan, amely — amikor bejuttatjuk gazdasejtbe — integrálódik a gazdasejt genomjába, és együtt replikálódik a kromoszómá(v)al, amelybe integrálódott.
- 20 A vektor előnyösen expressziós vektor, amelyben a találmány szerinti polipeptidet kódoló nukleotid-szekvencia működőképesen kapcsolva van további szegmensekhez, amelyek szükségesek a nukleotid-szekvencia transzkripciójához. A vektor tipikusan plazmidból vagy virális DNS-ből származik. Számos alkalmas expressziós vektor kereskedelmi forgalomban kapható vagy ismert a szakirodalomból a leírásban említett gazdasejtekben történő expresszáltatás céljából. Eukarióta gazdáknak hasznos expressziós vektorok közé tartoznak például SV40-ből, szarvasmarha papillómavírusból, adenovírusból és citomegalovírusból származó expressziós szabályozó szekvenciákat tartalmazó vektorok. Specifikus vektorok például a pCDNA3.1(+)\Hyg (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) és a pCI-neo (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Baktériális gazdáknak hasznos expressziós vektorok közé tartoznak ismert baktériális plazmidok, mint például *E. coli*-ből származó plazmidok, köztük pBR322, pET3a és pET12a (mindegyik Novagen Inc., WI, USA), szélesebb gazdatartományú plazmidok, például az RP4, fág DNS-ek, például a lambda fág számos származéka, például az NM989, és más DNS-fágok, mint például az M13 fonális egyszálú DNS fágok. Élesztősejtekben hasznos expressziós vek-
- 25
- 30

torok közé tartoznak a 2 μ plazmid és annak származékai, a POT1 vektor (4 931 373. számú
 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat), a pJS037 vektor [Okkels, Ann. New York
 Acad. Sci. 782, 202-207. old. (1996)] és a pPICZ A, B vagy C (Invitrogen). Rovarsejtekben
 hasznos vektorok közé tartozik a pVL941, pBG311 [Cate és mtsai., „Isolation of the Bovine
 5 and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance And Expression of the Human Gene In
 Animal Cells”, Cell 45, 685-698. old. (1986)], pBluebac 4.5 és pMelbac (mindkettő
 Invitrogen).

A találmány szerint alkalmazható egyéb vektorok közé tartoznak azok, amelyek lehető-
 vé teszik a polipeptid-variánst kódoló nukleotid-szekvencia kópiaszámának az amplifikálását.
 10 Ilyen amplifikálható vektorok jól ismertek a szakterületen. Ezek közé tartoznak például a
 DHFR amplifikációval amplifikálható vektorok [lásd például Kaufman, 4 470 461. számú ame-
 rikai egyesült államokbeli szabadalmi irat, Kaufman és Sharp, „Construction Of A Modular
 Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression”,
 Mol. Cell. Biol. 2, 1304-1319. old. (1982)] és glutamin-szintetáz (GS) amplifikáció (lásd pél-
 15 dával az 5 122 464. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratot és a EP 338 841.
 számú európai szabadalmi iratot).

A rekombináns vektor továbbá tartalmazhat olyan DNS-szekvenciát, amely lehetővé te-
 szti a vektor replikációját a kérdéses gazdasejtben. Ilyen szekvencia egy példája (amikor a gaz-
 dasejt emlőssejt) az SV40 replikációs origó. Amikor a gazdasejt élesztősejt, az élesztőben való
 20 replikációra megfelelő szekvenciák az élesztő 2 μ plazmid REP 1-3 replikációs génjei és
 replikációs origója.

A vektor tartalmazhat szelektálható markert is, például olyan gént, amelynek a terméke
 kiegészíti a sejt egy hiányosságát, mint például a dihidrofolát-reduktáz (DHFR) vagy a
Schizosaccharomyces pombe TPI génje [P. R. Russell, Gene 40, 125-130. old. (1985)], vagy
 25 olyan, amely drog elleni rezisztenciát okoz, például ampicillin, kanamicin, tetraciklin,
 kloramfenikol, neomicin, higromicin vagy metotrexát ellen. Fonális gombák esetében a sze-
 lektálható marker lehet amdS, pyrG, arcB, niaD, sC.

A „szabályozó szekvencia” kifejezés alatt a leírás szerinti értelemben minden olyan
 komponenst értünk, amely szükséges vagy előnyös az IFNB polipeptid expressziójához. Bár-
 30 melyik szabályozó szekvencia lehet natív vagy idegen a polipeptidet kódoló nukleotid-
 szekvenciához viszonyítva. Az ilyen szabályozó szekvenciák nem korlátozó példái közé tarto-
 zik vezetőszekvencia, poliadenilációs szekvencia, propeptid szekvencia, promóter, enhancer
 vagy leolvasással ellentétes irányban lévő aktiváló szekvencia, szignálpeptid szekvencia és

transzkripció terminátor. Minimumként a szabályozó szekvencia legalább egy promótert tartalmaz.

Nagyszámú különféle expressziós szabályozó szekvenciát alkalmazhatunk a találmány szerint. Az ilyen hasznos szabályozó szekvenciák közé tartoznak a fenti expressziós vektorok szerkezeti génjeinek az expressziót szabályozó szekvenciái, valamint bármilyen olyan szekvencia, amelyről ismert, hogy prokarióta vagy eukarióta sejtek vagy azok vírusai expresszióját szabályozó szekvencia, és ezek különféle kombinációi.

Transzkripció emlőssejtekben történő irányítására alkalmas szabályozó szekvenciák példái közé tartoznak az SV40 és adenovírus korai és késői promóterei, például az adenovírus-2 fő késői promótere, az MT-1 (metallotionein gén) promóter, a humán citomegalovírus (CMV) közvetlen korai promótere, a humán elongációs faktor 1 α (EF-1 α) promótere, a *Drosophila* minimális hősokk-70 fehérje promótere, a Rous Szarkóma Vírus (RSV) promótere, a humán ubiquitin-C (UbC) promótere, a humán növekedési hormon terminátora, SV40 vagy adenovírus Elb régió poliadenilációs szignáljai, és a Kozak-féle konszenzus szekvencia [Kozak, M. J. Mol. Biol. 196, 947-950. old. (1987)].

Annak érdekében, hogy javítsuk az expressziót emlőssejtben, szintetikus intront építhetünk be a jelentőséggel bíró polipeptidet kódoló nukleotid-szekvencia 5' nem transzlálódó régiójába. Szintetikus intron egy példája a pCI-Neo plazmid (Promega Corporation, WI, USA) szintetikus intronja.

Transzkripció rovarsejtekben történő irányítására alkalmas szabályozó szekvenciák példái közé tartoznak a polihedrin promóter, a P10 promóter, az *Autographa californica* polihedrózis vírus bázikus fehérje promótere, a bakulovírus közvetlen korai 1-es génjének a promótere és a bakulovírus 39K késleltetett korai génjének a promótere, és az SV40 poliadenilációs szekvencia.

Élesztő gazdasejtekben alkalmas szabályozó szekvenciák példái közé tartoznak az élesztő α -párosodási rendszere, az élesztő trióz-foszfát-izomeráz (TPI) promótere, élesztő glikolitikus génjeinek vagy alkohol-dehidrogenáz génjeinek promóterei, az ADH2-4c promóter és az indukálható GAL promóter.

Fonális gombákban alkalmazható alkalmas szabályozó szekvenciák példái közé tartoznak az ADH3 promóter és terminátor, az *Aspergillus oryzae* TAKA amiláz trióz-foszfát-izomeráz vagy alkalikus proteáz, *A. niger* alfa-amiláz, *A. niger* vagy *A. nidulans* glukoamiláz, *A. nidulans* acetamidáz, *Rhizomucor miehei* aszpartikus proteináz vagy lipáz génekből származó promóter, a TPI1 terminátor és az ADH3 terminátor.

A bakteriális sejtekben alkalmazható alkalmas szabályozó szekvenciák példái közé tartoznak a *lac*-rendszer, a *trp*-rendszer, a *TAC* vagy *TRC* rendszer és a lambda fág fő promóter-régiói.

Az IFNB polipeptidet kódoló találmány szerinti nukleotid-szekvenciák, akár helyspecifikus mutagenézissel, akár szintézissel vagy más eljárásokkal vannak előállítva, tartalmazhatnak vagy sem olyan nukleotid-szekvenciát, amely szignálpeptidet kódol. A szignálpeptid akkor van jelen, amikor a polipeptidet szekretálni kell abból a sejtől, amelyben expresszáldik. Az ilyen szignálpeptidet, amennyiben jelen van, fel kell ismernie a polipeptid expresszáltatásához kiválasztott sejtnek. A szignálpeptid lehet homológ (például amely normális esetben kapcsolódik a humán IFNB-hez) vagy heterológ (azaz a humán IFNB-től különböző forrásból származó) a polipeptidhez viszonyítva, vagy lehet homológ vagy heterológ a gazdasejthez viszonyítva, azaz lehet olyan szignálpeptid, amely normális esetben expresszáldik a gazdasejtől, vagy normális esetben nem expresszáldik a gazdasejtől. Ennek megfelelően a szignálpeptid lehet prokarióta, például baktériumból, mint például *E. coli*-ból származó, vagy lehet eukarióta, például emlős, rovar vagy élesztő sejtől származó.

A szignálpeptid jelenléte vagy hiánya függhet a polipeptid előállítására alkalmazott gazdasejt expressziójától, az expresszálandó fehérjétől (attól függően, hogy az intracelluláris vagy extracelluláris fehérje), és attól, hogy kívánatos-e szekréció előidézése. Fonális gombákban történő alkalmazásra a szignálpeptidet kényelmesen *Aspergillus sp.* amilázt vagy glukoamilázt kódoló génből, *Rhizomucor miehei* lipázt vagy proteázt vagy *Humicola lanuginosa* lipázt kódoló génből származhat. A szignálpeptid előnyösen *A. oryzae* TAKA amilázt, *A. niger* semleges α -amilázt, *A. niger* savas-stabil amilázt vagy *A. niger* glukoamilázt kódoló génből származik. Rovarsejtekben történő alkalmazásra a szignálpeptid kényelmesen rovargénből származhat (vö. a WO 90/05783. számú nemzetközi közzétételi irattal), mint például a hátyásszárnyú *Manduca sexta* adipokinetikus hormon prekursorából (vö. az 5 023 328. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irattal), mézelő méh melittinjéből (Invitrogen), ekdiszteroid-UDP-glukoziltranszferázból (egt) [Murphy és mtsai., Protein Expression and Purification 4, 349-357. old. (1993)] vagy humán hasnyálmirigy lipázból (hpl) [Methods in Enzymology 284, 262-272. old. (1997)].

Emlősejtekben történő alkalmazásra előnyös szignálpeptid a leírásban szereplő példák-ból nyilvánvaló humán IFNB-é, vagy az egér IG-kappa könnyűlánc szignálpeptidje [Coloma, M., J. Imm. Methods 152, 89-104. old. (1992)]. Élesztősejtekben történő alkalmazásra alkalmas szignálpeptidek az α -faktor szignálpeptid *S. cerevisiae*-ból (vö. az 4 870 008. számú ame-



rikai egyesült államokbeli szabadalmi irattal), az egér nyálamiláz szignálpeptidje [vö. O. Hagenbuchle és mtsai., Nature 289, 643-646. old. (1981)], módosított karboxipeptidáz szignálpeptidje [vö. L. A. Valls és mtsai., Cell 48, 887-897. old. (1987)], az élesztő BAR1 szignálpeptidje (vö. a WO 87/02670. számú nemzetközi közzétételi irattal), és az élesztő aszpartikus proteáz-3 (YAP3) szignálpeptidje [vö. M. Egel-Mitani és mtsai., Yeast 6, 127-137. old. (1990)].

Bármilyen alkalmas gazdát alkalmazhatunk az IFNB polipeptid előállítására, beleértve baktériumokat, gombákat (beleértve élesztőket), növényeket, rovarokat, emlősöket, vagy más megfelelő állati sejteket vagy sejt vonalakat, valamint transzgenikus állatokat vagy növényeket.

A bakteriális gazdasejt példái közé tartoznak Gram-pozitív baktériumok, mint például *Bacillus* törzsei, például *B. brevis* vagy *B. subtilis*, *Pseudomonas* vagy *Streptomyces*, vagy Gram-negatív baktériumok, mint például *E. coli* törzsei. Vektor bejuttatását bakteriális gazdasejtbe például protoplaszt transzformációval hajthatjuk végre [lásd például Chang és Cohen, Molecular General Genetics 168, 111-115. old. (1979)], kompetens sejtek alkalmazásával [lásd például Young és Spizizin, Journal of Bacteriology 81, 823-829. old. (1961), vagy Dubnau és Davidoff-Abelson, Journal of Molecular Biology 56, 209-221. old. (1971)], elektroporációval [lásd például Shigekawa és Dower, Biotechniques 6, 742-751. old. (1988)], vagy konjugációval [lásd például Koehler és Thorne, Journal of Bacteriology 169, 5771-5278. old. (1987)].

Alkalmas fonalas gomba gazdasejtek példái közé tartoznak az *Aspergillus*, például *A. oryzae*, *A. niger*, vagy *A. nidulans*, *Fusarium* vagy *Trichoderma* törzsei. Gombasejteket protoplaszt kialakítását a protoplaszt transzformációját, és a sejt fal önmagában ismert módon történő regenerálását magában foglaló eljárással transzformálhatunk. *Aspergillus* gazda transzformálására alkalmas eljárásokat írnak le az EP 238 023. számú európai szabadalmi iratban és az 5 679 543. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban. *Fusarium* fajok transzformálására alkalmas eljárásokat írnak le Malardier és mtsai. [Gene 78, 147-156. old. (1989)] és a WO 96/00787. számú nemzetközi közzétételi iratban. Élesztőt transzformálhatunk az alábbi irodalmi helyeken leírt eljárások alkalmazásával: Becker és Guarente, „Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology”, szerk.: Abelson, J. N. és Simon, M. I., Methods in Enzymology 194, 182-187. old., kiad.: Academic Press, Inc., New York; Ito és mtsai., Journal of Bacteriology 153, 163. old. (1983); és Hinnen és mtsai., Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75, 1920 old. (1978).

Alkalmas élesztő gazdasejtek példái közé tartoznak a *Saccharomyces* törzsei, például *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* törzsei, mint például *P. pastoris* vagy

P. methanolica, *Hansenula* törzsei, mint például *H. Polymorpha* vagy *Yarrowia* törzsei. Élesztősejteknek heterológ DNS-sel történő transzformálására és heterológ polipeptid előállítására szolgáló eljárásokat tár fel a Clontech Laboratories, Inc. cég (Palo Alto, CA, USA; a „Yeastmaker Yeast Transformation System Kit” termékismertetőjében), és Reeves és mtsai. [FEMS Microbiology Letters 99, 193-198. old. (1992)], Manivasakam és Schiestl [Nucleic Acids Research 21, 4414-4415. old. (1993)] és Ganeva és mtsai. [FEMS Microbiology Letters 121, 159-164. old. (1994)].

Alkalmas rovarsejtek példái közé tartoznak hártácsszárnyú sejtvonalak mint például a *Spodoptera frugiperda* (Sf9 vagy Sf21) sejtvonalak vagy *Trichoplusia ni* sejtek (*High Five*) (5 077 214. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat). Rovarsejtek transzformálását és azokban heterológ polipeptid előállítását az Invitrogen által leírt módon hajthatjuk végre.

Alkalmas emlős gazdasejtek közé tartoznak kínai aranyhörcsög petefészkek (CHO) sejtvonalak (például CHO-K1; ATCC CCL-61), zöldmajom sejtvonalak (COS) [például COS-1 (ATCC CRL-1650), COS-7 (ATCC CRL-1651)]; egérsejtek (például NS/O), hörcsögbébi vese (BHK) sejtvonalak (például ATCC CRL-1632 vagy ATCC CCL-10), és humán sejtek [például HEK-293 (ATCC CRL-1573)], valamint szövettenyészetben lévő növényi sejtek. További alkalmas sejtvonalak ismertek a szakterületen, és hozzáférhetők nyilvános letéti intézményekből, mint amilyen például az 'American Type Culture Collection' (Rockville, Maryland). Ezenkívül az emlőssejt, mint például egy CHO sejt, módosítható, hogy szialiltranszferázt, például 1,6-szialiltranszferázt expresszálgon, például amint az 5 047 335. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban leírják, annak érdekében, hogy javítsuk az IFNB polipeptid glikozilációját.

Exogén DNS-nek emlős gazdasejtekbe történő bejuttatására szolgáló eljárások közé tartozik a kalcium-foszfát-közvetített transzfekció, elektroporáció, DEAE-dextrán-közvetített transzfekció, liposzóma-közvetített transzfekció, virális vektorok és a Life Technologies Ltd. (Paisley, UK) *Lipofectamin 2000* reagense és a Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, USA) *FuGENE 6* reagense útján végzett transzfekciós eljárások. Ezek az eljárások jól ismertek a szakterületen, és például leírják azokat Ausbel és mtsai. a „Current Protocols in Molecular Biology” [kiad.: John Wiley & Sons, New York, USA (1996)] című könyvükben. Emlőssejtek tenyésztését meglévő eljárások szerint végezzük, például amint azt az alábbi irodalmi helyeken leírják: „Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols”, szerk.: Nigel Jenkins, kiad.:

Human Press Inc, Totowa, New Jersey, USA (1999) és Harrison, M.A. és Rae, I.F., „General Techniques of Cell Culture”, kiad.: Cambridge University Press (1997).

A találmány szerinti előállítási eljárásokban a sejteket tápláló tápközegben tenyésztjük, amely alkalmas a polipeptid szakterületen ismert eljárásokkal történő előállítására. Például a
 5 sejteket rázóflaskás tenyésztéssel tenyészthetjük, kisléptékű vagy nagyléptékű fermentálással (beleértve folyamatos, szakaszos, betáplált szakaszos vagy szilárdfázisú fermentációt) laborató-
 riumi vagy ipari fermentorokban végezve alkalmas tápközegben és olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik a polipeptid expresszáltatását és/vagy tisztítását. A tenyésztést alkal-
 mas tápláló tápközegben hajtjuk végre, amely szén- és nitrogénforrásokat és szervesen sokat
 10 tartalmaz, a szakterületen ismert eljárások alkalmazásával. Alkalmas tápközegek hozzáférhetők kereskedelmi forgalomban, vagy publikált összetételek alapján előállíthatók (például az
 'American Type Culture Collection' katalógusaiban publikáltakból). Ha a polipeptid szekretá-
 lódik a tápláló tápközegbe, a polipeptidet közvetlenül a tápközegből nyerhetjük vissza. Ha a
 polipeptid nem szekretálódik, azt a sejtek lizálásával nyerhetjük vissza.

15 A kapott polipeptidet a szakterületen ismert eljárások alkalmazásával nyerhetjük vissza. Például a polipeptid a tápközegből hagyományos eljárásokkal nyerhetjük vissza, amelyek nem
 korlátozó példái a centrifugálás, szűrés, extrahálás, permetezve szárítás, bepárlás vagy kicsa-
 pás.

A polipeptideket a szakterületen ismert különféle eljárások alkalmazásával tisztíthatjuk,
 20 nem korlátozó példaként kromatográfiával (például ioncserélő, affinitási, hidrofób kromatog-
 ráfiával, kromatofókuszálással és méretkizárásos kromatográfiával), elektroforetikus eljárások-
 kal (például preparatív izoelektromos fókuszálással), differenciális oldhatósággal (például am-
 mónium-szulfátos kicsapással), SDS-PAGE-vel vagy extrahálással [lásd például „Protein
 Purification”, szerk.: J.-C. Janson és Lars Ryden, kiad.: VCH Publishers, New York (1989)].
 25 IFNB aktivitást mutató polipeptid specifikus tisztítási eljárásait tárják fel a 4 289 689.,
 4 359 389., 4 172 071., 4 551 271., 5 244 655., 4 485 017., 4 257 938. és 4 541 952. számú
 amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban. Egy specifikus tisztítási eljárás immuna ffi-
 nitási tisztításon alapul [lásd például Okamura és mtsai., „Human Fibroblastoid Interferon:
 Immunosorbent Column Chromatography And N-Terminal Amino Acid Sequence”, Biochem.
 30 19, 3831-3835. old. (1980)]. Ezenkívül hidroxipatit kromatográfiát is alkalmazhatunk. Ezen-
 felül a tisztítás IFNAR 1 és/vagy IFNAR 2, előnyösen IFNAR 2 alkalmazásán is alapulhat.

Az IFNB polipeptidek biológiai aktivitást a szakterületen ismert bármilyen alkalmas el-
 járással megállapíthatjuk. Ilyen vizsgálati eljárások magukban foglalják antivirális aktivitás el-

lenanyagosságot, protein-kináz indukálását, oligoadenilát-2,5-A-szintetáz vagy fosz-
fodiészteráz aktivitását, amint azt az EP 41 313 B1. számú európai szabadalmi iratban feltár-
ják. Az ilyen vizsgálati eljárások lehetnek immunmoduláns vizsgálati eljárások is (lásd például a
4 753 795. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratot), növekedés-gátlási vizsgál-
5 lati eljárások, és az interferon-receptorokat expresszáló sejtekhez való kötődés mérése is. A
találmány szerinti polipeptidok és konjugátumok biológiai aktivitásának meghatározására szol-
gáló specifikus eljárásokat feltárunk az alábbi „Anyagok és eljárások” szakaszban.

Gyógyászati készítmény és a találmány szerinti konjugátum alkalmazásai

A találmány szerinti IFNB molekulát olyan dózisban adjuk be, amely megközelítőleg

10 megegyezik a humán IFNB-vel, mint például Avonex, Rebif és Betaseron alkalmazásával vég-
zett terápiával, vagy annál magasabb dózisban. A pontos beadandó dózis a körülményektől
függ. Normális esetben a dózist képesnek kell lennie megelőzni vagy csökkenteni a kezelt
állapot vagy indikáció súlyosságát vagy elterjedését. A szakember számára nyilvánvaló, hogy
az IFNB molekula hatásos mennyisége többek között függ a betegségtől, a dózistól, a beadási
15 rendtől, attól, hogy a molekulát egymagában adjuk-e be vagy más terápiás ágenssel együtt, a
készítmények szérum féléletidejétől, és a páciens általános egészségi állapotától.

A találmány szerinti IFNB molekulákat ahogyan vannak, és/vagy só formájában alkal-
mazhatjuk. Alkalmas sók nem korlátozó példái közé tartoznak sók alkálifémekkel vagy alkáli-
földfémekkel, mint például nátriummal, káliummal, lítiummal, kalciummal, magnéziummal, va-
20 lamint például cink sók. Ezek a sók vagy komplexek kristályos és/vagy amorf szerkezetben le-
hetnek jelen.

A találmány szerinti molekulát előnyösen olyan készítményben adjuk be, amely tovább
gyógyászati lag elfogadható hordozót vagy kötőszert is tartalmaz. A „gyógyászati lag elfogad-
ható” kifejezés alatt olyan hordozót vagy kötőszert értünk, amely nem okoz semmilyen kelle-
25 metlen hatást azokban a páciensekben, amelyeknek azt beadjuk. Ilyen gyógyászati lag elfogad-
ható hordozók és kötőszerek jól ismertek a szakterületen.

A találmány szerinti molekulát gyógyászati készítményekbe szerelhetjük ki jól ismert
eljárások alkalmazásával. Alkalmas kiszereléseket ismertetnek az alábbi irodalmi helyeken:
5 183 746. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; E. W. Martin, „Remington’s
Pharmaceutical Sciences”, 18. kiadás, szerk.: A. R. Gennaro, kiad.: Mack Publishing Company
30 (1990); „Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins”, szerk.: S.
Frokjaer és L. Hovgaard, kiad.: Taylor & Francis (2000); és „Handbook of Pharmaceutical
Excipients”, 3. kiadás, szerk.: A. Kibbe, kiad.: Pharmaceutical Press (2000).

A találmány szerinti molekulát különféle formában szerelhetjük ki gyógyászati készítménybe, beleértve folyadékot, gél, liofilizátumot, pulmonáris diszperziót, vagy bármilyen egyéb alkalmas formát, például sajtolt szilárd formát. Az előnyös forma függhet az adott kezelt indikációtól, és nyilvánvaló a szakember számára.

5 A találmány szerinti gyógyászati készítményt beadhatjuk parenterálisan (például intravénásan, intramuszkulárisan, intraperitoneálisan vagy szubkután), orálisan, intracerebrálisan, intradermálisan, intranazálisan, intrapulmonárisan, inhalálással, vagy bármilyen más elfogadható módon, például *PowderJect* vagy *ProLease* technológia alkalmazásával. Az előnyös beadási mód függhet az adott esetben kezelt indikációtól, és nyilvánvaló a szakember számára.

10 ***Szabad cisztein nélküli IFNB polipeptidet tartalmazó gyógyászati készítmény***

Meglepő módon azt találtuk, hogy a szabad ciszteint nem tartalmazó IFNB polipeptideknek, például a C17 nélküli, humán IFNB eredetű polipeptideknek szignifikánsan csökkent a hajlamuk az aggregálásra, összehasonlítva a szabad ciszteint tartalmazó IFNB polipeptidekkel. Ennek a megfigyelésnek fontos következményei vannak, nemcsak az IFNB polipeptidek előállításában (amely kevésbé bonyolulttá válik), hanem az IFNB polipeptidek aggregációjának minimalizálására szolgáló stabilizálószer szükségessége tekintetében is, amikor azt gyógyászati termékekbe szereljük ki.

Ennek megfelelően egy tovább megvalósítási mód szerint a találmány tárgya gyógyászati készítmény, amely glikozilált IFNB polipeptidet tartalmaz, amelyben a C17S szubsztitúció található (a 2. azonosítószámú szekvenciához viszonyítva), amely készítmény csökkent mennyiségű stabilizálószerrel tartalmaz ahhoz viszonyítva, amennyi C17-et tartalmazó, de egyébiránt azonos aminosav-szekvenciájú glikozilált IFNB polipeptidet tartalmazó gyógyászati készítmény stabilizálásához szükséges. Például a stabilizálószer mennyiségét csökkenthetjük legalább 50%-kal, mint például legalább 75%-kal, vagy akár nagyobb mértékben is. Különös jelentőséggel bír az olyan gyógyászati készítmény, amely a C17S szubsztitúciót tartalmazó IFNB polipeptidet tartalmazza (a 2. azonosítószámú szekvenciához viszonyítva), ahol a készítmény lényegében mentes stabilizálószerrel.

Az ezen megvalósítási mód szerinti IFNB polipeptid lehet bármilyen glikozilált IFNB, amely mentes szabad ciszteintől, és lehet például bármelyik találmány szerinti szülői IFNB molekula, konjugátum polipeptid része (glikozilált és adott esetben konjugált egy második nem polipeptid molekulárrészhez) vagy glikozilált variáns (azaz 'A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum, amelyben a nem polipeptid molekulárrész cukor-molekulárrész' vagy a 'Megnövekedett glikozilációjú variánsok' szakasz szerintiek).

Amikor az IFNB polipeptid a humán IFNB-ből származik, abban a 17. pozícióban ciszteintől különböző aminosav-oldallánc található, és például a C17S mutációt tartalmazza.

A stabilizálószer, amely csökkent mennyiségben van jelen vagy hiányzik, lehet az akábbi szakaszokban ismertetettek bármelyike. Például a stabilizálószer lehet HAS, vagy nem-ionos felületaktív anyag, mint például Tween, például Tween 20 vagy Tween 80.

Parenterális készítmények

Gyógyászati készítmény egy példája parenterális beadásra tervezett oldat. Habár sok esetben a gyógyászati oldat-készítményeket folyékony, azonnali beadásra megfelelő formában biztosítjuk, az ilyen parenterális kiszerezések lehetnek fagyasztott vagy liofilizált formában is. Az előbbi esetben a készítményt fel kell olvasztani az alkalmazást megelőzően. Az utóbbi formát gyakran alkalmazzuk a készítményben található hatóanyag különböző tárolási körülmények közötti stabilitásának fokozására, minthogy ismert a szakember számára, hogy a liofilizált készítmények általában stabilabbak a folyékony társaiknál. Az ilyen liofilizált készítményeket újra feloldjuk az alkalmazást megelőzően egy vagy több alkalmas gyógyászatilag elfogadható oldószer alkalmazásával, mint például injektálásra szolgáló steril vízzel vagy steril fiziológiás sóoldattal.

A parenterális készítmények esetében azokat liofilizált kiszerezések formájában állítjuk elő, vagy vizes oldatokként, a kívánt tisztasági fokú polipeptid megfelelő módon történő összekeverésével egy vagy több, a szakterületen alkalmazott, gyógyászatilag elfogadható hordozóval, kötőszerezrel vagy stabilizálószerrel (amelyek mindegyikét „kötőszereznek” nevezzük), például pufferelő ágensekkel, stabilizáló ágensekkel, tartósítószerrel, izotóniás ágensekkel, nem-ionos detergenssekkel, antioxidánsokkal és/vagy egyéb különféle adalékanyagokkal.

A pufferelő ágensek segítenek a pH-t a fiziológiás körülményeket megközelítő tartományban tartani. Ezek tipikusan körülbelül 2 mM és körülbelül 50 mM közötti tartományban vannak jelen. Alkalmas pufferelő ágensek a találmány szerinti alkalmazásra lehetnek szerves és szervetlen savak és azok sói, mint például citrát pufferek (például mononátrium-citrát-dinátrium-citrát keverék, citromsav-trinátrium-citrát keverék, citromsav—mononátrium-citrát keverék, stb.), borostyánkősav pufferek (például borostyánkősav-mononátrium-szukcinát keverék, borostyánkősav/nátrium-hidroxid keverék, -dinátrium-szukcinát keverék, stb.), tartarát pufferek (például tartársav-nátrium-tartarát keverék, tartársav-kálium-tartarát keverék, tartársav-nátrium-hidroxid keverék, stb.), fumarát pufferek (például fumársav-mononátrium-fumarát keverék, fumársav-dinátrium-fumarát keverék, mononátrium-fumarát-dinátrium-fumarát keverék, stb.), glukonát pufferek (például glukonsav-nátrium-glukonát keverék, glukonsav-nátrium-

hidroxid keverék, glukonsav-kálium-glukonát keverék, stb.), oxalát puffer (például oxálsav-nátrium-oxalát keverék, oxálsav-nátrium-hidroxid keverék, oxálsav-kálium-oxalát keverék, stb.), laktát pufferek (például tejsav-nátrium-laktát keverék, tejsav-nátrium-hidroxid keverék, tejsav-kálium-laktát keverék, stb.) és acetát pufferek (például ecetsav-nátrium-acetát keverék, ecetsav-nátrium-hidroxid keverék, stb.). További lehetőségek közé tartoznak foszfát pufferek, hisztidin pufferek és trimetilamin-sók, mint például Tris.

A tartósítószerket a mikrobiális növekedés visszatartására adjuk, körülbelül 0,2%-1% (w/v) mennyiségben. A találmány szerint alkalmas tartósítószernek közé tartozik fenol, benzil-alkohol, meta-krezol, metil-parabén, propil-parabén, oktadecildimetilbenzil-ammónium-klorid, benzalkónium-halidok (például benzalkónium-klorid, -bromid vagy -jodid), hexametónium-klorid, alkil-parabének, mint például metil- vagy propil-parabén, katekol, rezorcinol, ciklohexanol és 3-pentanol.

Az izotóniás ágenseket a folyékony készítmények izotóniásságának biztosítására adjuk, és közéjük tartoznak polihidrált cukoralkoholok, előnyösen trihidrált vagy magasabb cukoralkoholok, mint például glicerol, eritritol, arabitol, xilitol, szorbitol és mannitol. A polihidrált alkoholok 0,1% és 25% tömegszázalék közötti mennyiségben lehetnek jelen, figyelembe véve az egyéb alkotóelemekhez vett viszonylagos mennyiségüket.

Stabilizálószer alatt kötőszerek széles tartományát értjük, amelyek funkciója a térfogat növelésére szolgáló ágenstől olyan adalékanyagig terjed, amely szolubilizálja a hatóanyagot, vagy segíti a denaturációjának vagy a tartály falához történő tapadásának a megakadályozását. Tipikus stabilizálószer lehet polihidrált cukoralkoholok (amint fent felsoroltuk); aminosavak, mint például arginin, lizin, glicin, glutamin, aszparagin, hisztidin, alanin, ornitin, L-leucin, 2-fenilalanin, glutaminsav, treonin, stb., szerves cukrok vagy cukoralkoholok, mint például laktóz, trehalóz, sztachióz, mannitol, szorbitol, xilitol, ribitol, mioinizitol, galaktitol, glicerol és hasonló, köztük ciklitok, mint például inozitol; polietilén-glikol; aminosav-polimerek; kéntartalmú redukálószer, mint például karbamid, glutation, tioktinsav, nátrium-tioglikolát, tioglicerol, α -monotioglicerol és nátrium-tioszulfát; alacsony molekulatömegű polipeptid (azaz 10-nél kevesebb oldalláncot tartalmazó); fehérjék, mint például humán szérumalbumin, szarvasmarha-szérumalbumin, zselatin vagy immunglobulinok; hidrophil polimerek, mint például polivinilpirrolidon; monoszacharidok, mint például xilóz, mannóz, fruktóz és glükóz; diszacharidok, mint például laktóz, maltóz és szukróz; triszacharidok, mint például raffinóz, és poliszacharidok, mint például dextrán. Nem-ionos felületaktív anyagok vagy detergens (amelyeket „nedvesítő szerekeknek” is neveznek) jelen lehetnek, hogy elősegítsék a terápiás

agensz szolubilizálását, valamint védjék a terápiás polipeptidet a keveréssel előidézett aggregációtól, ami azt is lehetővé teszi, hogy a kiszerezés felületi nyírófeszültségnek legyen kitéve a polipeptid denaturálódása nélkül. Alkalmas nem-ionos felületaktív anyagok közé tartoznak a poliszorbátok (20, 80, stb.), polioxamerek (184, 188 stb.), Pluronic® poliolok, polioxietilén-szorbitán-monoéterek (Tween®-20, Tween®-80, stb.).

A stabilizálószeresek tipikusan a 0,1 és 10000 tömegrész tartományban vannak jelen az aktív fehérje tömegéhez viszonyítva, de csökkent mennyiségűek lehetnek vagy hiányozhatnak a 'Szabad cisztein nélküli IFNB polipeptidet tartalmazó gyógyászati készítmény' című szakaszban ismertetett találmány szerinti gyógyászati készítmény esetében.

A további különféle adalékanyagok közé tartoznak térfogatot növelő ágensek vagy töltőanyagok (például keményítő), komplexképző ágensek (például EDTA), antioxidánsok (például aszkorbinsav, metionin, E-vitamin) és társoldószeresek. A hatóanyagot bezárhatjuk mikrokapszulákba is, amelyeket például koaszervációs módszerekkel vagy felszínek közötti polimerizációval állítunk elő, például hidroximetil-cellulóz, zselatin vagy poli-metilmetakrilát mikrokapszulákba, koloid drogszállító rendszerekbe (például liposzómákba, albumin-mikrogömbökbe, mikroemulziókba, nanorészecskékbe és nanokapszulákba), vagy makroemulziókba. Ilyen módszereket ismertetnek a „Remington's Pharmaceutical Sciences” irodalmi helyen (mint fent).

Az *in vivo* beadásra alkalmazott parenterális kiszerezéseknek sterilnek kell lenniük. Ezt könnyen elérhetjük például sterilre szűrő membránokon keresztül történő szűréssel.

Fenntartott felszabadulású készítmények

A fenntartott felszabadulású készítmények alkalmas példái közé tartoznak a találmány szerinti molekulát tartalmazó, szilárd hidrofób polimerekből készült féligáteresztő mátrixai, amelyek formája megfelelő, mint például film vagy mikrokapszula. A fenntartott felszabadulású mátrixok példái közé tartoznak poliészterek, hidrogélek [például poli-(2-hidroxietil-metakrilát) vagy poli-vinilalkohol], polilaktidok, L-glutaminsav és etil-L-glutamát kopolimerjei, nem degradálódó etilénvinil-acetát, degradálódó tejsav-glikolsav kopolimeresek, mint például a ProLease® technológia vagy Lupron Depot® (injektálható mikrogömbök tejsav-glikolsav kopolimerből és leuprolid-acetát), és poli-D-(-)-3-hidroxi-vajsav. Míg a polimerek, mint például etilén-vinilacetát és tejsav-glikolsav lehetővé teszik molekulák hosszú időn keresztül tartó, mint például 100 napon túl tartó felszabadulását, bizonyos hidrogélek rövidebb időn keresztül szabadítanak fel fehérjéket. Amikor a bezárt polipeptidok hosszú időn keresztül megmaradnak a testben, azok denaturálódhatnak vagy aggregálódhatnak a nedvesség miatt 37 °C-on, ami a bi-

ológiai aktivitás elvesztéséhez és az immunogenitás lehetséges változásaihoz vezethet. Racionális stratégiákat dolgozhatunk ki a stabilizációra, a szerepet játszó mechanizmustól függően. Például ha az aggregáció mechanizmusáról felismerjük, hogy az intramolekuláris S-S kötések kialakulása tio-diszulfid kicserélődésen keresztül, a stabilizálást elérhetjük a szulfhidril-oldalláncok módosításával, savas oldatokból történő liofilizálással, a nedvesség-tartalom szabályozásával, megfelelő adalékanyagok alkalmazásával, és specifikus polimer-mátrix készítmények kifejlesztésével.

Pulmonáris bejuttatás

A nebulizátorral — akár sugárhajtású, akár ultrahangos — való alkalmazásra alkalmas konjugátum vagy polipeptid kisserelések tipikusan a molekulát vízben feloldva tartalmazzák, például körülbelül 0,01 és 25 mg konjugátum per ml közötti koncentrációban, előnyösen körülbelül 0,1 és 10 mg/ml között. A kisserelés tartalmazhat puffert és egyszerű cukrot is (például a fehérje stabilizálására és az ozmózisnyomás szabályozására), és/vagy humán szérumalbumint, 0,1 és 10 mg/ml közötti tartományban. Az alkalmazható pufferek példái a nátrium-acetát, citrát és glicin. Előnyösen a puffer összetétele és molaritása alkalmas az oldat pH-jának beállítására 3 és 9 közötti pH tartományban. Általában a 1 mM és 50 mM közötti puffer-molaritások megfelelőek erre a célra. Az alkalmazható cukrok példái a laktóz, maltóz, mannitol, szorbitol, trehalóz és xilóz, a kisserelés tömegének általában 1% és 10% közötti mennyiségében.

A nebulizátoros kisserelés tartalmazhat felületaktív anyagot is, hogy csökkentjük vagy megakadályozzuk a fehérje felületen indukált aggregációját, amelyet az aeroszol kialakulásakor az oldat atomizációja okoz. Különböző hagyományos felületaktív anyagokat alkalmazhatunk, mint például polioxietilén-zsírsav-észtereket és -alkoholokat, és polioxietilén-szorbitán-zsírsav-észtereket. A mennyiségük általában a 0,001 és 4 tömeg% közötti tartományba eshet. Egy különösen előnyös felületaktív anyag a találmány céljaira a polioxietilén-szorbitán-monooleát.

A találmány szerinti folyékony részecskék alkalmas diszperzióinak az előállítására szolgáló specifikus kissereléseket és eljárásokat tárnak fel az alábbi irodalmi helyeken: WO 94/20069. számú nemzetközi közzétételi irat, 5 915 378., 5 960 792., 5 957 124., 5 934 272., 5 915 378., 5 855 564., 5 826 570. és 5 522 385. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok, amelyek hivatkozás útján a kitanítás részét képezik.

A találmány gyakorlatba vétele szempontjából kereskedelmi forgalomban kapható nebulizátorok három specifikus példája az *Ultravent* nebulizátor, amelyet a Mallinckrodt, Inc. cég gyárt (St. Louis, Mo.), az *Acorn II* nebulizátor, amelyet a Marquest Medical Products cég

gyárt (Englewood, Colorado), és az *AERx pulmonary drug delivery system*, amelyet az Aradigm Corporation cég gyárt (Hayward, California).

A mért dózisú inhalátor eszközzel alkalmazható találmány szerinti kiszerezések általában finom eloszlású port tartalmaznak. Ezt a port liofilizálással állíthatjuk elő, majd folyékony
5 kiszérés elkeverésével, és tartalmazhat stabilizálószer is, mint például humán szérumalbumint (HSA). Tipikusan több mint 0,5% (w/w) HSA-t alkalmazunk. Ezenfelül szükség esetén egy vagy több cukrot vagy cukoralkoholt is hozzáadhatunk a készítményhez. A példák közé tartozik laktóz, maltóz, mannitol, szorbitol, szorbitóz, trehalóz, xilitol és xilóz. A kiszéréshez hozzáadott mennyiség a jelenlévő konjugátumhoz képest körülbelül 0,01 és 200% (w/w) közötti
10 tartományba esik, előnyösen megközelítőleg 1 és 50% közötti. Ilyen kiszerezéseket azután liofilizálunk és őrlünk a kívánt részecskeméretre.

A megfelelően méretezett részecskéket azután hajtóanyagban felfuszpendáljuk felületaktív anyag segítségével. A hajtógáz lehet bármilyen erre a célra hagyományosan alkalmazott anyag, mint például klorofluorokarbon, hidroklorofluorokarbon, hidrofluorokarbon vagy szén-
15 hidrogén, beleértve triklorofluorometánt, diklorodifluorometánt, diklorotetrafluoroetanolt és 1,1,1,2-tetrafluoroetánt, vagy ezek kombinációit. A megfelelő felületaktív anyagok közé tartozik a szorbitán-trioleát és szójalecitin. Az olajsav is hasznos felületaktív anyag lehet. Ezt a keveréket töltjük azután be a bejuttató eszközbe. A találmány szerint alkalmas kereskedelmi forgalomban kapható mért dózisú inhalátor a *Ventolin* mért dózisú inhalátor, amelyet a Glaxo Inc.
20 cég gyárt (Research Triangle Park, N. C.).

A port tartalmazó inhalátorok finom eloszlású port tartalmazhatnak, amely az IFNB molekulát tartalmazza, és tartalmazhat térfogatnövelő ágenst is, mint például laktózt, szorbitolt, szukrózt vagy mannitolt olyan mennyiségben, amely elősegíti a pornak az eszközből történő kiszórását, például a kiszérés tömegének 50% és 90% közötti mennyiségében. A por részecskéinek aerodinamikusnak kell lenniük a tüdőben, ami megfelel körülbelül 1 g/cm³ sűrűségű és kisebb, mint 10 µm medián átmérőjű részecskéeknek, előnyösen 0,5 és 5 µm között, legelőnyösebben 1,5 és 3,5 µm között.

A találmány szerinti kitanításnak megfelelő alkalmazásra alkalmas port tartalmazó inhalátor egy példája a *Spinhaler* port tartalmazó inhalátor, amelyet a Fisons Corp. cég gyárt
30 (Bedford, Mass.).

Az ezekben az eszközökben alkalmazható port az alábbi irodalmi helyeken feltárt eljárásokkal állíthatjuk elő és/vagy juttathatjuk be: 5 997 848., 5 993 783., 5 985 248., 5 976 574.,

5 922 354., 5 785 049., 6 123 936. és 5 565 407. számú amerikai egyesült államokbeli szabaldalmi iratok.

A találmány szerinti molekulát tartalmazó gyógyászati készítményt különféle, terápiás termékek pulmonáris beadására tervezett mechanikus eszközökkel adhatjuk be, nem korlátozó példákként nebulizátorokkal, mért dózisú inhalátorokkal, és port tartalmazó inhalátorokkal, amelyek mindegyike ismerős a szakember számára.

A találmány gyakorlatba vétele szempontjából kereskedelmi forgalomban kapható eszközök néhány példája az *Ultravent* nebulizátor, amelyet a Mallinckrodt, Inc. cég gyárt (St. Louis, Missouri); az *Acorn II* nebulizátor, amelyet a Marquest Medical Products cég gyárt (Englewood, Colorado); a *Ventolin* mért dózisú inhalátor, amelyet a Glaxo Inc. cég gyárt (Research Triangle Park, North Carolina); a *Spinhaler* port tartalmazó inhalátor, amelyet a Fisons Corp. cég gyárt (Bedford, Massachusetts); a „standing cloud” eszköz, amelyet az Inhale Therapeutic Systems, Inc. cég gyárt (San Carlos, California); az *AIR* inhalátor, amelyet az Alkermes cég gyárt (Cambridge, Massachusetts); és az *AERx pulmonary drug delivery system*, amelyet az Aradigm Corporation cég gyárt (Hayward, California).

A találmány szerinti és a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti gyógyászati készítményt egyéb terápiás ágensekkel együtt is beadhatjuk. Ezeket az ágenseket ugyanazon gyógyászati készítmény részeként alkalmazhatjuk, vagy külön adhatjuk be azokat a találmány szerinti IFNB molekulától, akár egyidejűleg, akár bármilyen elfogadható kezelési rend szerint. Ezenfelül a találmány szerinti molekulát vagy gyógyászati készítményt járulékos anyagként alkalmazhatjuk más terápiákban.

Ennek megfelelően a találmány tárgyát készítmények és eljárások képezik a legtöbb típusú vírusos fertőzés, rák vagy tumor vagy tumoros angiogenezis, Chrohn-féle betegség, ulceratív kolitisz, Guillain-Barré szindróma, glióma, idiopátiás pulmonáris fibrózis, abnormális sejtnövekedés kezelésére, vagy bármilyen alkalmas állapot, előnyösen emlős, és különösen ember immunmodulációjára. Például a találmány szerinti vagy a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti molekulát vagy készítményt alkalmazhatjuk az alábbiak kezelésére: oszteoszarkóma, bazális sejt karcinóma, petefészek karcinóma, cervikális diszplázia, cervikális karcinóma, laringeális papillomatózis, mikózis fungoides, glióma, akut mieloid leukémia, multiplex mielóma, Hodgkin-féle betegség, melanóma, emlőkarcinóma, nem kisesejtű tüdőrák, rosszindulatú melanóma (adjuváns, késői fázisú, valamint profilaktikus), karcinoid daganat, B-sejtes limfóma, T-sejtes limfóma, follikuláris limfóma, Kaposi-szarkóma, krónikus mielogen leukémia, renális sejt karcinóma, visszatérő felszíni húgyhólyagrak, kolorektális

karcinóma, boholysejt leukémia, és virális fertőzések, mint például papillóma vírus, virális hepatitisz, genitális herpesz, *Herpes zoster*, herpeszes keratitisz, *Herpes simplex*, virális encefalitisz, citomegalovírus tüdőgyulladás, rinovírus krónikus perzisztens hepatitisz, krónikus aktív HCV (I-es típus), krónikus aktív HCV (II-es típus) és krónikus hepatitisz B.

5 Ebben a vonatkozásban a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti konjugátum vagy annak jelen találmány szerinti variánsa alkalmazható CML monoterápiában vagy *cytarabine*-vel kombinálva, B-sejtes limfóma monoterápiájára, vagy doxorubicin-alapú kezelési rendekkel kombinálva, follikuláris limfóma terápiára CHOP-szerű kezelési rend járulékos anagaként, hepatitisz C monoterápiára, vagy ribavirinrel kombinálva,
10 multiplex mieloma monoterápiájára vagy VBMCP-vel, BCNU-val vagy VBMCP + HiCy-vel kombinálva, vagy renális karcinóma monoterápiájára vagy vinblasztinnal, floxuridinnel, 5-fluorouracillal vagy IL-10-zel kombinálva.

Közelebbről a találmány szerinti molekulát vagy készítményt alkalmazhatjuk az alábbiak kezelésére: szklerózis multiplex (MS), mint például az MS négy általánosan elismert típusának bármelyikének kezelésre [jóindulatú, visszatérő eltűnő MS (RRMS), elsődleges progresszív MS (PPMS) és másodlagos progresszív MS (SPMS) és monoszimptomatikus MS], rák vagy daganatok, hepatitisz, például hepatitisz B és hepatitisz C, vagy herpesz fertőzés (ez utóbbi kezelést adott esetben kombinálhatjuk IL-10-zel történő kezeléssel).

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás IFNB 1a, mint például Avonex™ vagy Rebif®, vagy 1b, mint például Betaseron® elleni keringő ellenanyagokkal rendelkező emlős kezelésére, amely szerint az ilyen ellenanyagokkal szemben csökkent reakciójú vagy azokkal nem reagáló találmány szerinti variánst beadunk. A vegyületet hatásos mennyiségben adjuk be. Az emlős előnyösen ember. A kezelendő emlősök a fent felsorolt betegségek bármelyikében szenvedhetnek, amelyekben az interferon-β hatásos kezelés. Közelebbről a találmány ezen megvalósítási módja jelentőséggel bír szklerózis multiplex (a fent felsorolt típusok bármelyike), hepatitisz vagy rák kezelésében. Ezenfelül a találmány tárgya eljárás interferon-β 1a, mint például Avonex™ vagy Rebif®, vagy 1b, mint például Betaseron® elleni keringő ellenanyagokkal rendelkező emlős kezelésére alkalmazható gyógyászati termék előállítására amely szerint találmány szerinti variánst, amelynek csökkent a reakciója vagy nem reagál az
25 ilyen keringő ellenanyagokkal (például a reakció csökkent legalább 25%-kal, mint például legalább 50%-kal, és előnyösen legalább 75%-kal, mint például körülbelül 100%-kal — azaz nincs reakció) injektálható vagy más módon alkalmazható kiszerelésbe szerelünk ki, amint az részletesen ismertetjük fentebb. A „keringő ellenanyagok” kifejezés alatt olyan ellenanyagokat,
30

különösen semlegesítő ellenanyagokat értünk, amelyek emlőszövetekben keletkeznek kereskedelmi forgalomban kapható IFNB készítmények (Rebif, Betaseron, Avonex) bármelyikével történő kezelés hatására.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya IFNB terápiásan jótékony tulajdonságainak legalább némelyikével rendelkező gyógyászati készítménnyel történő kezelést igénylő páciens (például a leírásban említett, IFNB-vel kezelhető bármelyik betegségben szenvedő páciens) kezelésére szolgáló eljárás, amely szerint találmány szerinti variánst tartalmazó készítményt beadunk, és a kezelésnek csökkentett vagy megszüntetett káros fiziológiai hatásai vannak a kereskedelmi forgalomban kapható IFNB termékekkel végzett kezeléssel összehasonlítva. Egy még további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya ilyen kezelésben alkalmazható gyógyászati készítmény.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti polipeptid variánst kódoló nukleotid-szekvencia alkalmazása is génterápiás alkalmazásokban. Közelebbről jelentős lehet a 'Megnövekedett glikozilációjú variánsok' vagy a 'Specifikus aminosav-szubsztitúciókat tartalmazó variánsok' vagy a 'Variánsok, amelyek fúziós fehérjék' című szakaszokban leírt polipeptideket kódoló nukleotid-szekvencia alkalmazása. A polipeptidek glikozilációját ily módon a génterápia folyamán érjük el, azaz a nukleotid-szekvencia emberi testben történő expressziója után.

A találmány tárgykörébe tartozó génterápiás alkalmazások közé tartozik azon betegségek kezelése, amelyekben a polipeptidtől elvárjuk, hogy hatásos terápiát biztosít az antivirális aktivitása miatt, például virális betegségekben, beleértve hepatitisz C-t, és különösen HPV-t, vagy más fertőző betegségekben, amelyek reagálnak IFNB-re, vagy fertőző ágensek esetében, amelyek érzékeny IFNB-re. Ezenfelül a találmány szerinti konjugátum vagy polipeptid alkalmazható krónikus gyulladásos demielinációs poliradikuloneuropátia és súlyos nekrotizáló bőrsérülések kezelésében. Ezenkívül a génterápia a találmány tárgykörébe tartozik bármelyik típusú MS kezelésére. Hasonlóképpen a találmány tárgykörébe tartoznak génterápiás alkalmazások immunmodulációra, valamint azon betegségek kezelésére, amelyekben az IFNB-től elvárjuk, hogy hatásos terápiát biztosít az antiproliferatív aktivitása miatt, például daganatokban és rákokban, vagy más olyan állapotokban, amelyeket nemkívánatos sejtproliferáció jellemez, mint például a rezstenózis. Az ilyen génterápia további leírását megtalálhatjuk a WO 95/25170. számú nemzetközi közzétételi iratban.

Az IFNB lokális bejuttatása génterápia alkalmazásával a terápiás ágens a célterületen biztosíthatja, elkerülve a nem specifikus beadással kapcsolatos potenciális toxicitási problémákat.

A találmány tárgykörébe tartoznak *in vitro* és *in vivo* génterápiás módszerek is.

5 Számos eljárás ismert potenciálisan terápiás gének meghatározott sejtpopulációkba történő bejuttatására. További információkért lásd például: Mulligan, „The Basic Science Of Gene Therapy”, Science 260, 926-931. old. (1993). Ezek közé az eljárások közé tartoznak az alábbiak:

10 Közvetlen géntranszfer, például amint azt Wolf és mtsai. feltárják [„Direct Gene transfer Into Mouse Muscle In vivo”, Science 247, 1465-1468. old. (1990)];

Liposzóma-közvetített DNS-transzfer, például amint azt alábbi irodalmi helyeken feltárják: Caplen és mtsai., „Liposome-mediated CFTR Gene Transfer to the Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis”, Nature Med. 3, 39-46. old. (1995); Crystal, „The Gene As A Drug”, Nature Med. 1, 15-17. old. (1995); Gao és Huang, „A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection of Mammalian Cells”, Biochem. Biophys Res. Comm. 179, 280-285. old. (1991);

20 Retrovírus-közvetített DNS-transzfer, például amint azt az alábbi irodalmi helyeken feltárják: Kay és mtsai., „In vivo Gene Therapy of Hemophilia B: Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs”, Science 262, 117-119. old. (1993); Anderson, „Human Gene Therapy”, Science 256, 808-813. old. (1992);

25 DNS-vírus-közvetített DNS-transzfer. Ilyen DNS-vírusok közé tartoznak az adenovírusok (előnyösen az Ad-2 vagy Ad-5 alapú vektorok), herpeszvírusok (előnyösen *Herpes simplex* vírus alapú vektorok), és parvovírusok (előnyösen „defektív” vagy autonóm módon nem replikálódó parvovírus alapú vektorok, előnyösebben adeno-asszociált vírus alapú vektorok, legelőnyösebben AAV-2 alapú vektorok) [lásd például Ali és mtsai., „The Use Of DNA Viruses as Vectors for Gene Therapy”, Gene Therapy 1, 367-384. old (1994); 4 797 368. és 5 139 941. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok].

30 A találmányt részletesebben is bemutatjuk az alábbi példákban. A példákat semmiképpen sem szabad a leírás és az igénypontok általánosságának vonatkozásában korlátozóként értelmezni.



Anyagok és eljárások

Ez a szakasz releváns mind a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés szerinti találmány szerinti kitanítás, mind a jelen találmány kitanítása vonatkozásában.

Anyagok

- 5 HeLa sejtek — American Type Culture Collection (ATCC)
ISRE-Luc (Stratagene, La Jolla, USA)
pCDNA 3.1/hygro (Invitrogen, Carlsbad, USA)
pGL3 alapvektor (Promega)
Humán genomiális DNS (CloneTech, USA)
- 10 DMEM tápközeg: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* tápközeg (DMEM), amely 10% magzati marhaszérumot (Life Technologies A/S, Copenhagen, Denmark) tartalmaz.

Vizsgálati eljárások

Interferon vizsgálati eljárás

- 15 Korábban publikálták azt, hogy az IFNB kölcsönhatásba lép az I-es típusú interferon-receptorokkal HeLa sejteken, és aktiválja azokat. Ennek következtében a transzkripció aktívulódik az *Interferon Stimulated Response Element* (ISRE) elemet tartalmazó promótereken. Ily módon lehetséges az interferon-receptorok agonistáinak szkrínelése HeLa sejtekben elhelyezett ISRE-hez kapcsolt luciferáz jelzőgén (ISRE-Luc) alkalmazásával.

Elsődleges vizsgálati eljárás

- 20 HeLa sejteket együtt transzformálunk ISRE-Luc és pCDNA 3.1/hygro vektorokkal, és sejtklónokat hozunk létre szelekcióval higromicin B-t tartalmazó DMEM tápközegben. A sejtklónokat szkríneljük luciferáz aktivitásra IFNB jelenlétében és hiányában. A legmagasabb stimulált/stimulálatlan arányt mutató luciferáz aktivitását mutató klónokat alkalmazzuk a további vizsgálati eljárásokban.

- 25 A muteinek szkríneléséhez 15000 sejt/mérőhely sejtet oltunk le 96-mérőhelyes tenyésztő mikrotiterlemezre, és éjszakán keresztül inkubáljuk azokat DMEM tápközegben. A következő napon muteineket és jól ismert standardokat adunk a sejtekhez különféle koncentrációkban. A lemezeket 6 órán keresztül inkubáljuk 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában, és azután *LucLite* szubsztrátot (Packard Bioscience, Groningen, The Netherlands) adunk az egyes mérő-
- 30 helyekhez. A lemezeket leragasztjuk, és mérjük a lumineszcenciát *TopCount* luminométerben (Packard) SPC („single photon counting”) üzemmódban. Minden egyes lemez IFNB-vel stimulált mérőhelyeket tartalmaz stimulált kontrollként, és további mormál tápközeget tartalmazó mérőhelyeket tartalmaz stimulálatlan kontrollként. A stimulált/stimulálatlan luciferáz aktivitás

közötti arány szolgál belső standardként a mutein aktivtáshoz és a kísérletek között variációhoz.

Másodlagos vizsgálati eljárás

Jelenleg 18 nem allélikus interferon- α gén és egy IFNB gén van. Ezek a fehérjék átfedő aktivitást mutatnak, és így lényeges annak biztosítása, hogy a muteinek megtartják az IFNB szelektivitását és specifitását.

A β -R1 gént aktiválja az IFNB, de a többi interferon nem. Ily módon a β -R1 transzkripciója az IFNB aktiválás második markereként szolgál, és ezt alkalmazzuk annak biztosítására, hogy a muteinek megtartják az IFNB aktivitást. A β -R1 300 bp hosszúságú, interferon-érzékeny transzkripciót irányító promóter fragmensét [Rani, M. R. és mtsai., JBC 271, 22878-22884. old. (1996)] PCR-rel izoláltuk humán genomiális DNS-ből és pGL3 alapvektorba (Promega) inzeráltuk. A kapott β -R1:luciferáz gént alkalmazzuk a fent leírt elsődleges vizsgálati eljáráshoz hasonló vizsgálati eljárásokban. A kapott β -R1:luciferáz génről leírták, hogy asztrocitóma sejtekben 250-szer érzékenyebb az IFNB-re, mint interferon- α -ra (Rani és mtsai., mint fent).

ELISA vizsgálati eljárás

Az IFNB koncentrációját kereskedelmi forgalomban kapható szendvics immunológiai vizsgálati eljárással határozzuk meg (PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ, USA). A reagenskészlet ELISA-n alapul monoklonális egér anti-IFN- β ellenanyagok alkalmazásával, tesztmintában található IFN- β befogására és detektálására. A detektáló ellenanyag biotinnal van konjugálva.

Tesztmintákat és rekombináns humán IFN- β standardokat adunk 0,1 ml-ben és 10-0,25 ng/ml koncentrációban mikrotiterlemezekhez, amelyek előre be vannak vonva a befogó ellenanyaggal. A lemezeket 1 órán keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten. A mintákat és a standardokat a reagenskészlet hígítópufferében hígítjuk.

A lemezeket mossuk a reagenskészlet pufferével, és inkubáljuk a biotinilált detektáló ellenanyaggal 0,1 ml térfogatban 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. További mosás után hozzáadjuk a sztreptavidin-tormaperoxidáz konjugátumot 0,1 ml térfogatban és 1 órán keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten.

A reakciót 0,1 ml tetrametilbenzidin (TMB) kromogén szubsztrát hozzáadásával tesszük láthatóvá. A lemezeket 15 percen keresztül inkubáljuk sötétben szobahőmérsékleten, és a reakciót leállítjuk leállító oldat hozzáadásával. Az abszorbanciát 450 nm-en mérjük ELISA-leolvasó alkalmazásával.

Receptorkötési vizsgálati eljárás

Találmány szerinti polipeptid vagy konjugátum receptorkötő képességét az „Analysis Of IFN- β (Phe₁₀₁) For Receptor Binding” című WO 95/25170. számú nemzetközi közzétételi iratban feltárt vizsgálati eljárás alkalmazásával határozhatjuk meg (amely Daudi vagy A549 sejte-
 5 ken alapszik). IFNAR1 és IFNAR2 oldható doménjait lényegében az Arduini és mtsai. által leírt módon [Protein Science 8, 1867-1877. old. (1999)] állíthatjuk elő, vagy a jelen leírás 9. példája alapján.

Más megoldásképpen a receptorkötő képességet keresztkötő ágens, mint például diszukcinimidil-szuberát (DSS) alkalmazásával határozhatjuk meg, amelyet a Pierce cégtől szerezhetünk be (Rockford, IL, USA), az alábbiak szerint:
 10

A polipeptidet vagy konjugátumot oldható IFNAR-2 receptorról inkubáljuk DSS jelenlétében vagy hiányában a gyártó utasításait követve. A mintákat SDS-PAGE-n elválasztjuk, és anti-IFNB-t vagy anti-IFNAR2-t alkalmazó Western-blotot hajtunk végre. Működőképes IFNB-polipeptid/konjugátum:receptor kölcsönhatás megléte nyilvánvaló a receptor és IFNB
 15 molekulatömegének DSS jelenlétében való megnövekedéséből.

Ezenfelül találmány szerinti polipeptidet vagy konjugátumot és mindkét receptor-alegységet (IFNAR-1 és IFNAR-2) alkalmazó keresztkötési vizsgálati eljárás megállapíthatja az interferon-receptor-1 kötőképességét. Ezzel kapcsolatban publikálták, hogy az IFNAR-1 csak az interferon- β :IFNAR-2 komplex kialakulása után kötődik [Mogensen és mtsai., Journal
 20 of Interferon and Cytokine Research 19, 1069-1098. old. (1999)].

Interferon- β konjugátumok in vitro immunogenitási tesztelése

Találmány szerinti polipeptid vagy konjugátum csökkent immunogenitását olyan ELISA eljárás alkalmazásával határozzuk meg, amely méri a konjugátum vagy polipeptid immunreaktivitását referencia molekulával vagy készítménnyel szemben. A referencia molekula
 25 vagy készítmény normális esetben rekombináns humán IFNB készítmény, mint például Avonex, Rebif vagy Betaseron, vagy másik rekombináns humán IFNB készítmény, amelyet az ezen termékek előállítására alkalmazottal ekvivalens eljárással állítottak elő. Az ELISA eljárás ezen rekombináns IFNB készítmények egyikével kezelt páciensekből származó ellenanyagokon alapszik. Az immunogenitást csökkentnek tekintjük, amikor a találmány szerinti konjugátum
 30 vagy polipeptid statisztikusan szignifikáns módon alacsonyabb választ ad a vizsgálati eljárásban, mint a referencia molekula vagy készítmény.

Egy másik eljárás az immunogenitás meghatározására IFNB-vel (azaz kereskedelmi forgalomban kapható IFNB termékkel) kezelt páciensekből származó szérum alkalmazása

analóg módon a Ross és mtsai. által leírt eljárással [J. Clin Invest. 95, 1974-1978. old. (1995)]. Az antivirális semlegesítési biológiai vizsgálati eljárásban a csökkent immunogenitás a találmány szerinti konjugátum páciensből származó szérumokkal általi csökkent gátlását eredményezi, összehasonlítva vad típusú IFNB referencia molekulával. Ezenfelül biokémia IFN-kötési vizsgálati eljárásokban egy kevésbé immunogén konjugátum várhatóan kisebb mértékben kötődik páciens IgG-hez, mint referencia IFNB molekulák.

A semlegesítési vizsgálati eljárás esetében, a referencia és konjugátum molekulákat olyan koncentrációban alkalmazzuk, amely megközelítőleg 80%-os védelmet hoz létre a vírussal szemben az antivirális semlegesítési biológiai vizsgálati eljárásban. Az IFNB fehérjét összekeverjük páciensekből származó szérumokkal különböző hígításokban (1:20 aránytól kiindulva).

Antivirális aktivitás

Az antivirális biológiai vizsgálati eljárást A549 sejtek (CCL 185, American Tissue Culture collection) és Enkefalomiokarditisz (EMC) vírus (VR-129B, American Tissue Culture Collection) alkalmazásával hajtjuk végre.

A sejteket leoltjuk 96-mérőhelyes szövettenyésztő mikrotiterlemezre 10000 sejt/mérőhely sűrűségben, és 37 °C-on inkubáljuk 5% CO₂ atmoszférában. Találmány szerinti polipeptidet vagy konjugátumot adunk hozzájuk 100-0,0001 IU/ml koncentrációban összesen 100 µl DMEM-ben, amely magzati borjúsérumot és antibiotikumokat tartalmaz.

24 óra elteltével a tápközeget eltávolítjuk, és 0,1 ml, EMC vírust tartalmazó friss tápközeget adunk az egyes mérőhelyekhez. Az EMC vírust olyan koncentrációban alkalmazzuk, amely 100%-os sejthalált okoz IFN-β-mentes sejtenyészetekben 24 óra elteltével.

További 24 óra elteltével a polipeptid vagy konjugátum antivirális hatását WST-1 vizsgálati eljárás alkalmazásával mérjük. 0,01 ml WST-1-et (*WST-1 cell proliferation agent*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) adunk 0,1 ml tenyészethez, és 1/2-2 órán keresztül inkubáljuk 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában. A WST-1 tetrazólium só mitokondriális dehidrogenázok általi hasítása az életképes sejtekben formazán kialakulását eredményezi, amelynek a mennyiségét az abszorbancia 450 nm-en történő mérésével határozzuk meg.

Az aktivitás semlegesítése 'Interferon Stimulated Response Element' (ISRE) vizsgálati eljárásban

Az IFNB anti-IFNB-szérumokat semlegesítő hatását az ISRE-luciferáz aktivitási vizsgálati eljárás alkalmazásával elemezzük.

IFNB-vel kezelt páciensek vagy immunizált állatok szérumait alkalmazzuk. A szérumokat vagy rögzített koncentrációban [1:20-1:500 (páciens szérum) vagy 20-600 ng/ml (állati szérum)], vagy ötszörös sorozathígításban alkalmazzuk 1/20 hígítástól (páciens szérum) vagy 600 ng/ml koncentrációtól (állati szérum) indulva. Az IFNB-t vagy ötszörös hígításokban adjuk 25000 IU/ml-től kiindulva, vagy rögzített koncentrációban (0,1-10 IU/ml), 80 µl térfogatban (DMEM tápközeg + 10% FCS). A szérumokat 1 órán keresztül inkubáljuk 37 °C-on IFN-β-val.

A mintákat azután átvisszük 96-mérőhelyes szövettenyésztő mikrotiterlemezre, amelyek 24 órán keresztül DMEM tápközegben növesztett, ISRE-Luc vektorral transzfektált HeLa sejteket tartalmaznak (15000 sejt/mérőhely). A lemezeket 6 órán keresztül inkubáljuk 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában. Azután *LucLite* szubsztrátot (Packard Bioscience, Groningen, The Netherlands) adunk az egyes mérőhelyekhez. A lemezeket leragasztjuk, és mérjük a lumineszcenciát *TopCount* luminométerben (Packard) SPC („single photon counting”) üzemmódban.

Amikor az IFNB mintákat rögzített mennyiségű szérum jelenlétében titráljuk, a semlegesítő hatást a gátlás többszöröződésével definiáljuk (FI), az EC₅₀ (szérummal)/EC50 (szérum nélkül) értékkel mérve. A variáns IFNB fehérjék ellenanyag-semlegesítésének a csökkenését az alábbi módon definiáljuk:

$$\left(1 - \frac{\text{FI variáns}}{\text{FI vad típus}}\right) \times 100\%$$

PEG-IFNB konjugátum vagy glikozilált IFNB variánsok biológiai féleletidejének mérése

A biológiai féleletidő mérését az szakirodalomban leírt számos különféle módon végrehajthatjuk. Egyfajta eljárást írnak le Munafo és mtsai. [European Journal of Neurology 5, 187-193. old. (1998)], akik ELISA eljárást alkalmaztak IFNB szérumszintjének a detektálására IFNB szubkután és intramuszkuláris beadása után.

Az IFNB szérumkoncentrációjának gyors csökkenése az i.v. beadás után fontossá tette az IFNB-kezelésre adott biológiai válaszok értékelését. Azonban azt tételezzük fel, hogy a tálmány szerinti konjugátumoknak hosszabb szérum féleletideje lehet i.v. beadás után is, lehetővé téve ezzel annak mérését például ELISA eljárással vagy az elsődleges szkrínelési vizsgálati eljárással.

Különböző farmakodinamikai markereket (például szérumben neopterin és β 2-mikroglobulin) is vizsgáltak [Clin Drug Invest. 18, 27-34. old. (1999)]. Ezeket egyformán jól alkalmazhatjuk az elnyújtott biológiai hatás értékelésére. Ezeket a kísérleteket végrehajthatjuk megfelelő állatfajokban is, mint például patkányokban.

5 Az IFNB biológiai hatásainak, mint például antivirális, antiproliferatív és immunmodulátor hatásainak megállapítására szolgáló vizsgálati eljárások [amint azokat leírják például az Annals of Neurology 37, 7-15. old. (1995) irodalmi helyen] alkalmazhatók együtt a leírás szerinti elsődleges és másodlagos szkrináló vizsgálati eljárásokkal a konjugátum biológiai hatékonyságának az értékelésére a vad típusú IFNB-vel összehasonlítva.

10 Végezetül állati modellt, mint például az általánosan alkalmazott kísérletes autoimmun encephalomyelitis (EAE) modellt alkalmazhatjuk találmány szerinti konjugátum vagy polipeptid hatásosságának megállapítására. Az EAE modellben immunizálás mielőtt vagy mielőtt eredetű fehérjével olyan betegséget vált ki, amely utánozza az emberi szklerózis multiplex gyulladásos és neurológiai tüneteinek a többségét. Az EAE-t alkalmazták egerekben, patkányokban, nyulakban és selyemmajmokban [Cannella és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 10100-10105. old. (1998), Zaprianova és mtsai., Morfológia 112, 25-28. old. (1997), Hassouna és mtsai., J. Urology, 130, 806-810. old. (1983), Genain és Hauser, J. Mol. Med. 75, 187-197. old. (1997)]. Más modellek, köztük a Theiler-féle egér encephalomyelitis vírus (TMEV) modell [Murray és mtsai., J. Neurosci. 18, 7306-7314. old. (1998)]. is alkalmazható az IFNB konjugátum hatásosságának a megállapítására.

Hozzáférhető felszíni terület (ASA)

Az Access számítógépi program [B. Lee és F. M. Richards, J. Mol. Biol. 55, 379-400. old. (1971)] 2. verzióját (© 1983, Yale University) alkalmazzuk az egyedi atomok hozzáférhető felszíni területének (ASA) a kiszámítására a szerkezetben. Ez az eljárás tipikusan 0,14 nm-es próbaméretet alkalmaz, és a hozzáférhető felszíni területet (ASA) a próba középpontjaként kialakított területként definiálja. Ezt a számítást megelőzően az összes vízmolekulát és hidrogénatomot eltávolítjuk a koordináta-készletből, csakúgy, mint a fehérjéhez nem közvetlenül tartozó egyéb atomokat is. Alternatív programok elektronikusan hozzáférhetők az ASA kiszámítására, például a WhatIf program [G. Vriend, J. Mol. Graph. 8, 52-56. old. (1990)] a <http://swift.emblheidelberg.de/servers2/> internetes címen [R. Rodriguez és mtsai., CABIOS 14, 523-528. old. (1998)], az Accessibility menüpontot alkalmazva a hozzáférhető felszíni terület kiszámítására.

Az oldallánc frakcionális ASA értéke

5 Az oldalláncok frakcionális ASA-értékét az oldalláncot alkotó atomok ASA-összegének és egy kinyújtott ALA-x-ALA tripeptidben található ugyanolyan oldallánc típus atomjainak ASA-értékének a hányadosával számítjuk ki [lásd Hubbard, Campbell és Thornton, J. Mol. Biol. 220, 507-530. old. (1991)]. Ebben a példában a CA atomot az oldallánc részének tekintjük a glicin oldallánc esetében, de a többi oldallánc esetében nem. Az alábbi táblázatban bemutatjuk az oldalláncok standard 100% ASA-értékét:

Ala	0,6923	nm ²
Arg	2,0035	nm ²
Asn	1,0625	nm ²
Asp	1,0206	nm ²
Cys	0,9669	nm ²
Gln	1,4058	nm ²
Glu	1,3461	nm ²
Gly	0,3228	nm ²
His	1,4700	nm ²
Ile	1,3791	nm ²
Leu	1,4076	nm ²
Lys	1,6250	nm ²
Met	1,5608	nm ²
Phe	1,6390	nm ²
Pro	1,1965	nm ²
Ser	0,7816	nm ²
Thr	1,0167	nm ²
Trp	2,1089	nm ²
Tyr	1,7661	nm ²
Val	1,1414	nm ²

10 Felszíni kitettségű aminosav-oldalláncok meghatározása

A humán IFNB 0,22 nm-es felbontású háromdimenziós kristályszerkezete [Karpusas és mtsai., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94, 11813-11818. old. (1997)] hozzáférhető a 'Protein Data Bank'-ban (PDB) [Bernstein és mtsai., J. Mol. Biol. 112, 535. old. (1977)], és elektronikusan

hozzáférhető a 'The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB' szervezeten keresztül a <http://www.pdb.or> internetes címen az 1AU1 hozzáférési kód alatt. Ez a kristályszerkezet két független humán IFNB molekulát tartalmaz; ebben a példában az A jelű molekulát alkalmazzuk.

5 Felszíni kitettség:

A fent ismertetett módon a *WhatIf* programot alkalmazva az alábbi oldalláncokról tá-
láltuk azt, hogy zero az oldallánc atomjainak a felszíni hozzáférhetősége (a Gly esetében a Ca
atom hozzáférhetőségét alkalmazzuk): G7, N14, C17, L21, I44, A55, A56, T58, I59, M62,
L63, L98, L122, Y125, I129, L133, A142, W143, V146, I150, N153, I157, L160, T161 és
10 L164.

Frakcionális felszíni kitettség:

A további elemzéshez a szterikus ütközések miatt szükség volt az R71, R113, K115,
L116, M117 oldalláncok újramodellezésére. Az újramodellezést a *Modeler 98* (MSI Inc.) al-
kalmazásával hajtottuk végre. A frakcionális ASA számításoknak az *Access* számítógépi prog-
15 rammal történő végrehajtása az újramodellezett IFNB molekulán (csak az aminosav-
oldalláncokat figyelembe véve, és kizárva az N-kapcsolt cukor-molekuláreszeket) az alábbi ol-
dalláncokat eredményezte, amelyek esetében az oldalláncnak több mint 25%-a felszíni
kitettségű: S2, N4, L5, F8, L9, R11, S12, F15, Q16, Q18, K19, W22, Q23, G26, R27, L28,
E29, Y30, L32, K33, R35, M36, N37, D39, E42, K45, Q46, L47, Q48, Q49, Q51, K52, Q64,
20 A68, R71, Q72, D73, S75, S76, G78, N80, E81, T82, E85, N86, A89, Y92, H93, N96, H97,
K99, T100, E103, E104, K105, E107, K108, E109, D110, F111, R113, G114, K115, L116,
S119, L120, H121, K123, R124, G127, R128, L130, H131, K134, A135, K136, E137, Y138,
S139, H140, V148, R152, Y155, N158, G162, Y163, R165 és N166, és az alábbi oldalláncok
esetében az oldalláncnak több mint 50%-a felszíni kitettségű: N4, L5, F8, S12, F15, Q16, K19,
25 W22, G26, R27, E29, Y30, K33, R35, N37, D39, E42, Q46, Q48, Q49, Q51, K52, R71, D73,
S75, G78, N80, E81, T82, E85, N86, A89, Y92, H93, K99, T100, E103, E104, E107, K108,
D110, F111, L116, K123, R124, G127, H131, K134, E137, V148, Y155, R165 és N166.

1. példa (a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés 1. példája)

30 IFNB emlős és rovarsejtekben történő expresszáltatására szolgáló expressziós kazetta
tervezése

Az M28622 GenBank elérési számú DNS-szekvenciát (amelyet az 1. azonosítószámú
szekvencián mutatunk be), amely tartalmazza a humán IFNB teljes hosszúságú cDNS-ét a na-

tív szignálpeptidjével, módosítottuk annak érdekében, hogy elősegítsük a magas szintű expresszióját emlőssejtekben. Először az ATG startkodon környezetét módosítottuk a Kozak-féle konszenzus szekvencia szerint [Kozak, M. J. Mol. Biol. 196, 947-950. old. (1987)], oly módon, hogy tökéletes illeszkedés legyen a konszenzus szekvenciával az ATG startkodonról a leolvasással ellentétes irányban. Másodszor a natív humán IFNB kodonjait módosítottuk eltolva a kodonhasználatot a magas szinten expresszálandó humán génekben gyakran előforduló kodonok irányába. Azt követően a szekvencia bizonyos nukleotidjait szubsztituáltuk másokkal annak érdekében, hogy DNS restrikciós endonukleázok felismerési helyeit építsük be (ez lehetővé teszi a DNS-szekvencia későbbi könnyebb módosítását). Láncindítókat terveztünk oly módon, hogy géneket meg tudjuk szintetizálni:

CBProFpr1:

5'-GGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTCGCCACCATGACCAACAAGTGCCTGCT
CCAGATCGCCCTGCTCCTGT-3',

CBProFpr2:

15 5'-ACAACCTGCTCGGCTTCCTGCAGAGGAGTTCGAACTTCCAGTGCCAGAA
GCTCCTGTGGCAGCTGAACGG-3',

CBProFpr3:

5'-GAACTTCGACATCCCCGAGGAAATCAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAG
GAGGACGCCGCTCTGACCATC-3',

20 *CBProFpr4:*

5'-TTCCGCCAGGACTCCAGCTCCACCGGTTGGAACGAGACCATCGTGGAGA
ACCTGCTGGCCAACGTGTACC-3',

CBProFpr5:

25 5'-AGGAGAAGCTGGAGAAGGAGGACTTCACCCGCGGCAAGCTGATGAGCT
CCCTGCACCTGAAGCGCTACTA-3',

CBProFpr6:

5'-GGAGTACAGCCACTGCGCCTGGACCATCGTACGCGTGGAGATCCTGCGC
AACTTCTACTTCATCAACCGC-3',

CBProFpr9:

30 5'-CACCACACTGGACTAGTGGATCCTTATCAGTTGCGCAGGTAGCCGGTCA
GGCGGTTGATGAAGTAGAAGT-3',

CBProFpr10:

5'-AGGCGCAGTGGCTGTACTCCTTGGCCTTCAGGTAGTGCAGGATGCGGCC

ATAGTAGCGCTTCAGGTGCAG-3',

CBProFpr11:

5'-CTCCTTCTCCAGCTTCTCCTCCAGCACGGTCTTCAGGTGGTTGATCTGGT
GGTACACGTTGGCCAGCAGG-3',

5 *CBProFpr12:*

5'-GAGCTGGAGTCCTGGCGGAAGATGGCGAAGATGTTCTGCAGCATCTCGT
AGATGGTCAGAGCGGCGTCCT-3',

CBProFpr13:

10 5'-CCTCGGGGATGTCGAAGTTCATCCTGTCCTTCAGGCAGTACTCCAGGCGC
CCGTTTCAGCTGCCACAGGAG-3',

CBProFpr14:

5'-CAGGAAGCCGAGCAGGTTGTAGCTCATCGATAGGGCCGTGGTGCTGAAG
CACAGGAGCAGGGCGATCTGG-3',

15 A láncindítókat szintetikus génné állítottuk össze egy lépéses PCR-rel a *Platinum Pfx polymerase* reagenskészlet (Life Technologies) és szokásos háromlépéses PCR-ciklizálási paraméterek alkalmazásával. Az összeállított gént PCR-rel amplifikáltuk ugyanazon paraméterek alkalmazásával.

20 A humán IFNB N-terminálisát kódoló cDNS-t a fent leírtakkal megegyező PCR körülmények között szintetizáltuk meg, de a CBProFpr1 és -14 láncindítókat az alábbi láncindítókkal helyettesítettük:

CBProRpr7:

5'-CTGCTCCAGATCGCCCTGCTCCTGTGCTTCAGCACACCACGGCCCTATCGAT
GAAGCACCAAGCAGCAGCATC-3',

CBProFpr8:

25 5'-CACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCC
AAGCTGGCTAGCGTTTAAAC-3',

CBProFpr15:

5'-CAGGAAGCCGAGCAGGTTGTAGCTCATCTGTTGGTGTGATGTTGGTG
TGATGCTGGTGCTGGTGCTTC-3',

30 *CBProFpr16:*

5'-AGCAGGGCGATCTGGAGCAGGCACTTGTTGGTCATGGTGGCGAAGCTTA
AGTTTAAACGCTAGCCAGCTT-3',

annak érdekében, hogy tisztítási címkét építsünk be az IFNB molekulába.

A megsztetizált géneket pcDNA3.1/Hygro vektorba (Invitrogen) klónoztuk be az 5' vég HindIII helye és a 3' BamHI helye között, előállítva a pCBProF1 és pCBProF2 plazmidokat.

A pCI-Neo vektor (Promega) szintetikus intronját a fent leírt szokásos PCR körülmények között amplifikáltuk fel az alábbi láncindítókkal:

CBProFpr37:

5'-CCGTCAGATCCTAGGCTAGCTTATTGCGGTAGTTTATCAC-3',

CBProFpr38:

5'-GAGCTCGGTACCAAGCTTTTAAGAGCTGTAAT-3',

ami egy 332 bp PCR-fragmenst eredményezett, amelyet elhasítottunk NheI és HindIII enzimekkel, és az pCBProF1 és pCBProF2 plazmidok 5'UTR régiójába inzeráltuk be, előállítva a pCBProF4 és pCBProF5 plazmidokat.

Az egyes aminosavak kodonjait a kódoló régió releváns régiójának PCR-rel történő amplifikálásával változtattuk meg oly módon, hogy a szekvencia PCR-rel beépített változtatásait klasszikus klónozási módszerekkel építhetjük az expressziós plazmidokba. Például az alábbi láncindítókat:

Lys45arg-5' láncindító (NarI/KasI):

5'-GCTGAACGGGCGCCTGGAGTACTGCCTGAAGGACAGGATGAACTTCGAC
ATCCCCGAGGAAATCCGCCAGCTGCAGC-3',

Lys45mut-3' láncindító (BsiWI):

5'-TCTCCACGCGTACGATGGTCCAGGCGCAGTGGCTG-3',

alkalmaztuk K45R szubsztitúció beépítésére az 1055. pozíciótól az 1243.-ig terjedő régiót lefedő PCR-fragmensben a pCBProF1 plazmidban. A PCR-fragmenst és a pCBProF1 plazmidot is elhasítottuk NarI és BsiWI enzimekkel, amely mindkettő egyedi hely. A PCR-fragmenst és a pCBProF1 vektor gerincét megtisztítjuk és összeligáljuk, ami az AAG Lys45 kodon helyettesítését eredményezi a CGC Arg kodonnal a pCBProF1 plazmidban.

Ezenfelül SOE (szekvencia túlnyúlás kiterjesztési) PCR-t alkalmaztunk aminosavszubsztitúciók beépítésére. A SOE-PCR-ben először amplifikáltuk az IFNB molekula N-terminális és C-terminális részét egyedi PCR-reakciókban.

Ezekhez az elsődleges PCR-ekhez központi komplementer láncindítókat szintetizáltunk oly módon, hogy a szubsztituálandó kodon(oka)t a kívánt kodon(ok)re cseréltük. A terminális láncindítók az IFNB molekula N- és C-terminálisának megfelelő szokásos láncindítók. Ezenfelül a terminális láncindítók restrikciós enzim helyeket tartalmaztak, lehetővé téve a teljes

hosszúságú PCR-termék későbbi klónozását. Ily módon a központi (nem-szensz) láncindítót és az N-terminális (szensz) láncindítót alkalmaztuk az IFN- β kódoló régiójának N-terminális részének az amplifikálására az egyik elsődleges PCR-ben, és ekvivalens módon a C-terminális rész esetében. Ha egyszer felamplifikáltuk, az N- és C-terminális részeket teljes hosszúságú termékké állítottuk össze egy másodlagos PCR-ben, és beklónoztuk a pCDNA3.1/Hygro módosított verziójába, amint azt fent leírtuk. Például az alábbi láncindítókat alkalmaztuk az F111N és R113T szubsztitúciók mutációinak beépítésére:

CBProFprimer9 (szensz):

CACCACACTGGACTAGTGGATCCTTATCAGTTGCGCAGGTAGCCGGTCAGG

10 CGGTTG ATGAAGTAGAAGT,

CBProFprimer231 (antiszensz):

CATCAGCTTGCCGGTGGTGTGTCCTCCTTC,

CBProFprimer230 (szensz):

GAAGGAGGACAACACCACCGGCAAGCTGATG,

15 *CBProFprimer42* (antiszensz):

CACACTGGACTAGTAAGCTTTTATCAGTTGCGCAGGTA6C.

Ezenfelül az olyan esetekben, amikor a beépített mutáció(k) elegendően közel voltak egyedi restrikciós endonukleáz helyekhez az expressziós plazmidban, variáns géneket állítottunk elő egyetlen PCR-lépést és azt követő klónozást tartalmazó konstrukciós eljárás alkalmazásával. Például a K19R szubsztitúciót az alábbi PCR-láncindítók alkalmazásával építettük be:

CBProFpr58:

GAGGAGTTCGAACTTCCAGTGCCAGCGCCTCCTGTGGCAGCTGAACG, and

CBProFprimer9:

A PCR-terméket azt követően a BsiWI és BstBI restrikciós endonukleáz helyek alkalmazásával klónoztuk meg.

2. példa (a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés 5. példája)

Egy darab beépített glikozilációs helyet tartalmazó IFNB variáns konstrukciója és expresszáltatása

30 Annak érdekében, hogy egy extra N-kapcsolt glikozilációs helyet építsünk be a 111. pozícióban a hINF- β -ba, a hINF- β -t kódoló szintetikus gént (hinf- β) (amit az 1. példában írtunk le) megváltoztattuk helyspecifikus PCR-mutagenézissel. A BIO-X-ACT (Bioline, UK) és a PF050 [hinf- β]/pcDNA3.1(-)Hygro/Intron] plazmid — amely a pcDNA3.1(-)Hygro

(Invitrogen, USA) származéka, amelybe beinertáltuk a pCI-neo plazmidból (Promega, USA) származó kiméra intront a BamHI és NheI helyek között a vektor MCS-ébe — templátként történő alkalmazásával két PCR-reakciót hajtottunk végre két átfedő láncindító-készlettel:

/CB41 (5'-TTTAACTGGATCCAGCCACCATGACCAACAAG-3')

5 /CB55 (5'-CGGCCATAGTAGCGCTTCAGGTGCAGGGAGCTCATCAGCTTGCC
GGTGGTGTGTCCTCCTTC-3') és

CB42/CB86 (5'-GAAGGAGGACAACACCACCGGCAAGCTGATGAGCTCCCTGC
ACCTGAAGCGCTACTATGGCCG-3'),

10 sorrendben 446 és 184 bázispár hosszúságú fragmenseket eredményezve. Ezt a két
fragmenst állítottuk össze egy harmadik PCR-ben a szegélyező CB41 és CB42 láncindítók al-
kalmazásával. A kapott gént beinertáltuk a pcDNA3.1(-)Hygro/Intron emlős expressziós
vektorba, és igazoltuk DNS-szekvenálással, hogy tartalmazza a helyes bázisváltozásokat,
amelyek az F111N és R113T szubsztitúciókhoz vezetnek a hINF- β -ban (ezt a plazmidot
PF085-nek nevezzük).

15 Az [F111N+R113T]hINF- β variáns aktivitásának tesztelésére a PF085 plazmidot
transzfektáltuk CHO K1 sejtvonalba (ATCC #CCL-61) *Lipofectamine 2000* reagens (Life
Technologies, USA) transzfekciós ágensként történő alkalmazásával. 24 óra elteltével a te-
nyészti tápközeget begyűjtöttük, és mértük az IFN- β aktivitását/koncentrációját:

20 Aktivitás: 56046 IU/ml [elsődleges vizsgálati eljárás]
ELISA: 80 ng/ml
Specifikus aktivitás: 7×10^8 IU/mg

25 Amint látható, az [F111N+R113T]hINF- β variánsnak nagyon magas a specifikus akti-
vitása, körülbelül kétszerese a vad típusú hINF- β specifikus aktivitásának.

3. példa (a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés 6. példája)

**Egy másik beépített glikozilációs helyet [Q49N+Q51T] tartalmazó IFNB variáns
konstrukciója és expresszálatása**

30 A 2. példában leírttal analóg módon egy extra N-kapcsolt glikozilációs helyet építetünk
be a 49. pozícióban a Q49N és Q51T szubsztitúciók révén. A PF043 [*hinf*- β /pcDNA3.1
(Invitrogen, USA)] templátként történő alkalmazásával két PCR-reakciót hajtottunk végre két
átfedő láncindító-készlettel:

[PBR7]/PBR78 (5'-GGCGTCCTCCTTGGTGAAGTTCTGCAGCTG-3') és
/PBR8 (5'-ATATATCCCAAGCTTTTATCAGTTGCGCAGGTAGCCGGT-3')
/PBR77 (5'-CAGCTGCAGAACTTCACCAAGGAGGACGCC-3'),

5 sorrendben 228 és 369 bázispár hosszúságú fragmenseket eredményezve. Ezt a két fragmenst állítottuk össze egy harmadik PCR-ben a szegélyező PBR7 és PBR8 láncindítók alkalmazásával. A kapott gént beinertáltuk a pcDNA3.1(-)Hygro/Intron emlős expressziós vektorba, és igazoltuk DNS-szekvenálással, hogy tartalmazza a helyes bázisváltozásokat, amelyek a [Q49N,Q51T]hINF- β -hoz vezetnek (ezt a plazmidot PF104-nek nevezzük).

10 A [Q49N+Q51T]hINF- β variáns aktivitásának tesztelésére a PF104 plazmidot transzfektáltuk CHO K1 sejtvonalba *Lipofectamine 2000* reagens (Life Technologies, USA) transzfekciós ágensként történő alkalmazásával. 24 óra elteltével a tenyésztő tápközeget begyűjtöttük, és mértük az IFN- β aktivitását/koncentrációját:

15	Aktivitás:	17639 IU/ml [elsődleges vizsgálati eljárás]
	ELISA:	10 ng/ml
	Specifikus aktivitás:	$1,7 \times 10^9$ IU/mg

20 Amint megfigyelhető, a [Q49N+Q51T]hINF- β variánsnak magas a specifikus aktivitása. Ez az ELISA-ban alkalmazott monoklonális ellenanyagok egyikének gyenge felismerése miatt lehet.

4. példa (a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés 7. példája)

Két beépített glikozilációs helyet tartalmazó IFNB konstrukciója és expresszáltatása

25 A 2. és 3. példában leírt glikozilációs helyeket építettük be humán IFNB-be a Q49N, Q51T, F111N és R113T szubsztitúciók révén.

A PF085 (amint a 2. példában írtunk le) templátként történő alkalmazásával két PCR-reakciót hajtottunk végre két átfedő láncindító-készlettel:

[PBR89 (5'-CGCGGATCCAGCCACCATGACCAACAAGTGCCTG)
/PBR78 és PBR8/PBR77],

30 sorrendben 228 és 369 bázispár hosszúságú fragmenseket eredményezve.

Ezt a két fragmenst állítottuk össze egy harmadik PCR-ben a szegélyező PBR89 és PBR8 láncindítók alkalmazásával. A kapott gént beinertáltuk a pcDNA3.1(-)Hygro/Intron emlős expressziós vektorba, és igazoltuk szekvenálással, hogy tartalmazza a helyes bázisválto-

zásokat, amelyek a [Q49N,Q51T,F111N,R113T]hINF- β -hoz vezetnek (ezt a plazmidot PF123-nak nevezzük).

A PF123 plazmidot CHO K1 sejtekbe transzfektáltuk *Fugene 6* (Roche) transzfekciós ágenskén történő alkalmazásával. 24 óra elteltével a tenyésztő tápközeget begyűjtöttük, és
5 mértük az IFN- β aktivitását/koncentrációját:

Aktivitás: 29401 IU/ml [elsődleges vizsgálati eljárás]

ELISA: 14 ng/ml

Specifikus aktivitás: $2,1 \times 10^9$ IU/ml

10

Amint megfigyelhető, a [Q49N+Q51T+F111N+R113T]hINF- β variánsnak szintén magas a specifikus aktivitása.

Azt találtuk, hogy a variánsnak van receptorkötő aktivitása az 'Anyagok és eljárások' szakaszban leírt receptorkötési vizsgálati eljárással mérve, amely a DSS keresztkötő ágens al-
15 kalmazásán alapszik.

5. példa (a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés 8. példája alapján)

A [Q49N+Q51T+F111N+R113T]IFNB glikozilációs variáns előállítása 'Roller Bottle' edényekben

20 A [Q49N+Q51T+F111N+R113T] glikozilációs variánst termelő CHOK1 szubklónt (5/G-10) leoltottuk két 'roller bottle' edénybe (Corning, USA) — amelyek mindegyikének 1700 cm^2 volt a felülete — 200 ml, 10% FBS-sel és penicillin/sztreptomicinnel (P/S) kiegészített DMEM/F-12 (Life Technologies; kat. sz. 31330) tápközegetbe. Két nap elteltével a tápközeget kicseréltük. További két nap elteltével a 'roller bottle' edények közel 100%-ban
25 konfluensek voltak, és a tápközeget átcsereztük 300 ml, 1/500 *EX-CYTE*-tal (Serologicals Proteins; kat. sz. 81129N) és P/S-sel kiegészített szérummentes *UltraCHO* tápközegetre (BioWhittaker; kat. sz. 12-724). A sejteknek ebben a tápközegetben történő tenyésztése elősegíti a magasabb sejttömeg kialakulását, magasabbat, mint ami a szérumot tartalmazó tápközegettel elérhető. Két nap elteltével a tápközeget megújítottuk. További két nap elteltével a
30 tápközeget lecseréltük termelési tápközegetre: DMEM/F-12 tápközeget (Life Technologies; kat. sz. 21041), kiegészítve 1/100 ITSA-val (Life Technologies; kat. sz. 51300-044) [az ITSA jelentése: Inszulin (1,0 g/L) — Transzferrin (0,55 g/L) — Szelén (0,67 mg/L) kiegészítő Adherens tenyészetekhez], 1/500 *EX-CYTE*-tal és P/S-sel. A két 'roller bottle' edényből be-

gyűjtött tápközegeket összeöntöttük, mielőtt egy tápközeg mintát kivettünk az IFNB aktivitásának meghatározásához.

6. példa (a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés 9. példája)

A K19R+K45R+K123R IFNB variáns előállítása, tisztítása és PEG-ilálása

100 ml, a K19R+K45R+K123R IFNB variánst tartalmazó szérumentes tápközeg előállításához 3 darab T-175 edényt oltottunk be COS-7 sejtekkel, 10% FBS-sel és glutaminnal és penicillin/sztreptomicinnel kiegészített DMEM tápközegben (Life technologies; kat. sz. 21969-035). A transzfekció napján (közel 100%-os konfluenciánál) a tápközeget felújítottuk 30 ml friss tápközeggel 4-5 órával a transzfektálás előtt. A transzfekció előkészítéséhez 1890 µl, kiegészítők nélküli DMEM tápközeget osztottunk szét 14 ml-es polipropilén csövekbe (Corning). 210 µl *Fugene 6* reagenst (Roche) adtunk közvetlenül a tápközegbe, és 5 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Eközben 168 µg plazmid DNS-t ([K19R,K45R,K123R]INF-β/pcDNA3.1(-)Hygro; PF#161) osztottunk szét egy másik 14 ml-es polipropilén csöbe. 5 perc inkubálás elteltével a *Fugene 6* keveréket közvetlenül hozzáadtuk a DNS-oldathoz, és 15 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az inkubálás után körülbelül 700 µl-t adtunk cseppenként a három sejtes tápközeg mindegyikéhez.

Másnap a transzfekciós tápközeget helyettesítettük 35 ml szérumentes termelő tápközeggel. A szérumentes tápközeg DMEM tápközegen alapul (Life Technologies; kat. sz. 31053-028), kiegészítve glutaminnal, nátrium-piruváttal, penicillin/sztreptomicinnel, 1% ITSA-val (Life Technologies; kat. sz. 51300-044) és 0,2% *Ex-Cyte*-tal (Serologicals Proteins; kat. sz. 81129). Mielőtt a termelő tápközeget hozzáadtuk, a sejtes réteget kétszer mostuk kiegészítők nem tartalmazó DMEM tápközeggel.

Három nappal a transzfektálás után a 100 ml szérumentes tápközeget begyűjtöttük tisztításhoz és az IFNB variáns PEG-ilálásához. A pH-t 6,8-ra állítottuk be és a vezetőképességet <10 mS/cm értékre állítottuk be *Milli Q* víz alkalmazásával. Azután a tápoldatot 'batch'-ban adszorbeáltuk 1 ml SP 550 kationcserélő gyantára (TosoHaas), amelyet előzetesen ekvilibráltunk A-pufferrel (20 mM foszfát, 100 mM NaCl, pH 7). Két órán keresztül tartó, végtől végig végzett forgatás után a gyantát hagytuk leülepedni, és átvittük egy oszlopba. A gyantát megmostuk 5 oszloptérfogat A-pufferrel, és eluáltuk 2 ml B-pufferrel (20 mM foszfát, 800 mM NaCl, pH 7). Az eluátumot 500 µl-re betöményítettük 5% etilén-glikol hozzáadása után *VivaSpin* eszközön (10 kDa molekulatömeg-vágás). A koncentrátumot beállítottuk 50

mM foszfát, 0,3 M NaCl, 20% etilén-glikol, pH 8 puffer alkalmazásával 2 ml végtérfogatra, és tovább töményítettük 0,5 ml-re.

A végső koncentrátumot az alábbiak szerint PEG-iláltuk: 100 µl végső koncentrátumhoz 25 µl, pH 8-as foszfát pufferben frissen készített aktivált PEG-SPA-t (5000 kDa, Shearwater, Alabama) adtunk a PEG 0, 5, 10, 25 vagy 50 mg/ml végkoncentrációjára beállítva. A reakciót hagytuk folyni 30 percen keresztül szobahőmérsékleten, és azután leállítottuk 50 mM glicin pufferrel. A mintákat azonnal lefagyasztottuk -80 °C-on, és a leírt módon meghatároztuk a biológiai aktivitásukat (elsődleges vizsgálati eljárás). Elvégeztük az egyes minták Western-blotját annak érdekében, hogy értékeljük a jelenlévő el nem reagált IFNB variáns mennyiségét a PEG-ilált mintában.

Az eredmények azt demonstrálják, hogy 25 mg aktivált PEG/ml koncentrációnál a nem PEG-ilált IFNB variáns hiányzott a Western-blot alapján, és a variáns megtartotta a biológiai aktivitásának az 50%-át a kontroll mintához viszonyítva (amelyet azonosan kezeltünk, de 0 mg/ml aktivált PEG-gel).

7. példa

Megnövekedett szénhidrát-tartalmú variánsok a 49. pozícióban

A 49. pozícióban beépített glikozilációs hely a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés 6. példájában ismertetett [Q49N,Q51T] INFB variánsban csak körülbelül 60%-os kihasználtságú. Annak érdekében, hogy megnöveljük a kapcsolódó szénhidrát mennyiségét, kicseréltük 48. pozícióban található glutamin oldalláncot fenilalaninra (Q48F), valinra (Q48V) és triptofánra (Q48W) helyspecifikus PCR-mutagenézissel. *BIO-X-ACT* (Bioline, UK) és PF185 (a PF185 ugyanazt a cDNS-szekvenciát tartalmazza, mint a 6. példában ismertetett PF104, annak ellenére, hogy a Kozak-szekvenciát az ATG startkodon elé inzertáltuk) templátként történő alkalmazásával a PCR-reakciókat az alábbi láncindító-készletek alkalmazásával hajtottuk végre:

Q48F,Q49N, Q51T

PBR89 (5'-CGCGGATCCAGCCACCATGACCAACAAGTGCCTG)

/PBR148 (5'-GTCCTCCTTGGTGAAGTTGAACAGCTGCTT) és

PBR8 (5'-ATATATCCCAAGCTTTTATCAGTTGCGCAGGTAGCCGGT-3')

/PBR147 (5'-AAGCAGCTGTTCAACTTCACCAAGGAGGAC)

Q48V,Q49N,Q51T

PBR89 (5'-CGCGGATCCAGCCACCATGACCAACAAGTGCCTG)

/PBR150 (5'-GTCCTCCTTGGTGAAGTTCACCAGCTGCTT) és

PBR8 /PBR149 (5'-AAGCAGCTGGTGAAGTTCACCAAGGAGGAC)

Q48W,Q49N,Q51T

PBR89 (5'-CGCGGATCCAGCCACCATGACCAACAAGTGCCTG)

/PBR152 (5'-GTCCTCCTTGGTGAAGTTCACAGCTGCTT) és

5 PBR8 /PBR151 (5'-AAGCAGCTGTGGAACTTCACCAAG GAGGAC)

A fragmenseket PCR-reakciókban állítottuk össze a szegélyező PBR89 és PBR8 lán-
indítók alkalmazásával. A kapott géneket beinzertáltuk a pcDNA3.1(-)Hygro/Intron emlős
expressziós vektorba, és igazoltuk szekvenálással, hogy tartalmazza a helyes bázisváltozásokat,
amelyek sorrendben a [Q48F,Q49N,Q51T]hINF- β -hoz (ezt a plazmidot PF305-nek nevezzük),
10 [Q48V,Q49N,Q51T]hINF- β -hoz (ezt a plazmidot PF306-nak nevezzük) és
[Q48W,Q49N,Q51T]hINF- β -hoz (ezt a plazmidot PF307-nek nevezzük) vezetnek.

A PF305, PF306, PF307 és PF185 plazmidokat (amely [Q49N,Q51T]hINF- β -t kódol)
CHO K1 sejtekbe transzfektáltuk *Fugene 6* (Roche) transzfekciós ágenskén történő alkalmazá-
sával. 24 óra elteltével a tenyésztő tápközeget begyűjtöttük, és mértük az IFN- β aktivitását:

15	PF185	134713 IU/ml
	PF305	53122 IU/ml
	PF306	65949 IU/ml
	PF307	45076 IU/ml

20 Annak érdekében, hogy értékeljük a kapcsolódó szénhidrát mennyiségét a három új
glikozilációs variánsban, Western-blotot végeztünk azonos mennyiségű aktivitással minden
sávban (1. ábra; 2., 3., 4. és 5. sáv). Amint az ábrán látható, az aminosavcserék (Q48F, Q48V,
Q48W) mindegyike a beépített glikozilációs hely (Q49N,Q51T) előtt megnövekedett mennyi-
ségű teljesen glikozilált anyaghoz vezetnek.

Egy másik kísérletben azt láttuk, hogy különösen tirozin beépítése a 48. pozícióba
25 megnövekedett mennyiségű szénhidrát kapcsoláshoz vezet a 49. pozícióban beépített N-
kapcsolt glikozilációs helyre.

8. példa

Megnövekedett szénhidrát-tartalmú variánsok a 111. pozícióban

A 111. pozícióban beépített glikozilációs hely a PCT/DK00/00471. számú nemzetközi
30 bejelentés 5. példájában ismertetett [F111N,R113T] INFB variánsban csak körülbelül 50%-os
kihasználtságú. Annak érdekében, hogy megnöveljük a kapcsolódó szénhidrát mennyiségét, ki-
cseréltük 110. pozícióban található glutamin oldalláncot fenilalaninra (D110F) és valinra
(D110V) helyspecifikus PCR-mutagenézissel. *BIO-X-ACT* (Bioline, UK) és PF185 (amelyet a

PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés 5. példájában ismertetünk) templatként történő alkalmazásával a PCR-reakciókat az alábbi láncindító-készletek alkalmazásával hajtottuk végre:

D110F,F111N,R113T

5 PBR89 (5'-CGCGGATCCAGCCACCATGACCAACAAGTGCCTG)
/PBR154 (5'-CAGCTTGCCGGTGGTGTGTAACCTCCTTCTC) és
PBR8 /PBR153 (GAGAAGGAGTTCAACACCACCGGCAAG CTG)

D110V,F111N,R113T

10 PBR89 (5'-CGCGGATCCAGCCACCATGACCAACAAGTGCCTG)
/PBR156 (5'-CAGCTTGCCGGTGGTGTTCACCTCCTTCTC) és
PBR8/PBR 155 (5'-GAGAAGGAGGTGAACACCACCGGCAAGCTG).

A fragmenseket PCR-reakciókban állítottuk össze a szegélyező PBR89 és PBR8 láncindítók alkalmazásával. A kapott géneket beinzertáltuk a pcDNA3.1(-)Hygro/Intron emlős expressziós vektorba, és igazoltuk szekvenálással, hogy tartalmazza a helyes bázisváltozásokat,
15 amelyek sorrendben a [110F,F111N,R113T]hINF- β -hoz (ezt a plazmidot PF308-nak nevezzük) és D110V,F111N,R113T]hINF- β -hoz (ezt a plazmidot PF309-nek nevezzük) vezetnek.

A PF308, PF309 és PF085 plazmidokat (amelyek [F111N,R113T]hINF- β -t kódolnak) CHO K1 sejtekbe transzfektáltuk *Fugene 6* (Roche) transzfekciós ágenskén történő alkalmazásával. 24 óra elteltével a tenyésztő tápközeget begyűjtöttük, és mértük az IFN- β aktivitását:

20	PF085	58615 IU/ml
	PF308	50900 IU/ml
	PF309	15063 IU/ml

25 Annak érdekében, hogy értékeljük a kapcsolódó szénhidrát mennyiségét a két új glikozilációs variánsban, Western-blotot végeztünk azonos mennyiségű aktivitással minden sávban (1. ábra, 7., 8., 9. sáv). Amint az ábrán látható, az aminosavcserék (D110F és D110V) a beépített glikozilációs hely (F111N,R113T) előtt szignifikánsan megnövekedett mennyiségű teljesen glikozilált anyaghoz vezetnek.

30 Egy másik kísérletben azt láttuk, hogy különösen tirozin beépítése a 110. pozícióba megnövekedett mennyiségű szénhidrát kapcsoláshoz vezet a 111. pozícióban beépített N-kapcsolt glikozilációs helyre.

9. példa

IFNB polipeptidek glikoformáinak elválasztása

A hidroxipatit kromatográfia hatékony módszer IFNB glikoformák elválasztására, például teljesen kihasznált glikozilációs helyeket tartalmazó glikoformák előállítására. Ezt il-

5 lusztráljuk ebben a példában.

A PCT/DK00/00471. számú nemzetközi bejelentés 8. példájában előállított [Q49N+Q51T+F111N+R113T3] IFNB variánst háromlépéses eljárásban tisztítottuk meg:

A 'roller bottle' edényekből begyűjtött tápközeget lecentrifugáltuk és átszűrtük 0,22 µm-es szűrőn (PVDF). A leszűrt tápközeget diafiltráltuk *Vivaflow 200* rendszeren, amelyet 10 10000 vágási értékű poliéterszulfon-membránnal szereltünk fel, és *S-Sepharose* oszlopra (Pharmacia) vittük fel, amelyet ekvibráltunk 50 mM nátrium-acetát, 50 mM nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel. Az oszlophoz kötődő interferon variánst 50 mM nátrium-acetát, 0,5 M nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel eluáltuk. Az *S-Sepharose* oszlopról származó eluátum nátrium-koncentrációját 1,0 M-ra állítottuk be, és a mintát *Phenyl-Sepharose High Performance* osz- 15 lopra (Pharmacia) vittük fel, amelyet ekvibráltunk 50 mM nátrium-acetát, 1,0 M nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel. A felvitelt követően az oszlopot *Milli Q* vízzel mostuk. Az IFNB variánst *Milli Q víz és 60% etilénglikol*, 50 mM nátrium-acetát, pH 5,5 puffer közötti gradienssel eluáltuk 30 oszloptérfogatban. A teljesen glikozilált IFNB variánst tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük, és az eluátumban található puffert lecseréltük 15 mM nátrium-foszfát, pH 7,2 20 pufferre. A mintát hidroxipatit oszlopra (*CHT II, Ceramic hydroxyapatite, Type II*, Biorad) vittük fel, amelyet ekvibráltunk 15 mM nátrium-foszfáttal. A teljesen glikozilált forma átesett az oszlopon, míg az egy extra helyet tartalmazó kevésbé glikozilált formák kötődtek az oszlophoz, és azokat lineáris nátrium-foszfát gradienssel eluáltuk 15 mM és 200 mM között 20 oszloptérfogatban.

25 A teljesen glikozilált [Q49N+Q51T+F111N+R113T] IFNB tisztaságát több mint 95%-nak találtuk SDS-PAGE alapján.

10. példa

Beépített glikozilációs helyeket tartalmazó IFNB PEG-ilálása

SCM-PEG (karboximetilált PEG szukcinimidil-észtere, Shearwater, Alabama, molekula- 30 latömege 5 kDa vagy 12 kDa) friss törzsoldatát állítottuk elő metanolban minden egyes kísérlet előtt.

A [Q49N+Q51T+F111N+R113T] IFNB glikovariáns 50 mM nátrium-foszfát, 100 mM nátrium-klorid, pH 7,0 pufferben készített 100 µl 0,3 mg/ml oldatát PEG-iláltuk SCM-PEG-gel

(5 kDa vagy 12 kDa), a PEG-nek a lehetséges PEG-ilálási helyekre (azaz a lizinek és az N-terminális) számított kétszeres moláris feleslegével. 30 percnyi szobahőmérsékleten történő inkubálás után a reakciót leállítottuk 5 µl 20 mM glicin, pH 8,0 hozzáadásával. Ebben az állapotban a reakcióelegy kis mennyiségű módosítatlan fehérjét tartalmazott SDS-PAGE alapján értékelve. Az elsődleges szkrinelési vizsgálati eljárás alkalmazásával végezett *in vitro* teszteléssel demonstráltuk, hogy a PEG-ilált anyag megtartotta az aktivitás 40%-át, 1-3 12 kDa molekulatömegű PEG hozzákapcsolásával. 1-3 5 kDa PEG-csoport hozzákapcsolásával a megtartott biológiai aktivitás 25% volt.

Egy másik kísérletben 50 µl tisztított, 0,1 mg/ml koncentrációjú [Q49N+Q51T+F111N+R113T+K19R+K45R+K123R] IFNB-t PEG-iláltunk 50 mM nátrium-foszfát, 100 mM nátrium-klorid, pH 8,0 pufferben, SCM-PEG-gel (5 kDa), a PEG-nek a lehetséges PEG-ilálási helyekre (azaz a lizinek és az N-terminális) számított húszszoros moláris feleslegével 30 percnyi szobahőmérsékleten történő inkubálás után a reakciót leállítottuk 5 µl 20 mM glicin, pH 8 hozzáadásával. Ebben az állapotban a reakcióelegy kis mennyiségű módosítatlan fehérjét tartalmazott SDS-PAGE alapján értékelve.

Az elsődleges szkrinelési vizsgálati eljárás alkalmazásával végzett *in vitro* teszteléssel demonstráltuk, hogy a PEG-ilált anyag megtartotta az aktivitás 45%-át, 1-3 5 kDa molekulatömegű PEG hozzákapcsolásával. PEG magasabb molekuláris feleslegére volt szükség olyan PEG-ilált variánsokhoz, amelyekben egy vagy több lizin helyettesítve volt más aminosav-oldalláncokkal.

A PEG-ilált anyagot elválasztottuk a PEG-ilálatlan anyagtól vagy méretkizárásos kromatográfia, vagy kationcserélő kromatográfia, vagy a kettő kombinációjának az alkalmazásával. A méretkizárásos kromatográfiát *Superose 12* vagy *Superdex 75* oszlopon (Pharmacia) hajtottuk végre, amelyet PBS pufferrel (pH 7,2) ekvilibráltunk. A kationcserélő kromatográfiát *SP-Sepharose HP* oszlopon (Pharmacia) hajtottuk végre, amelyet 20 mM citrát, pH 2,7 pufferrel ekvilibráltunk. Az *SP-Sepharose HP* oszlop elúcióját vagy a só (például nátrium-klorid) koncentrációjának a növelésével, vagy a puffer (például nátrium-acetát vagy nátrium-foszfát) pH-jának a növelésével hajtottuk végre.

11. példa

A hiperglikozilált IFN-β variánst stabilizálja a 17. pozícióban található cisztein szerinnel történő szubsztitúciója

CHOK1 sejteket transzfektáltunk két hiperglikozilált IFN-β variánst kódoló plazmiddal: [S2N,N4T,Q51N,E53T]INF-β (PF276) és [S2N,N4T,C17S,Q51N,E53T]INF-β (PF279).

Konfluens stabil elsődleges transzfekciós tenyészeteket szaporítottunk fel négy T-175 edényben. A konfluencia elérésekor az edényeket átállítottuk szérumot tartalmazó tápközegről szérummentes tápközegre, amely DMEM/F-12 tápközegen (Life Technologies, kat. sz. 21045-025) alpult, kiegészítve 1/100 ITSA-val (Life Technologies, kat. sz. 51300-044) és 1/1000 *Ex-*
 5 *Cyte*-tal (Serologicals Corp., kat. sz. 81-129). 15 napon keresztül mindennap 120 ml variánst gyűjtöttünk be, és lefagyasztottuk -80 °C-on.

A napi begyűjtések felülűszóit összegyűjtöttük, és átszűrtük 0,22 µm-es szűrőn (PVDF). A felülűszót megközelítőleg 15-szörösre betöményítettük *Vivaflow 200* rendszeren, amely 10000 molekulatömeg-vágású poliéterszulfon-membránnal volt felszerelve, és a betömé-
 10 nyített mintát *S-Sepharose* oszlopra vittük fel, amelyet 50 mM nátrium-acetát, 50 mM NaCl, pH 5.5 pufferrel ekvibráltunk. Az IFNB variánst 50 mM nátrium-acetát, 0,5 M NaCl, pH 5,5 lépcsővel eluáltuk.

Az *S-Sepharose* oszlopról származó eluátum nátrium-koncentrációját 1,0 M-ra állítottuk be, és a mintát *Phenyl-Sepharose* oszlopra vittük fel, amelyet ekvibráltunk 50 mM nátri-
 15 um-acetát, 1,0 M nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel. Alapos mosást hajtottunk végre az ekvibrációs pufferrel, mielőtt az IFNB variánst eluáltuk 60% etilénlikollal 50 mM nátrium-acetát, pH 5,5 pufferrel.

A tisztítást követő nem redukált SDS-PAGE egyértelműen demonstrálta dimer kialakulását az [S2N,N4T,Q51N,E53T]INF-β esetében, míg nem volt jelen dimer a
 20 [S2N,N4T,C17S,Q51N,E53T]INF-β esetében.

12. példa

A [C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T] IFN-β glikozilációs variáns előállítás, tisztítása és PEG-ilálása

A [C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T] glikozilációs variánst termelő
 25 CHOK1 szubklónt (5/G-10) leoltottuk hat 'roller bottle' edénybe (Corning, USA) — amelyek mindegyikének 1700 cm² volt a felülete — 200 ml, 10% FBS-sel és penicillin/sztreptomicinnel (P/S) kiegészített DMEM/F-12 (Life Technologies; kat. sz. 31330) tápközegbe. Két nap letel-
 tével a tápközeget kicseréltük. További két nap elteltével a 'roller bottle' edények közel 100%-
 30 ban konfluensek voltak, és a tápközeget átcseréltük 300 ml, 1/500 *EX-CYTE*-tal (Serologicals Proteins; kat. sz. 81129N) és P/S-sel kiegészített szérummentes *UltraCHO* tápközegre (BioWhittaker; kat. sz. 12-724). A sejteknek ebben a tápközegben történő tenyésztése elsegíti a magasabb sejttömeg kialakulását, magasabbat, mint ami a szérumot tartalmazó tápközeggel elérhető. Két nap leteltével a tápközeget megújítottuk. További két nap elteltével a tápközeget

lecseréltük termelési tápközegre: DMEM/F-12 tápközeg (Life Technologies; kat. sz. 21041), kiegészítve 1/100 ITSA-val (Life Technologies; kat. sz. 51300-044) [az ITSA jelentése: Inzulín (1,0 g/L) — Transzferrin (0,55 g/L) — Szelén (0,67 mg/L) kiegészítő Adherens tenyészetekhez], 1/500 EX-CYTE-tal és P/S-sel. A 'roller bottle' edényekből begyűjtött tápközegeket összeöntöttük, mielőtt egy tápközeg mintát kivettünk az IFNB aktivitásának meghatározásához. 21 napon keresztül mindennap 1,8 L variánst gyűjtöttünk be, és lefagyasztottuk -80 °C-on.

A 'roller bottle' edényekből begyűjtött tápközeget lecentrifugáltuk és átszűrtük 0,22 µm-es szűrőn (PVDF). A megszárt tápközegeket diafiltráltuk Vivaflow 200 rendszeren, amely 10000 molekulatömeg-vágású poliéterszulfon-membránnal volt felszerelve, és felvittük S-Sepharose oszlopra (Pharmacia).

Az S-Sepharose oszlopot ekvibráltuk 50 mM nátrium-acetát, 50 mM nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel, és az interferon-variánst 50 mM nátrium-acetát, 0,5 M nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel eluáltuk. A nátrium-klorid koncentrációját az eluátumban 1,0 M-ra állítottuk be.

Az S-Sepharose oszlopról származó eluátumot Phenyl-Sepharose High Performance oszlopra (Pharmacia) vittük fel, amelyet ekvibráltunk 50 mM nátrium-acetát, 1,0 M nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel. A felvitelt követően az oszlopot megmostuk 50 mM nátrium-acetát, 50 mM nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel. Az IFNB variánst 50 mM nátrium-acetát, 50 mM nátrium-klorid, pH 5,5 puffer és 60% etilén-glikol, 50 mM nátrium-acetát, 50 mM nátrium-klorid, pH 5,5 puffer közötti gradienssel eluáltuk 30 oszloptér-fogatban. A teljesen glikozilált IFNB variánst tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és összeöntöttük.

A Phenyl-Sepharose oszlopról származó eluátumban található etilén-glikolt eltávolítottuk a az eluátumnak 50 mM nátrium-acetát, 50 mM nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel ekvibrált S-Sepharose oszlopon történő átengedésével. Az etilén-glikol az átesőben volt, míg az interferon-variáns kötődött az oszlophoz. A felvitelt követően az oszlopot megmostuk 20 mM nátrium-acetát, pH 5,5 pufferrel, és az interferon variánst eluáltuk 100 mM nátrium-foszfát, pH 7,5 pufferrel.

Az eluátum foszfát-koncentrációját 15 mM nátrium-foszfát koncentrációra állítottuk be, és hidroxipatit oszlopra (CHT II, Ceramic hydroxyapatite, Type II, Biorad) vittük fel, amelyet ekvibráltunk 15 mM nátrium-foszfát, pH 7,2 pufferrel. A teljesen glikozilált forma átesett az oszlopon, míg az egy extra helyet tartalmazó kevésbé glikozilált formák kötődtek az oszlophoz, és azokat lineáris nátrium-foszfát gradienssel eluáltuk 15 mM és 200 mM nátrium-foszfát, pH 6,8 között 20 oszloptér-fogatban.

A teljesen glikozilált [C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T] IFNB variáns tisztaságát több mint 95%-nak találtuk SDS-PAGE alapján.

A tisztítást követően a variánst PEG-iláltuk. 10 mg/ml SCM-PEG (karboximetilált PEG szukcinimidil-észtere, Shearwater, Alabama, molekulatömege 12 kDa vagy 20 kDa) friss törzsoldatát állítottuk elő 96%-os etanolban minden egyes kísérlet előtt.

20 mM nátrium-foszfát, pH 7,0 pufferben készített 0,1 mg/ml fehérjeoldatot PEG-iláltunk SCM-PEG-gel (20 kDa), a PEG-nek a lehetséges PEG-ilálási helyekre (azaz a lizinek és az N-terminális) számított 0,75-szörös moláris feleslegével. 30 percnyi szobahőmérsékleten történő inkubálás után a reakciót leállítottuk feleslegben adott 20 mM glicin, pH 8,0 hozzáadásával. A reakcióelegy mono-, di-PEG-ilált és PEG-ilálatlan anyag keverékét tartalmazta. A mono-PEG-ilált anyagot elválasztottuk a többi anyagtól vagy méretkizárásos kromatográfia, vagy kationcserélő kromatográfia, vagy a kettő kombinációjának az alkalmazásával. A PEG-ilációs oldat pH-ját pH 2,7-re állítottuk, és a mintát *SP-Sepharose HP* oszlopra (Pharmacia) vittük fel, amelyet 20 mM nátrium-citrát, pH 2,7 pufferrel ekvibráltunk. A PEG-ilált fehérjét 1 M nátrium-kloridot tartalmazó 50 mM nátrium-acetát pufferrel eluáltuk, és *Sephacryl S-100* (16/60, Pharmacia) géliszűrő oszlopra vittük fel, amelyet 100 mM nátrium-acetát, 200 mM nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel ekvibráltunk. A mono-PEG-ilált anyagot tartalmazó frakciókat összeöntöttük és tovább jellemeztük.

Egy másik kísérletben 20 mM nátrium-foszfát, pH 7,0 pufferben készített 0,16 mg/ml fehérjeoldatot PEG-iláltunk SCM-PEG-gel (12 kDa), a PEG-nek a lehetséges PEG-ilálási helyekre (azaz a lizinek és az N-terminális) számított 2-szeres moláris feleslegével. 30 percnyi szobahőmérsékleten történő inkubálás után a reakciót leállítottuk feleslegben adott 20 mM glicin, pH 8,0 hozzáadásával. A reakcióelegy mono-, di-, tri-PEG-ilált anyag és módosítatlan anyag keverékét tartalmazta. A PEG-ilált anyagot elválasztottuk a módosítatlan fehérjétől vagy méretkizárásos kromatográfia, vagy kationcserélő kromatográfia, vagy a kettő kombinációjának az alkalmazásával. A PEG-ilációs oldat pH-ját pH 2,7-re állítottuk, és a mintát *SP-Sepharose HP* oszlopra (Pharmacia) vittük fel, amelyet 20 mM nátrium-citrát, pH 2,7 pufferrel ekvibráltunk. A PEG-ilált fehérjét 1 M nátrium-kloridot tartalmazó 50 mM nátrium-acetát pufferrel eluáltuk, és *Sephacryl S-100* (16/60, Pharmacia) géliszűrő oszlopra vittük fel, amelyet 100 mM nátrium-acetát, 200 mM nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel ekvibráltunk. A mono-, di- és tri-PEG-ilált fehérje keverékét tartalmazó frakciókat összeöntöttük, és tovább jellemeztük.

13. példa

A [C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T]IFNB glikozilációs variáns előállítása, tisztítása és PEG-ilálása 'Roller Bottle' edényekben

5 A [C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T]IFNB glikozilációs variánst termelő CHOK1 szubklónt (5/G-10) leoltottuk hat 'roller bottle' edénybe, amint azt a 12. példában leírtuk, és megtisztítottuk a 12. példában leírt protokoll szerint. A teljesen glikozilált [C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T] IFNB variáns tisztaságát több mint 95%-nak találtuk SDS-PAGE alapján.

10 A tisztítást követően a variánst PEG-iláltuk. SCM-PEG (karboximetilált PEG szukcinimidil-észtere, Shearwater, Alabama, molekulatömege 12 kDa vagy 20 kDa) friss törzsoldatát állítottuk elő etanolban minden egyes kísérlet előtt.

20 mM nátrium-foszfát, pH 7,0 pufferben készített 0,1 mg/ml fehérjeoldatot PEG-iláltunk SCM-PEG-gel (20 kDa), a PEG-nek a lehetséges PEG-ilálási helyekre (azaz a lizinek és az N-terminális) számított 3-szoros moláris feleslegével. 30 percnyi szobahőmérsékleten történő inkubálás után a reakciót leállítottuk feleslegben adott 20 mM glicin, pH 8,0 hozzáadásával. A reakcióelegy mono-, di-PEG-ilált és PEG-ilálatlan anyag keverékét tartalmazta. A mono-PEG-ilált anyagot elválasztottuk a többi anyagtól vagy méretkizárásos kromatográfia, vagy kationcserélő kromatográfia, vagy a kettő kombinációjának az alkalmazásával. A PEG-ilációs oldat pH-ját pH 2,7-re állítottuk, és a mintát *SP-Sepharose HP* oszlopra (Pharmacia) vittük fel, amelyet 20 mM nátrium-citrát, pH 2,7 pufferrel ekvibráltunk. A PEG-ilált fehérjét 1 M nátrium-kloridot tartalmazó 50 mM nátrium-acetát pufferrel eluáltuk, és *Sephacryl S-100* (16/60, Pharmacia) géliszűrő oszlopra vittük fel, amelyet 100 mM nátrium-acetát, 200 mM nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel ekvibráltunk. A mono-PEG-ilált anyagot tartalmazó frakciókat összeöntöttük és tovább jellemeztük.

25 Egy másik kísérletben 20 mM nátrium-foszfát, pH 7,0 pufferben készített 0,1 mg/ml fehérjeoldatot PEG-iláltunk (10 mg/ml) SCM-PEG-gel (12 kDa), a PEG-nek a lehetséges PEG-ilálási helyekre (azaz a lizinek és az N-terminális) számított 5-szörös moláris feleslegével. 30 percnyi szobahőmérsékleten történő inkubálás után a reakciót leállítottuk feleslegben adott 20 mM glicin, pH 8 hozzáadásával. A reakcióelegy mono-, di-, tri-PEG-ilált anyag és módosítatlan anyag keverékét tartalmazta. A PEG-ilált anyagot elválasztottuk a módosítatlan fehérjétől vagy méretkizárásos kromatográfia, vagy kationcserélő kromatográfia, vagy a kettő kombinációjának az alkalmazásával. A PEG-ilációs oldat pH-ját pH 2,7-re állítottuk, és a mintát *SP-Sepharose HP* oszlopra (Pharmacia) vittük fel, amelyet 20 mM nátrium-citrát, pH 2,7 pufferrel

ekvilibráltunk. A PEG-ilált fehérjét 1 M nátrium-kloridot tartalmazó 50 mM nátrium-acetát pufferrel eluáltuk, és *Sephacryl S-100* (16/60, Pharmacia) géliszűrő oszlopra vittük fel, amelyet 100 mM nátrium-acetát, 200 mM nátrium-klorid, pH 5,5 pufferrel ekvilibráltunk. A mono-, di- és tri-PEG-ilált fehérje keverékét tartalmazó frakciókat összeöntöttük, és tovább jellemeztük.

Szekvencialista

- <210> 2
 <223> hIFNB érett szekvencia
- 5 <210> 3
 <223> Szintetikus konstrukció
 <210> 4
 <223> Szintetikus konstrukció
 <210> 5
- 10 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 6
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 7
 <223> Oligonukleotid láncindító
- 15 <210> 8
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 9
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 10
- 20 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 11
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 12
 <223> Oligonukleotid láncindító
- 25 <210> 13
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 14
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 15
- 30 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 16
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 17

- <223> Oligonukleotid láncindító

<210> 18

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 19
- 5

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 20

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 21

<223> Oligonukleotid láncindító
- 10

<210> 22

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 23

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 24
- 15

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 25

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 26

<223> Oligonukleotid láncindító
- 20

<210> 27

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 28

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 29
- 25

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 30

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 31

<223> Oligonukleotid láncindító
- 30

<210> 32

<223> Oligonukleotid láncindító

<210> 33

<223> Oligonukleotid láncindító

- <210> 34
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 35
 <223> Oligonukleotid láncindító
 5 <210> 36
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 37
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 38
 10 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 39
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 40
 <223> Oligonukleotid láncindító
 15 <210> 41
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 42
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 43
 20 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 44
 <223> Oligonukleotid láncindító
 <210> 45
 <223> Oligonukleotid láncindító
 25 <210> 46
 <223> Oligonukleotid láncindító

Szabadalmi igénypontok

1. A 2. azonosítószámú szekvencia szerinti aminosav-szekvenciájú vad típusú humán
5 interferon- β variánsa, amelynek az aminosav-szekvenciája 1-15 aminosav-oldalláncban különbözik a vad típusú humán interferon- β aminosav-szekvenciájától, és a variáns aminosav-szekvenciája aminosav-szubsztitúciót tartalmaz olyan N-glikozilációs hely aszparagin oldalláncához viszonyított -1. pozícióban, amelyhez cukor-molekularész kapcsolódik.
2. Az 1. igénypont szerinti variáns, amelyben a variáns legalább egy beépített N-
10 glikozilációs helyet tartalmaz.
3. A 2. igénypont szerinti variáns, amelyben a legalább egy beépített N-glikozilációs helyet olyan pozícióban van beépítve, amelyben olyan aminosav-oldallánc található, amelynek az oldalláncának legalább 25%-a érintkezik az oldószerrel.
4. A 3. igénypont szerinti variáns, amelyben a legalább egy beépített N-glikozilációs
15 hely az alábbi szubsztitúciók bármelyikével van beépítve: S2N+N4T/S, L9N+R11T/S, RUN, S12N+N14T/S, F15N+C17S/T, Q16N+Q18T/S, K19N+L21T/S, Q23N+H25T/S, G26N+L28T/S, R27N+E29T/S, L28N+Y30T/S, D39T/S, K45N+L47T/S, Q46N+Q48T/S, Q48N+F50T/S, Q49N+Q51T/S, Q51N+E53T/S, R71N+D73T/S, Q72N, D73N, S75N, S76N+G78T/S, L88T/S, Y92T/S, N93N+I95T/S, L98T/S, E103N+K105T/S,
20 E104N+L106T/S, E107N+E109T/S, K108N+D110T/S, D110N, F111N+R113T/S vagy L116N.
5. A 4. igénypont szerinti variáns, amelyben a legalább egy beépített N-glikozilációs hely a Q49N+Q51T vagy F111N+R113T szubsztitúcióval van beépítve.
6. Az 5. igénypont szerinti variáns, amelyben az N-glikozilációs hely a Q49N+Q51T
25 szubsztitúciókkal van beépítve, és a beépített N-glikozilációs hely aszparagin oldalláncához viszonyított -1. pozícióban található aminosav-szubsztitúció a Q48F, Q48V, Q48W vagy Q48Y bármelyike.
7. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti variáns, amelyben az N-glikozilációs hely az F111N+R113T szubsztitúciókkal van beépítve, és a beépített N-glikozilációs hely aszparagin
30 oldalláncához viszonyított -1. pozícióban található aminosav-szubsztitúció a D110F, D110V vagy D110Y bármelyike.
8. A 7. igénypont szerinti variáns, amelyben a szubsztitúció D110F.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti variáns, amelyben a variáns C17S szubsztitúciót is tartalmaz.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti variáns, amelyben a variáns az alábbi mutáció-csoportokat tartalmazza: D110F+F111N+R11ST, C17S+D110F+F111N+R11ST vagy
5 C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T.

11. A 10. igénypont szerinti variáns, amely a C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R11ST mutációkat tartalmazza.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti variáns, amely polimer molekulához van konjugálva.

10 13. A 12. igénypont szerinti variáns, amelyben a polimer molekula kovalensen van kapcsolva egy lizin oldallánc ϵ -amino-csoportjához.

14. A 12. igénypont szerinti variáns, amelyben a polimer molekula kovalensen van kapcsolva az N-terminális amino-csoporthoz.

15 15. A 12-14. igénypontok bármelyike szerinti variáns, amelyben a polimer molekula lineáris vagy elágazó polietilén-glikol.

16. A 12-15. igénypontok bármelyike szerinti variáns, amelyből legalább egy lizin oldallánc el lett távolítva.

17. A 16. igénypont szerinti variáns, amelyben a legalább egy eltávolított lizin oldallánc K19, K33, K45 vagy K123 bármelyike.

20 18. A 17. igénypont szerinti variáns, amelyben a lizin oldallánc a K19, K33, K45 vagy K123 szubsztitúciók bármelyikével van eltávolítva.

19. Az 12-15. igénypontok bármelyike szerinti variáns, amely tartalmazza az alábbi mutációkat: C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T.

25 20. Az 12-18. igénypontok bármelyike szerinti variáns, amely tartalmazza az alábbi mutációkat: C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T.

21. A 19. vagy 20. igénypont szerinti variáns, amelyben a polimer molekula körülbelül 20 kDa molekulatömegű lineáris polietilén-glikol.

22. A 19. vagy 20. igénypont szerinti variáns, amelyben a polimer molekula körülbelül 12 kDa molekulatömegű lineáris polietilén-glikol.

30 23. Nukleotid-szekvencia, amely 1-22. igénypontok bármelyike szerinti variánst kódol.

24. Expressziós vektor, amely 23. igénypont szerinti nukleotid-szekvenciát tartalmaz.

25. Glikoziláló gazdasejt, amely 23. igénypont szerinti nukleotid-szekvenciát vagy 24. igénypont szerinti expressziós vektort tartalmaz.

26. A 25. igénypont szerinti gazdasejt, amely CHO sejt.

27. Gyógyászati készítmény, amely 1-22. igénypontok bármelyike szerinti variánst és gyógyászatilag elfogadható oldószert, hordozót vagy adjuvánst tartalmaz.

28. Az 1-22. igénypontok bármelyike szerinti variáns, gyógyászati alkalmazásra.

5 29. Az 1-22. igénypontok bármelyike szerinti variáns alkalmazása szklerózis multiplex kezelésére alkalmas gyógyszer gyártására.

30. Eljárás legalább egy N-glikozilációs helyet tartalmazó szülői interferon- β (IFNB) molekula *in vivo* glikozilációjának növelésére, *azzal jellemezve*, hogy

10 i) szubsztituálunk egy aszparagin oldallánchoz viszonyítva -1. pozíciót elfoglaló első aminosav-oldalláncot — amelyhez cukor-molekularész kapcsolódik — egy második aminosav-oldallánccal, variáns IFNB molekulát előállítva;

ii) mérjük a variáns glikozilációjának mértékét a szülői IFNB-molekuláéhoz viszonyítva, összehasonlítható körülmények között glikoziláló gazdasejtben történő expresszió vizsgálatával;

15 iii) szükség esetén megismételjük az i) lépést a második aminosav-oldallánc szubsztituálására egy harmadik aminosav-oldallánccal, és megismételjük a ii) lépést vagy a szülői molekulán, vagy az i) lépés eredményeképpen keletkezett variáns molekulán; és

iv) szükség esetén megismételjük az i)-iii) lépéseket mindaddig, amíg megnövekedett *in vivo* glikozilációt kapunk.

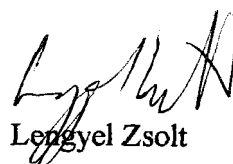
20

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

25



Lengyel Zsolt

szabadalmi ügyvivőjelölt

103 oldal keltés

1 oldal rajt

11 oldal ueszo.

145 oldal

2012. február

P03 03251

PCT/DK02/00128

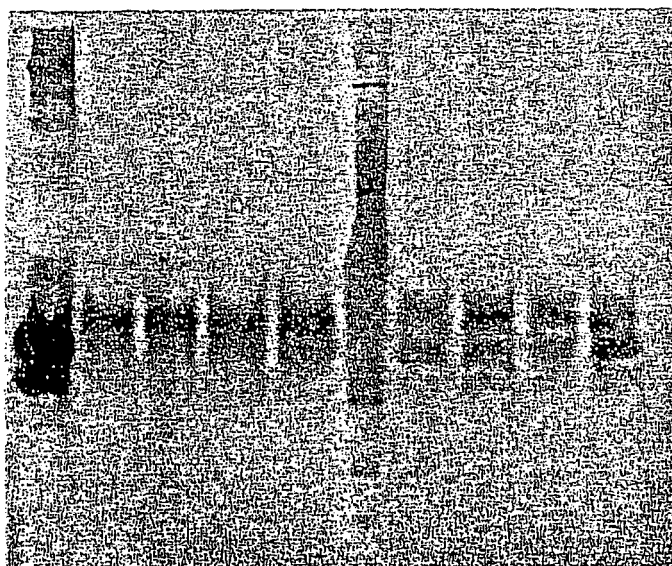
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDANY

35375

A2

1/1

1 2 3 4 5 6 7 8 9



1. ábra