SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

(11), (21) Číslo dokumentu:

829-2002

(22) Dátum podania prihlášky: **13. 11. 2000**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **PA 1999 01631**
60/166 293, PA 2000 00447

(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **12. 11. 1999**
18. 11. 1999, 17. 3. 2000

(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DK, US, DK**

(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 12. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **12/2002**

(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:

(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/DK00/00631**

(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO01/36001**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7] :

A61K 47/48

(71) Prihlasovateľ: **MAXYGEN HOLDINGS LTD., Redwood City, CA, US;**

(72) Pôvodca: **Jensen Anne Dam, Horsholm, DK;**
Andersen Kim Vilbour, Horsholm, DK;
Hansen Christian Karsten, Horsholm, DK;

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Konjugát vykazujúci IFNG aktivitu, nukleotidová sekvencia kódujúca polypeptidovú časť konjugátu, expresný vektor a hostiteľská bunka obsahujúca nukleotidovú sekvenciu, farmaceutický prostriedok s jeho obsahom a jeho použitie**

(57) Anotácia:
Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu gama a obsahujúci aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť kovalentne pripojenú na IFNG polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu líšiacu sa od sekvencie rodičovského IFNG polypeptidu aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť. Konjugát môže byť použitý na liečbu rôznych ochorení.

SK 829-2002 A3

PP 829-02

Konjugát vykazujúci IFNG aktivitu, nukleotidová sekvencia kódujúca polypeptidovú časť konjugátu, expresný vektor a hostiteľská bunka obsahujúce nukleotidovú sekvenciu, farmaceutický prostriedok s jeho obsahom a jeho použitie

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka konjugátov s aktivitou podobnou aktivite interferónu gama, spôsobov ich prípravy, farmaceutických prostriedkov obsahujúcich tieto molekuly a ich použitia na liečenie ochorení.

Doterajší stav techniky

Interferón gama (IFNG) je cytokín produkovaný T-lymfocytmi a prirodzenými zabíjačskými bunkami a existuje ako homodimér dvoch nekovalentne zviazaných polypeptidových podjednotiek. Zrelá forma každého diméru obsahuje 143 aminokyselinových zvyškov (uvedený ako sekv. č. 2), jeho prekurzor obsahuje vrátane signálnej sekvencie 166 aminokyselinových zvyškov (uvedený ako sekv. č. 1).

Každá subjednotka má dve potenciálne N-glykozylačné miesta (Aggarwal a ďalší, Human Cytokines, Blackwell Scientific Publications, 1992) v polohách 25 a 97. V závislosti na stupni glykozylácie je molekulová hmotnosť IFNG v dimérnej forme 34 až 50 kDa (Farrar a ďalší, Ann. Rev. Immunol, 1993, 11: 571-611).

Primárna sekvencia divého typu ľudského IFNG (huIFNG) bola publikovaná v Gray a ďalší (Nature 298: 859-863, 1982), Taya a ďalší (EMBO J. 1: 953-958, 1982), Devos a ďalší (Nucleic Acids Res. 10: 2487-2501, 1982) a Rinderknecht a ďalší (J. Biol. Chem. 259: 6790-6797, 1984) a v EP 77670, EP 89676 a EP 110044. Trojrozmerná štruktúra huIFNG bola publikovaná v Ealick a ďalší (Science 252: 689-702, 1991).

Publikované boli rôzne prirodzene sa vyskytujúce alebo mutované formy IFNG podjednotkových polypeptidov vrátane formy obsahujúcej Cys-Tyr-Cys N-koncovú aminokyselinovú sekvenciu (polohy (-3) až (-1) vo vzťahu k sekv. č. 2), formy obsahujúcej N-koncový metionín (poloha -1 vo vzťahu k sekv. č. 2) a rôznych foriem skrátených na C-konci zahŕňajúcom 127 až 134 aminokyselinové zvyšky. Je

známe, že 1 až 15 aminokyselinových zvyškov je možné deletovať z C-konca bez toho, aby sa zničila IFNG aktivita molekuly. Okrem toho bola opísaná heterogenita huIFNG C-konca v Pan a ďalší (Eur. J. Biochem. 166: 145-149, 1987).

HuIFNG muteíny boli publikované v Slodowski a ďalší (Eur. J. Biochem. 202: 1133-1140, 1991), Luk a ďalší (J. Biol. Chem. 265: 13314-13319, 1990) Seelig a ďalší (Biochemistry 27: 1981-1987, 1988), Trousdale a ďalší (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 26: 1244-1251, 1985) a v EP 146254. Prirodzený huIFNG variant bol publikovaný v Nishi a ďalší (J. Biochem. 97: 153-159, 1985).

US 6046034 opisuje termostabilné rekombinantné huIFNG (rhuIFNG) varianty, v ktorých sú začlenené až 4 páry cysteínových zvyškov, aby sa umožnilo vytváranie disulfidových mostíkov a tým stabilizácia IFNG variantu v homodimérnej forme.

WO 92/08737 opisuje IFNG varianty obsahujúce pridaný metionín na N-konci kompletnej (zvyšky 1 až 143) alebo čiastočnej (zvyšky 1 až 132) aminokyselinovej sekvencie divého typu ľudského IFNG. EP 219781 opisuje čiastočné huIFNG sekvencie obsahujúce zvyšky 1 až 127, 5 až 146 a 5 až 127 aminokyselinovej sekvencie, ktoré v porovnaní so sekv. č. 2 majú tri ďalšie N-koncové aminokyselinové zvyšky (CYC). US 5004689 opisuje DNA sekvenciu kódujúcu huIFNG bez 3 N-koncových aminokyselinových zvyškov CYC a jej expresiu v *E. coli*. EP 446582 opisuje rhuIFNG bez N-koncového metionínu produkovaný v *E. coli*. US 6120762 opisuje peptidový fragment huIFNG obsahujúci zvyšky 95 až 134 (vo vzťahu ku sekv. č. 2).

Vysoká hladina expresie rhuIFNG bola publikovaná Wangom a ďalšími (Sci. Sin. B 24: 1076-1084, 1994).

Glykozylačná odchýlka v rhuIFNG bola zverejnená v Curling a ďalší (Biochem. J. 272: 333-337, 1990) a v Hooker a ďalší (J. of Interferon and Cytokine Research, 1998, 18: 287-295).

Polymérna modifikácia rhuIFNG bola zverejnená v Kita a ďalší (Drug Des. Deliv. 6: 157-167, 1990) a v EP 236987 a US 5109120.

WO 92/22310 opisuje asialoglykoproteínové konjugátové deriváty interferónov, *inter alia* huIFNG.

Boli opísané IFNG fúzované proteíny. Napríklad EP 237019 opisuje jednoreťazcový polypeptid majúci oblasť, ktorá vykazuje aktivitu interferónu β, a jednu oblasť, ktorá vykazuje IFNG aktivitu.

EP 158198 opisuje jednoreťazcový polypeptid majúci oblasť, ktorá vykazuje IFNG aktivitu, a oblasť, ktorá vykazuje IL-2 aktivitu. Niekoľko publikácií opisuje jednoreťazcové dimérne IFNG proteíny, napr. Landar a ďalší (J. Mol. Biol., 2000, 299: 169-179).

WO 99/02710 opisuje jednoreťazcové polypeptidy, jedným príkladom z mnohých je IFNG.

WO 99/03887 opisuje PEGylované varianty polypeptidov patriacich do superrodiny rastových hormónov, v ktorých bol neesenciálny aminokyselinový zvyšok umiestnený v špecifikovanej oblasti polypeptidu nahradený cysteínovým zvyškom. IFNG je spomenutý ako jeden príklad člena superrodiny rastových hormónov, ale vôbec nie je diskutovaná jeho modifikácia.

IFNG bol navrhnutý na liečbu intersticiálnych pľúcnych ochorení (známych aj ako intersticiálna pľúcna fibróza (IPF) (Ziesche a ďalší, (N. Engl. J. Med. 341: 1264-1269, 1999 a Chest 110: dod.: 25S, 1996) a EP 795332), pričom na tento účel môže byť IFNG použitý v kombinácii s prednizolom. Okrem IPF môžu byť s IFNG liečené granulomatózne ochorenia (Bolinger a ďalší, Clinical Phamacy, 1992, 11: 834-850), určité mykobakteriálne infekcie (N. Engl. J. Med. 330: 1348-1355, 1994), rakovina obličiek (J. Urol. 152: 841-845, 1994), osteopetróza (N. Engl. J. Med. 332: 1594-1599, 1999), skleroderma (J. Rheumatol. 23: 654-658, 1996), hepatitída B (Hepatogastroenterology 45: 2282-2294, 1998), hepatitída C (Int. Hepatol. Communic. 6: 264-273, 1997), septický šok (Nature Medicine 3: 678-681, 1997) a reumatoidná artritída.

S určitým úspechom sa používa rhuIFNG ako farmaceutická zlúčenina predovšetkým proti niektorým vírusovým infekciám a nádorom. RhuIFNG sa zvyčajne aplikuje parenterálne, výhodne subkutánne, injekciou. Maximálne sérové koncentrácie sa zistili po siedmych hodinách, polčas rozpadu v plazme je 30 minút po iv podaní. Z tohto dôvodu zahŕňa účinná liečba s rhuIFNG časté injekcie. Hlavné nežiadúce účinky pozostávajú z horúčky, triašky, potenia, bolesti hlavy, bolesti svalov a letargie. Tieto účinky sú spojené s injekčným podávaním rhuIFNG a

pozorujú sa v prvých hodinách po injekcii. Zriedkavými vedľajšími účinkami sú lokálna bolesť a erytém, zvýšenie pečeňových enzýmov, reverzibilná granulo- a trombopénia a kardiotoxicita.

Cieľom prihlášky je nájsť zlepšené molekuly podobné IFNG poskytujúce jeden alebo viacero vyššie uvedených požadovaných účinkov.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je konjugát vykazujúci IFNG aktivitu a obsahujúci aspoň prvú nepolypeptidovú časť kovalentne spojenú s IFNG polypeptidom, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu líšiacu sa od sekvencie rodičovského IFNG polypeptidu aspoň jedným zavedeným a/alebo aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť.

Konjugáty majú predĺžený *in vivo* polčas rozpadu v porovnaní s huIFNG a rhuIFNG a voliteľne spôsobujú redukovanú imunitnú odpoveď v porovnaní s rhuIFNG. Voliteľne má táto trieda aj ďalšie zlepšené vlastnosti čo sa týka schopnosti produkovať homogénne molekuly, zlepšenej stability voči proteolýze a/alebo zvýšenej biologickej dostupnosti.

Z toho vyplýva, že vynález poskytuje množstvo výhod oproti v súčasnosti dostupným IFNG zlúčeninám, vrátane dlhšieho časového obdobia medzi injekciami alebo inými formami podávania, menej vedľajších účinkov a/alebo zvýšenie účinnosti vďaka redukcii protilátok. Okrem toho sa môžu použitím konjugátu podľa vynálezu získať vyššie dávky účinného proteínu a tým účinnejšia terapeutická odpoveď.

Ďalej sa vynález týka konjugátu vykazujúceho IFNG aktivitu, ktorý obsahuje aspoň jeden N-koncovo PEGylovaný IFNG polypeptid. IFNG polypeptidom môže byť huIFNG alebo ktorýkoľvek z tu opísaných IFNG polypeptidov.

Ďalej sa vynález týka farmaceutického prostriedku obsahujúceho konjugát podľa vynálezu, konjugátu alebo prostriedku podľa vynálezu na použitie na liečenie, použitia konjugátu alebo prostriedku na liečenie alebo na výrobu lieku na liečenie ochorení.

Nakoniec sa vynález týka použitia špecifikovaných IFNG konjugátov na výrobu lieku, farmaceutického prostriedku alebo „kit-of-parts“ (kitu pozostávajúceho z viacerých častí) na liečenie intersticiálnych pľúcnych ochorení, rakoviny, infekcií a/alebo zápalových ochorení, a v prípade intersticiálnych pľúcnych ochorení voliteľne aj v kombinácii s glukokortikoidmi.

Definície

V kontexte predloženej prihlášky a vynálezu sú aplikované nasledujúce definície:

Výraz "konjugát" (alebo zameniteľne "konjugovaný polypeptid") je mienený ako označenie heterogénnej (v zmysle zložená alebo chimérna) molekuly vytvorenej kovalentným pripojením jedného alebo viacerých polypeptidov na jednu alebo viaceré nepolypeptidové časti. Výraz kovalentne pripojený znamená, že polypeptid a nepolypeptidová časť sú buď priamo navzájom kovalentne spojené, alebo sú nepriamo kovalentne spojené prostredníctvom intervenujúcej časti alebo častí, ako napríklad mostíka, medzerníka alebo spojovníkovej časti alebo častí. Výhodne je konjugát v relevantných koncentráciách a podmienkach rozpustný, tzn. rozpustný vo fyziologických tekutinách, ako napríklad v krvi. Príklady konjugovaných polypeptidov podľa vynálezu zahŕňajú glykozylované a/alebo PEGylované polypeptidy. Výraz "nekonjugovaný polypeptid" môže byť použitý na označenie polypeptidovej časti konjugátu.

Výraz "nepolypeptidová časť" je mienený ako označenie molekuly, ktorá je schopná konjugovať s pripájacou skupinou IFNG polypeptidu. Výhodné príklady takejto molekuly zahŕňajú polymérne molekuly, lipofilné zlúčeniny, sacharidové časti alebo organické derivatizačné činidlá. Keď sa bude používať v kontexte konjugátu podľa vynálezu, bude zrejmé, že nepolypeptidová časť je spojená s polypeptidovou časťou konjugátu prostredníctvom pripájacej skupiny polypeptidu.

Výraz "polymérna molekula" je definovaný ako molekula tvorená kovalentným spojením dvoch alebo viacerých monomérov, pričom žiadny z monomérov nie je aminokyselinovým zvyškom, s výnimkou toho, keď je polymérom ľudský albumín alebo iný proteín nachádzajúci sa v plazme vo veľkom množstve. Výraz "polymér" môže byť používaný zameniteľne s výrazom "polymérna

molekula". Výraz "sacharidová časť" je mienený ako označenie uhľovodíkovej molekuly pripojenej *in vivo* alebo *in vitro* glykozyláciou, ako napríklad N- alebo O-glykozyláciou. S výnimkou toho, kedy je počet nepolypeptidových častí, ako napríklad polymérnych molekúl, v konjugáte presne uvedený, každé odvolanie sa na "nepolypeptidovú časť" obsiahnutú v konjugáte alebo inak použitú v predloženom vynáleze, má byť odvolaním sa na jednu alebo viacero nepolypeptidových častí v konjugáte.

Výraz "pripájacia skupina" je mienený ako označenie aminokyselinovej zvyškovej skupiny, ktorá je schopná pripojiť sa na relevantnú nepolypeptidovú časť, ako napríklad na polymérnu molekulu alebo sacharidovú časť. Užitočné pripájacie skupiny a im zodpovedajúce nepolypeptidové časti sú zrejmé z nižšie uvedenej tabuľky.

Pripájacia skupina	Amino-kyselina	Príklady nepolypeptidovej časti	Spôsob konjugácie/ Aktivovaný PEG	Publikácia
$-NH_2$	N-konc., Lys	polymér, napr. PEG	mPEG-SPA trezylovaný mPEG	Shearwater Inc., Delgado a ďalší, critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9(3,4): 249-304 (1992)
-COOH	C-konc., Asp, Glu	polymér, napr. PEG sacharidová časť	mPEG-Hz *in vitro* párovanie	Shearwater Inc
-SH	Cys	polymér, napr. PEG sacharidová časť	PEG-vinylsulfón PEG-maleimid *in vitro* párovanie	Shearwater Inc., Delgado a ďalší, critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9(3,4): 249-304 (1992)
-OH	Ser, Thr, OH-, Lys	sacharidová časť	*in vivo* O-pripojená glykozylácia	

$-CONH_2$	Asn ako časť N-glykozyl. miesta	sacharidová časť	*in vivo* glykozylácia	
aromat. zvyšok	Phe, Tyr, Trp	sacharidová časť	*in vitro* párovanie	
$-CONH_2$	Gln	sacharidová časť	*in vitro* párovanie	Yan a Wold, Biochemistry, 31. júl 1984; 23(16): 3759-65
aldehyd ketón	oxidovaný uhľovodík	polymér, napr. PEG, PEG-hydrazid	PEGylácia	Andresz a ďalší, 1978, Makromol. Chem. 179:301; WO 92/16555, WO 00/23114
guanidino	Arg	sacharidová časť	*in vitro* párovanie	Lundblad a Noyes, Chemical REagents for Protein Modification, CRC Press Inc. Boca Raton, FI
imidazolo-vý kruh	His	sacharidová časť	*in vitro* párovanie	ako pre guanidín

Pre *in vivo* N-glykozyláciu je výraz "pripájacia skupina" používaný nie bežným spôsobom na označenie aminokyselinových zvyškov tvoriacich N-glykozylačné miesto (so sekvenciou N-X'-S/T/C-X", kde X' znamená akýkoľvek aminokyselinový zvyšok s výnimkou prolínu, X" znamená akýkoľvek aminokyselinový zvyšok, ktorý môže alebo nemusí byť rovnaký ako X', výhodne sa líši od prolínu, N znamená asparagín a S/T/C znamená serín, treonín alebo cysteín, výhodne serín alebo treonín a najvýhodnejšie treonín). Hoci je asparagínový zvyšok N-glykozylačného miesta zvyškom, na ktorý sa v priebehu glykozylácie pripája sacharidová časť, takéto pripojenie sa nemôže dosiahnuť, pokiaľ nie sú prítomné iné aminokyselinové zvyšky N-glykozylačného miesta. Z toho vyplýva, že keď je nepolypeptidovou časťou sacharidová časť a konjugácia sa má dosiahnuť N-glykozyláciou, výraz

"aminokyselinový zvyšok obsahujúci pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť" ako sa používa v spojitosti so zmenami aminokyselinovej sekvencie rodičovského polypeptidu, treba chápať tak, že jeden, dva alebo všetky aminokyselinové zvyšky tvoriace N-glykozylačné miesto sú zmenené takým spôsobom, že funkčné N-glykozylačné miesto je buď zavedené do aminokyselinovej sekvencie, alebo je z tejto sekvencie odstránené.

V predloženej prihláške sa názvy aminokyselín a názvy atómov (napr. CA, CB, CD, CG, SG, NZ, N, O, C, atď.) používajú tak ako je definované v Protein DataBank (PDB) (www.pdb.org), ktorá je založená na IUPAC nomenklatúre (IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (residue names, atom names etc.), Eur. J. Biochem., 138, 9-37 (1984) spolu s jej opravami v Eur. J. Biochem., 152, 1 (1985). CA sa niekedy uvádza ako Cα, CB ako Cβ. Výraz "aminokyselinový zvyšok" je mienený ako označenie aminokyselinového zvyšku nachádzajúceho sa v skupine, ktorá obsahuje alanínový (Ala alebo A), cysteínový zvyšok (Cys alebo C), zvyšok kyseliny asparágovej (Asp alebo D), zvyšok kyseliny glutámovej (Glu alebo E), fenylalanínový (Phe alebo F), glycínový (Gly alebo G), histidínový (His alebo H), izoleucínový (Ile alebo I), lyzínový (Lys alebo K), leucínový (Leu alebo L), metionínový (Met alebo M), asparagínový (Arg alebo R), serínový (Ser alebo S), treonínový (Thr alebo T), valínový (Val alebo V), tryptofánový (Trp alebo W) a tyrozínový (Tyr alebo Y) zvyšok. Číslovanie aminokyselinových zvyškov v tomto dokumente začína na N-konci huIFNG bez signálneho peptidu (tzn. sekv. č. 2). Terminológia používaná na identifikáciu aminokyselinových polôh/substitúcií je ilustrovaná nasledovne: N25 (označuje polohu č. 25, v ktorej sa nachádza asparagín, v aminokyselinovej sekvencii uvedenej ako sekv. č. 2). N25C (indikuje, že Asp zvyšok v polohe 25 bol nahradený Cys). Viacnásobné substitúcie sú označované s "+", napr. Q1N+P3T/S znamená aminokyselinovú sekvenciu, ktorá obsahuje substitúciu Gln zvyšku v polohe 1 s Asn a substitúciu Pro zvyšku v polohe 3 s Thr alebo Ser, výhodne Thr.

Výraz "nukleotidová sekvencia" je mienený ako označenie postupného reťazca dvoch alebo viacerých nukleotidových molekúl. Nukleotidová sekvencia môže byť genomická, cDNA, RNA, semisyntetická, syntetického pôvodu alebo akékoľvek ich kombinácie.

Výraz "polymerázová reťazová reakcia" alebo "PCR" vo všeobecnosti označuje spôsob amplifikácie požadovanej nukleotidovej sekvencie *in vitro*, ako je opísané napríklad v US 4683195. Vo všeobecnosti PCR spôsob zahŕňa opakujúce sa cykly syntézy predĺžení primerov, použitím oligonukleotidových primerov, ktoré sú schopné preferenčne hybridizovať s templátovou nukleovou kyselinou.

"Bunka", "hostiteľská bunka", "bunková línia" a "bunková kultúra" sa tu používajú zameniteľne, a všetky tieto výrazy by sa mali chápať tak, že zahŕňajú potomstvo, ktoré je výsledkom pestovania alebo kultivácie bunky. "Transformácia" a "transfekcia" sa používajú zameniteľne a označujú spôsob zavádzania DNA do bunky.

Výraz "operatívne spojený" označuje kovalentné spojenie dvoch alebo viacerých nukleotidových sekvencií prostredníctvom enzymatickej ligácie alebo iným spôsobom v takej vzájomnej konfigurácii, aby sa mohla uskutočňovať normálne funkcia sekvencií. Napríklad, nukleotidová sekvencia kódujúca presekvenciu alebo sekrečný vedúci peptid je s nukleotidovou sekvenciou pre polypeptid operatívne spojená, ak sa exprimuje ako preproteín, ktorý sa podieľa na sekrécii polypeptidu; promótor alebo zosilňovač sú operatívne spojené s kódujúcou sekvenciou, ak ovplyvňujú transkripciu sekvencie; ribozóm viažuce miesto je operatívne spojené s kódujúcou sekvenciou, ak je umiestnené tak, že uľahčuje transláciu. Vo všeobecnosti, "operatívne spojený" znamená, že nukleotidové sekvencie, ktoré sú spojené, sú kontinuálne, a v prípade sekrečného vedúceho peptidu, kontinuálne a v čítacom rámci. Spojenie sa uskutočňuje ligáciou bežných restrikčných miest. Ak takéto miesta neexistujú, potom sa používajú oligonukleotidové adaptory alebo spojovníky spolu so štandardnými rekombinantnými DNA spôsobmi.

Výraz "začlenenie" je primárne mienený ako označenie substitúcie existujúceho aminokyselinového zvyšku, ale môže znamenať aj inzerciu ďalšieho aminokyselinového zvyšku. Výraz "odstránenie" je primárne mienený ako označenie substitúcie aminokyselinového zvyšku, ktorý sa má odstrániť, iným aminokyselinovým zvyškom, ale môže znamenať aj deléciu (bez substitúcie" aminokyselinového zvyšku, ktorý sa má odstrániť.

Výraz "aminokyselinový zvyšok obsahujúci pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť" je mienený ako označenie toho, že na uvedený aminokyselinový

zvyšok sa viaže nepolypeptidová časť (v prípade začleneného aminokyselinového zvyšku), alebo že by sa viazala (v prípade odstráneného aminokyselinového zvyšku).

Výraz "rozdiel" alebo "líšiť sa" tak ako sa používa v súvislosti s aminokyselinovou sekvenciou tu opísaného IFNG polypeptidu, je určený na označenie ďalších prítomných rozdielov. Z toho vyplýva, že okrem špecifikovaného aminokyselinového rozdielu, môžu byť mutované aj iné aminokyselinové zvyšky okrem tých špecifikovaných.

Výraz "funkčný *in vivo* polčas rozpadu" je používaný v jeho normálnom význame, tzn. čas, v ktorom 50 % konjugátových molekúl cirkuluje v plazme alebo v krvnom riečišti pred tým ako vymiznú (označovaný aj ako "sérový polčas rozpadu), alebo čas, v ktorom sa zachováva 50 % danej funkčnosti konjugátu. Polypeptid alebo konjugát normálne vymizne pôsobením jedného alebo viacerých retikuloendoteliálnych systémov (RES), obličiek, sleziny alebo pečene alebo špecifickou alebo nešpecifickou proteolýzou. Normálne závisí vymiznutie na veľkosti (relatívnej vzhľadom na hraničnú hodnotu pre glomerulárnu filtráciu), náboji, pripojených uhľovodíkových reťazcoch a na prítomnosti bunkových receptorov pre proteín. Funkčnosť, ktorá sa má zachovávať je normálne vybraná z protivírusovej, protiproliferatívnej, imunomodulačnej alebo IFNG receptor viažucej aktivity. Funkčný *in vivo* polčas rozpadu môže byť stanovený akýmkoľvek vhodným spôsobom známym v oblasti, ako bude podrobnejšie opísané nižšie v časti Spôsoby.

Výraz "predĺžený funkčný *in vivo* polčas rozpadu" je použitý na označenie toho, že funkčný *in vivo* polčas rozpadu konjugátu je štatisticky významne predĺžený v porovnaní s funkčným *in vivo* polčasom rozpadu referenčnej molekuly, ako napríklad huIFNG, voliteľne v glykozylovanej forme, napr. nekonjugovaného huIFNG alebo rhuIFNG, keď sa stanovuje v porovnateľných podmienkach.

Výraz "imunogénnosť" tak ako je používaný v spojitosti s danou látkou, je mienený ako označenie schopnosti látky indukovať odpoveď ľudského imunitného systému. Imunitnou odpoveďou môže byť bunkovo alebo protilátkovo sprostredkovaná odpoveď (pozri napr. Roitt: Essential Immunology (8. vydanie, Blackwell), kde je uvedená podrobnejšia definícia imunogénnosti).

Výraz "znížená imunogénnosť" je mienený ako označenie toho, že konjugát podľa predloženého vynálezu spôsobuje vznik merateľne slabšej imunitnej odpovede ako referenčná molekula, ako napríklad huIFNG alebo rhuIFNG, keď sa stanovuje v porovnateľných podmienkach.

Výraz "vykazujúci IFNG aktivitu" je mienený ako označenie toho, že polypeptid má jednu alebo viacero funkcií prirodzeného IFNG, konkrétne huIFNG alebo rhuIFNG, vrátane schopnosti viazať sa na IFNG receptor a spôsobovať prenos signálu transdukovaného prostredníctvom naviazania huIFNG na jeho receptor, čo sa stanovuje *in vitro* alebo *in vivo* (tzn. *in vitro* alebo *in vivo* biologická aktivita). IFNG receptor bol opísaný v Aguet a ďalší (Cell 55: 273-280, 1988) a v Calderon a ďalší (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4837-4841, A988). Výraz "IFNG polypeptid" znamená polypeptid vykazujúci IFNG aktivitu a tu sa používa v súvislosti s polypeptidom v monomérnej alebo v dimérne forme, ako je to vhodné. Napríklad, keď sa uvádzajú špecifické substitúcie, tieto sú normálne uvádzané vo vzťahu k IFNG polypeptidovému monoméru. Keď spomína IFNG časť konjugátu podľa vynálezu, je tento normálne v dimérnej forme (a tak napr. obsahujú dva IFNG polypeptidové monoméry modifikované ako je opísané). Dimérna forma IFNG polypeptidov môže byť poskytnutá prostredníctvom normálneho spojenia dvoch monomérov, alebo môže byť vo forme jediného reťazca dimérneho IFNG polypeptidu.

Tu opísaný IFNG polypeptid môže mať *in vivo* alebo *in vitro* biologickú aktivitu rovnakého rozsahu ako huIFNG alebo rhuIFNG alebo nižšiu alebo vyššiu, napr. *in vivo* alebo *in vitro* biologickú aktivitu predstavujúcu 1 až 100 % biologickej aktivity huIFNG alebo rhuIFNG, keď sa meria v rovnakých podmienkach, napr. 1 až 25 % alebo 1 až 50 % alebo 25 až 100 % alebo 50 až 100 % biologickej aktivity huIFNG alebo rhuIFNG.

Výraz "rodičovský IFNG" je mienený ako označenie molekuly, ktorá sa má modifikovať podľa predloženého vynálezu. Normálne je rodičovský IFNG kódovaný nukleotidovou sekvenciou, ktorá je modifikovaná podľa predloženého vynálezu tak, aby kódovala polypeptidovú časť konjugátu podľa vynálezu. Rodičovským IFNG je normálne huIFNG alebo rhuIFNG alebo ich variant alebo fragment. "Variant" je polypeptid, ktorý sa líši jedným alebo viacerými aminokyselinovými zvyškami od

rodičovského polypeptidu, normálne 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 alebo 15 aminokyselinovými zvyškami. Fragment je časť úplnej huIFNG sekvencie vykazujúca IFNG aktivitu, napríklad jej verzia skrátená na C- alebo N-konci.

Výraz "funkčné miesto" je mienený ako označenie jedného alebo viacerých aminokyselinových zvyškov, ktoré sú nevyhnutné na, alebo sa inak podieľajú na fungovaní alebo účinku IFNG. Takéto aminokyselinové zvyšky sú "lokalizované vo" funkčnom mieste. Funkčné miesto je možné stanoviť spôsobmi známymi v oblasti a výhodne sa identifikuje analýzou štruktúry polypeptidu v komplexe s relevantným receptorom, ako napríklad IFNG receptorom.

Konjugát podľa vynálezu

Ako je uvedené vyššie, prvý predmet vynálezu sa týka konjugátu vykazujúceho IFNG aktivitu a obsahujúceho aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť kovalentne pripojenú na IFNG polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu líšiacu sa od sekvencie rodičovského IFNG polypeptidu aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť.

Odstránením alebo začlenením aminokyselinového zvyšku obsahujúceho pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť je možné špecificky adaptovať polypeptid tak, aby sa vyrobila molekula náchylnejšia na konjugáciu zvolenej nepolypeptidovej časti, na optimalizáciu konjugačného spôsobu (napr. na zaistenie optimálnej distribúcie nepolypeptidových častí na povrchu IFNG polypeptidu), a tým na získanie novej konjugátovej molekuly, ktorá vykazuje IFNG aktivitu a okrem toho jednu alebo viacero zlepšených vlastností v porovnaní so v súčasnosti dostupnými molekulami založenými na huIFNG alebo rhuIFNG. Napríklad zavedením pripájacích skupín sa zväčší IFNG polypeptid, alebo sa iným spôsobom zmení obsah špecifických aminokyselinových zvyškov, na ktoré sa viaže relevantná nepolypeptidová časť, čím sa dosiahne účinnejšia, špecifickejšia a/alebo extenzívnejšia konjugácia. Odstránením jednej alebo viacerých pripájacích skupín je možné zabrániť konjugácii nepolypeptidovej časti v tých častiach polypeptidu, v ktorých by bola takáto konjugácia nevýhodná, napr. pri aminokyselinovom zvyšku lokalizovanom v alebo v blízkosti funkčného miesta polypeptidu (keďže konjugácia v

takomto mieste by mohla viesť k inaktivácii alebo k redukcii IFNG aktivity výsledného konjugátu v dôsledku poškodenia rozoznávania receptora). Okrem toho môže byť výhodné odstrániť pripájaciu skupinu umiestnenú v blízkosti inej pripájacej skupiny, aby sa zabránilo heterogénnej konjugácii takýchto skupín. Vo výhodných uskutočneniach je zmenený viac ako jeden aminokyselinový zvyšok IFNG polypeptidu, napr. zmena zahŕňa odstránenie ako aj začlenenie aminokyselinových zvyškov obsahujúcich pripájacie miesta pre zvolené nepolypeptidové časti. Toto uskutočnenie je považované za výnimočne zaujímavé v tom, že umožňuje špecifický dizajn IFNG polypeptidu, tak aby sa získala optimálna konjugácia s nepolypeptidovou časťou.

Okrem odstránenia a/alebo začlenenia aminokyselinových zvyškov môže polypeptid obsahovať iné substitúcie, ktoré sa netýkajú začlenenia a/alebo odstránenia aminokyselinových zvyškov obsahujúcich pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť.

Hoci rodičovským polypeptidom, ktorý sa má modifikovať predloženým vynálezom, môže byť akýkoľvek polypeptid s IFNG aktivitou, a teda môže byť odvodený od polypeptidu akéhokoľvek pôvodu, napr. pôvodom z nehumánneho cicavca, je výhodné, aby bol rodičovským polypeptidom hulFNG s aminokyselinovou sekvenciou uvedenou ako sekv. č. 2 alebo jeho variant alebo fragment. Príklady variantov hulFNG sú opísané vyššie v časti Doterajší stav techniky, a zahŕňajú napríklad hulFNG s prídavkom CYC na N-konci a cysteínové modifikované varianty opísané v US 6046034. Špecifické príklady fragmentov sú opísané vyššie v časti Doterajší stav techniky a zahŕňajú hulFNG skrátený na C-konci o 1 až 15 aminokyselinových zvyškov, napr. o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 alebo 15 aminokyselinových zvyškov a/alebo skrátený na N-konci o 1 až 3 aminokyselinové zvyšky.

Bude zrejmé, že keď je rodičovským IFNG polypeptidom variant alebo fragment hulFNG, modifikovaný IFNG polypeptid pripravený z takéhoto rodiča obsahuje mutácie alebo skrátenia rodičovského polypeptidu.

Rodičovským IFNG polypeptidom môže byť aj hybridná molekula medzi IFNG polypeptidovým monomérom a iným homologickým polypeptidom voliteľne obsahujúcim jednu alebo viaceré ďalšie substitúcie zavedené do hybridnej

molekuly. Takéto hybridy sú opísané vo vyššie uvedenej časti Doterajší stav techniky. Takáto hybridná molekula môže obsahovať aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši viac ako 15, ako napríklad viac ako 10, aminokyselinovými zvyškami od aminokyselinovej sekvencie uvedenej ako sekv. č. 2. Aby bola hybridná molekula užitočná pre predložený vynález, musí vykazovať IFNG aktivitu.

Nehumánne rodičovské IFNG môžu byť modifikované analogicky s tu uvedeným opisom, napr. modifikáciou polohy v nehumánnom rodičovskom IFNG, ktorá zodpovedá tu opísanej polohe (napr. determinovanej na základe priradenie aminokyselinovej sekvencie alebo 3-rozmernej štruktúry uvedeného IFNG k polohe v hulFNG).

Bude zrejmé, že aminokyselinový zvyšok obsahujúci pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť, ktorý sa má buď odstrániť, alebo začleniť, bude vybraný na základe povahy zvolenej nepolypeptidovej časti a, vo väčšine prípadov, na základe použitého spôsobu konjugácie. Napríklad, keď je nepolypeptidovou časťou polymérna molekula, ako napríklad polyetylénglykol alebo molekula odvodená od polyalkylén oxidu, aminokyselina schopná fungovať ako pripájacia skupina môže byť vybraná zo skupiny, ktorá obsahuje cysteín, lyzín, kyselinu asparágovú, kyselinu glutámovú a arginín. Keď je polypeptidovou časťou sacharidová časť, pripájacou skupinou je napr. *in vivo* glykozylačné miesto, výhodne N-glykozylačné miesto.

Kedykoľvek sa má pripájacia skupina pre nepolypeptidovú časť začleniť do alebo odstrániť z IFNG polypeptidu podľa predloženého vynálezu, bude poloha polypeptidu, ktorá sa má modifikovať, bežne vybraná nasledovne:

Poloha je výhodne lokalizovaná na povrchu IFNG polypeptidu a výhodnejšie sa v nej nachádza aminokyselinový zvyšok, ktorý má viac ako 25 % svojho bočného reťazca vystavených rozpúšťadlu, výhodne viac ako 50 % svojho bočného reťazca vystavených rozpúšťadlu, čo sa stanovuje na základe 3-rozmernej štruktúry alebo modelom IFNG v jeho dimérnej forme, pričom štruktúra alebo model voliteľne okrem toho obsahuje jednu alebo dve IFNG receptorové molekuly. Takéto polohy (napr. predstavujúce viac ako 25 % alebo viac ako 50 % povrchovej expozície v modeli bez alebo s receptorovými molekulami) sú uvedené nižšie v časti Materiály a metódy.

Zaujímavé je aj modifikovať ktorýkoľvek z 23 C-koncových aminokyselinových zvyškov IFNG (zavedením a/alebo odstránením aminokyselinových zvyškov obsahujúcich pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť), keďže sa verí, že tieto zvyšky sú lokalizované na povrchu IFNG polypeptidu.

Okrem toho sa v IFNG polypeptidovej časti konjugátu podľa vynálezu výhodne odstránili pripájacie skupiny lokalizované v receptor viažucom mieste, výhodne substitúciou aminokyselinového zvyšku obsahujúceho takúto skupinu. Aminokyselinové zvyšky IFNG receptor viažuceho miesta sú uvedené nižšie, v časti Materiály a metódy. V prípade jednoreťazcového IFNG polypeptidu môže byť postačujúce odstránenie pripájacích skupín v receptor viažucom mieste len jedného z monomérov, a tým získať jednoreťazcový IFNG polypeptidový konjugát s jedným aktívnym a jedným neaktívnym receptor viažucim miestom.

Na determináciu optimálnej distribúcie pripájacích skupín sa vypočítava vzdialenosť medzi aminokyselinovými zvyškami lokalizovanými na povrchu IFNG polypeptidu na základe 3-rozmernej štruktúry IFNG dimérneho polypeptidu. Konkrétnejšie, determinuje sa vzdialenosť medzi CB aminokyselinových zvyškov obsahujúcich takéto pripájacie skupiny alebo vzdialenosť medzi funkčnou skupinou (NZ pre lyzín, CG pre kyselinu asparágovú, CD pre kyselinu glutámovú, SG pre cysteín) jedného a CB iného aminokyselinového zvyšku obsahujúceho pripájaciu skupinu. V prípade glycínu sa namiesto CB používa CA. V IFNG polypeptidovej časti konjugátu podľa vynálezu je na zabránenie alebo na redukciu heterogénnej konjugácie akákoľvek z uvedených vzdialeností výhodne väčšia ako 8 Å, najmä väčšia ako 10 Å.

Aminokyselinová sekvencia IFNG polypeptidu sa môže tiež líšiť od sekvencie rodičovského IFNG polypeptidu aj v tom, že jeden alebo viaceré aminokyselinové zvyšky tvoriace časť epitopu sú odstránené, výhodne substitúciou aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť, tak aby sa zničil alebo inaktivoval epitop. Epitopy huIFNG alebo rhuIFNG sa môžu identifikovať použitím spôsobov známych v oblasti, aj známym epitopovým mapovaním, pozri napr. Romagnoli a ďalší, Biol Chem, 1999, 380(5): 553-9, DeLisser HM, Methods Mol Biol, 1999, 96:11-20, Van de Water a ďalší, Clin Immunol Immunopathol, 1997, 85(3): 229-35, Saint-Remy JM, Toxicology, 1997,

119(1): 77-81 a Lane DP a Stephen CW, Curr Opin Immunol, 1993, 5(2): 268-71. Jedným spôsobom je skonštruovanie fágovej displejovej knižnice exprimujúcej náhodné oligopeptidy s dĺžkou napr. 9 aminokyselinových zvyškov. IgG1 protilátky zo špecifického antiséra proti huIFNG alebo rhuIFNG sa purifikujú imunoprecipitáciou a reaktívne fágy sa identifikujú imunologickým blotingom. Sekvenovaním DNA purifikovaných reaktívnych fágov sa môže stanoviť sekvencia oligopeptidu, po ktorej nasleduje lokalizácia sekvencie v 3D-štruktúre IFNG. Takto identifikovaná oblasť v štruktúre tvorí epitop, ktorý sa potom môže selektovať ako cieľová oblasť na začlenenie pripájacej skupiny pre nepolypeptidovú časť.

Aby sa zabránilo prílišnému narušeniu štruktúry a funkcie rodičovskej IFNG molekuly, typicky nepresahuje celkový počet aminokyselinových zvyškov, ktoré sa majú zmeniť podľa predloženého vynálezu (v porovnaní s aminokyselinovou sekvenciou uvedenou ako sekv. č. 2), 15. Výhodne obsahuje IFNG polypeptid aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši 1 až 15 aminokyselinovými zvyškami od aminokyselinovej sekvencie uvedenej ako sekv. č. 2, ako napríklad 1 až 8 alebo 2 až 8 aminokyselinovými zvyškami, napr. 1 až 5 alebo 2 až 5 aminokyselinovými zvyškami, od aminokyselinovej sekvencie uvedenej ako sekv. č. 2. Takže normálne obsahuje IFNG polypeptid aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od zrelej časti aminokyselinovej sekvencie, uvedenej ako sekv. č. 2, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 alebo 15 aminokyselinovými zvyškami. Výhodne vyššie uvedené počty predstavuj buď celkový počet zavedených alebo celkový počet odstránených aminokyselinových zvyškov obsahujúcich pripájaciu skupinu pre relevantné nepolypeptidové časti, alebo celkový počet začlenených a odstránených aminokyselinových zvyškov obsahujúcich takúto skupinu.

Presný počet pripájacích skupín dostupných na konjugáciu a prítomných v IFNG polypeptide v dimérnej forme závisí na účinku, ktorý je potrebné dosiahnuť konjugáciou. Účinok, ktorý sa má dosiahnuť, závisí napr. na povahe a stupni konjugácie (napr. na identite nepolypeptidovej časti, počte nepolypeptidových častí, ktoré je potrebné alebo možné konjugovať s polypeptidom, na tom kde majú byť nakonjugované alebo kde sa má konjugácia vylúčiť, atď.).

IFNG polypeptidová časť konjugátu podľa vynálezu môže byť v skrátenej forme (napr. skrátenej o 1 až 15 C-koncových aminokyselinových zvyškov ako je

podrobnejšie opísané vyššie v spojitosti s rodičovským IFNG polypeptidom, alebo skrátenej o 1 až 3 N-koncové aminokyselinové zvyšky).

Funkčný *in vivo* polčas rozpadu závisí napr. na molekulovej hmotnosti konjugátu a počet pripájacích skupín potrebných na poskytnutie predĺženého polčasu rozpadu tak závisí na molekulovej hmotnosti danej nepolypeptidovej časti. V jednom uskutočnení má konjugát podľa vynálezu molekulovú hmotnosť aspoň 67 kDa, výhodne aspoň 70 kDa, keď sa meria prostredníctvom SDS-PAGE podľa Laemmli, U.K., Nature zv. 227 (197), str. 680-85. IFNG má molekulovú hmotnosť (Mw) v rozsahu približne 34 až 50 kDa, a preto je na získanie požadovaného účinku potrebných ďalších približne 20 až 40 kDa. Tieto môžu byť poskytnuté napr. 2 až 4 10kDa PEG molekulami alebo inak, v súlade s tu uvedeným opisom.

V konjugáte podľa vynálezu je výhodné, aby sa v aspoň 50 % všetkých konjugovateľných pripájacích skupín, ako napríklad v aspoň 80 %, a výhodne vo všetkých takýchto skupinách nachádzali relevantné nepolypeptidové časti. Z toho vyplýva, že vo výhodnom uskutočnení konjugát podľa vynálezu obsahuje napr. 1 až 10 nepolypeptidových častí, ako napríklad 2 až 8 alebo 3 až 6.

Ako je uvedené vyššie, vo fyziologických podmienkach existuje IFNG ako dimérny polypeptid. V súlade s vynálezom je IFNG polypeptidová časť konjugátu podľa vynálezu normálne v homodimérnej forme (napr. pripravená spojením dvoch IFNG polypeptidových molekúl pripravených ako je tu opísané). Avšak, ak je to potrebné, môže byť IFNG polypeptidová časť konjugátu podľa vynálezu poskytnutá v jednoreťazcovej forme, v ktorej sú dva IFNG polypeptidové monoméry spojené peptidovou väzbou alebo peptidovým spojovníkom. Za predpokladu, že IFNG polypeptid je v jednoreťazcovej forme, má tú výhodu, že dva konštitučné IFNG polypeptidy sa môžu líšiť, čo môže byť výhodné, napr. tým že je možná asymetrická mutagenéza polypeptidov. Napríklad, PEGylačné miesta sa môžu odstrániť z receptor viažuceho miesta jedného z monomérov, ale môžu sa zachovať v druhom. Týmto spôsobom má po PEGylácii jeden monomér neporušené receptor viažuce miesto, zatiaľ čo druhý môže byť úplne PEGylovaný (a tým poskytnúť významné zvýšenie molekulovej hmotnosti).

Výhodne má konjugát podľa vynálezu jednu alebo viaceré z nasledujúcich zlepšených vlastností: 1) predĺžený funkčný *in vivo* polčas rozpadu v porovnaní

s hulFNG alebo rhulFNG, napr. predĺžený približne aspoň 5-násobne, ako napríklad aspoň 10-násobne alebo aj viacnásobnejšie; 2) redukovanú imunogénnosť v porovnaní s imunogénnosťou hulFNG alebo rhulFNG, napr. redukcia o aspoň 25 %, ako napríklad o aspoň 50 % a výhodnejšie o aspoň 75 %.

Konjugát podľa vynálezu, v ktorom je nepolypeptidovou časťou sacharidová časť

Vo výhodnom uskutočnení konjugátu podľa vynálezu je prvou nepolypeptidovou časťou sacharidová časť, napr. O-pripojená alebo N-pripojená sacharidová časť, a IFNG polypeptid obsahuje aspoň jedno odstránené a/alebo aspoň jedno začlenené *in vivo* glykozylačné miesto.

In vivo glykozylačné miesto sa začleňuje napríklad do polohy rodičovského IFNG polypeptidu, v ktorej sa nachádza aminokyselinový zvyšok vystavený na povrchu molekuly, výhodnej s viac ako 25 % bočného reťazca vystavenými rozpúšťadlu, najmä viac ako 50 % vystavenými rozpúšťadlu (tieto polohy sú tu uvedené v časti Metódy). N-glykozylačné miesto sa začleňuje takým spôsobom, aby bol N-zvyšok uvedeného miesta lokalizovaný v uvedenej polohe. Analogicky, O-glykozylačné miesto sa začleňuje takým spôsobom, aby S alebo T zvyšok tvoriaci uvedené miesto bol lokalizovaný v uvedenej polohe. Okrem toho je na zaistenie účinnej glykozylácie výhodné, aby bolo *in vivo* glykozylačné miesto, najmä N zvyšok N-glykozylačného miesta alebo S alebo T zvyšok O-glykozylačného miesta, lokalizované v rámci prvých 118 N-koncových aminokyselinových zvyškov IFNG polypeptidu, výhodnejšie v rámci 93 N-koncových aminokyselinových zvyškov. Ešte výhodnejšie je začleňovať *in vivo* glykozylačné miesto do polohy, v ktorej je na vytvorenie miesta potrebná len jedna mutácia (tzn. tam, kde sa ktorýkoľvek z aminokyselinových zvyškov potrebných na vytvorenie funkčného glykozylačného miesta už nachádza v molekule).

Napríklad substitúcie, ktoré vedú k začleneniu N-glykozylačného miesta v polohách vystavených na povrchu IFNG polypeptidu, v ktorých sa zároveň nachádzajú aminokyselinové zvyšky majúce viac ako 25 % bočného reťazca vystavených na povrchu (v štruktúre s receptorovou molekulou), zahŕňajú:
Q1N+P3S/T, P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, E9N+L11S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, Y14N+N16S/T, G18S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, D21N+A23S/T,

G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40T, E39N+D41S/T, S40N+R42S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, K61N+D63S/T, D62N+Q64S/T, D63N, D63N+S65T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, Q67N, Q67N+S69T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, T72N+K74S/T, K74N+D76S/T, E75N+M77S/T, K80S/T, V79N+F81S/T, K80N+F82S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K87S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, D90N+F92S/T, E93N+L95S/T, K94N, K94N+T96S, S99N, S99N+T101S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T, Q106S/T, E119N, E119N+S121T, P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, T126N+K128S/T, G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T, K130N, K130N+S132T, R131N+Q133S/T, S132N+M134S/T, Q133N+L135S/T, M134N+F136S/T, L135N+R137S/T, F136N+G138S/T, R137N+R139S/T, G138N+R140S/T, R139N+A141S/T, R140N a R140N+S142T, pričom substitúcie sú označované vo vzťahu k hulFNG s aminokyselinovou sekvenciou uvedenou ako sekv. č. 2. S/T označuje substitúciu na serínový alebo treonínový zvyšok, výhodné na treonínový zvyšok.

Substitúcie, ktoré vedú k začleneniu N-glykozylačného miesta v polohách vystavených na povrchu IFNG polypeptidu majúcich viac ako 50 % bočného reťazca vystavených na povrchu (v štruktúre s receptorovou molekulou), zahŕňajú: P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, G18S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40S/T, E39N+D41S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, D62N+Q64S/T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, E75N+M77S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, K94N, K94N+T96S, S99N, S99N+T101S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T, Q106S/T, P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, T126N+K128S/T, G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T, K130N, K130N+S132T, R131N+Q133S/T, S132N+M134S/T, Q133N+L135S/T, M134N+F136S/T, L135N+R137S/T, F136N+G138S/T, R137N+R139S/T, G138N+R140S/T, R139N+A141S/T, R140N a R140N+S142T, pričom substitúcie sú označované vo vzťahu k hulFNG s aminokyselinovou sekvenciou uvedenou ako sekv. č. 2.

Substitúcie, pri ktorých je potrebná len jedna aminokyselinová mutácia na začlenenie N-glykozylačného miesta zahŕňajú K12S/T, G18S/T, G18N, K37S/T, E38N, M45N, I49N, K61S/T, D63N, Q67N, V70N, K80S/T, F82N, N85S/T, K87S/T, K94N, S99N, Q106S/T, E119N, A124N, K130N a R140N, najmä K12S/T, G18N, G18S/T, K37S/T, E38N, K61S/T, D63N, Q67N, K80S/T, N85S/T, K94N, S99N, Q106S/T, A124N, K130N a R140N (polohy s viac ako 25 % ich bočného reťazca exponovanými na povrchu (v štruktúre bez receptorovej molekuly)) alebo výhodnejšie G18N, E38N, D63N, Q67N, K94N, S99N, A124N, K130N a R140N (s viac ako 50 % ich bočného reťazca exponovanými na povrchu v štruktúre bez receptorovej molekuly).

Z vyššie uvedených zoznamov substitúcií je výhodné vybrať substitúcie umiestnené v rámci 118 N-koncových aminokyselinových zvyškov, najmä v rámci 93 N-koncových aminokyselinových zvyškov.

Ako je uvedené vyššie, okrem začlenenia jedného alebo viacerých glykozylačných miest môžu byť z IFNG polypeptidu existujúce glykozylačné miesta odstránené. Napríklad, akákoľvek z vyššie uvedených substitúcií na začlenenie glykozylačného miesta môže byť kombinovaná so substitúciou na odstránenie ktoréhokoľvek z dvoch prirodzených N-glykozylačných miest huIFNG. Napríklad, IFNG polypeptid môže obsahovať substitúciu N25 a/alebo N97, napr. jednu zo substitúcií N25K/C/D/E a/alebo N97K/C/D/E, ak konjugát podľa vynálezu obsahuje nepolypeptidovú časť majúcu relevantnú K, C, D, E ako pripájaciu skupinu.

IFNG polypeptidová časť konjugátu podľa vynálezu môže obsahovať jediné *in vivo* glykozylačné miesto na monomér. Avšak na to, aby polypeptid dosiahol dostatočnú veľkosť na predĺženie funkčného *in vivo* polčasu rozpadu, je často želateľné, aby obsahoval viac ako jedno *in vivo* glykozylačné miesto, konkrétne 2 až 7 *in vivo* glykozylačných miest, ako napríklad 2, 3, 4, 5, 6 alebo 7 *in vivo* glykozylačných miest. Takže IFNG polypeptid môže obsahovať jedno ďalšie glykozylačné miesto na promótor alebo môže obsahovať dve, tri, štyri, päť, šesť, sedem alebo viac začlenených *in vivo* glykozylačných miest, výhodne začlenených prostredníctvom jednej alebo viacerých substitúcií opísaných v ktoromkoľvek z vyššie uvedených zoznamov.

Odstránenie a/alebo začlenenie *in vitro* glykozylačných miest sa môže dosiahnuť ako je opísané v nasledujúcich častiach o modifikácii IFNG polypeptidu na začlenenie a/alebo odstránenie polymérových pripájacích miest.

Ktorýkoľvek z glykozylovaných IFNG polypeptidov opísaných v tejto časti majúci začlenené a/alebo odstránené aspoň jedno glykozylačné miesto by mohol byť ďalej konjugovaný s druhou nepolypeptidovou časťou. Napríklad, druhou nepolypeptidovou časťou je polymérna molekula, ako napríklad PEG, alebo akákoľvek iná nepolypeptidová časť. Za týmto účelom sa konjugácia môže dosiahnuť použitím pripájacích skupín, ktoré sa už nachádzajú v IFNG polypeptide, alebo sa pripájacie skupiny môžu začleniť a/alebo odstrániť, konkrétne tak, aby bolo na konjugáciu dostupných celkovo 1 až 6, najmä 3 až 4 alebo 1, 2, 3, 4, 5 alebo 6 pripájacích skupín. Výhodne je v konjugáte podľa vynálezu, v ktorom IFNG polypeptid obsahuje dve glykozylačné miesta, počet a molekulová hmotnosť nepolypeptidovej časti vyberaná tak, aby celková molekulová hmotnosti pridaná nepolypeptidovou časťou bola v rozsahu 20 až 40 kDa, konkrétne približne 20 kDa alebo 30 kDa.

Konkrétne, glykozylovaný IFNG polypeptid môže byť konjugovaný s polymérom majúcim cysteín ako pripájaciu skupinu. Za týmto účelom sa môže jeden alebo viacero cysteínových zvyškov začleniť do rodičovského polypeptidu, napr. ktoroukoľvek zo substitúcií uvedenou v časti s názvom "Konjugát podľa vynálezu, v ktorom je nepolypeptidovou časťou molekula majúca cysteín ako pripájaciu skupinu".

Alternatívne alebo okrem toho, môže byť glykozylovaný IFNG polypeptid konjugovaný s polymérom majúcim lyzín ako pripájaciu skupinu. Za týmto účelom sa môže jeden alebo viacero lyzínových zvyškov rodičovského polypeptidu odstrániť, napr. ktoroukoľvek zo substitúcií uvedených v časti s názvom "konjugát podľa vynálezu, v ktorom je nepolypeptidovou časťou molekula, ktorá má lyzín ako pripájaciu skupinu". Alternatívne alebo okrem toho, môže byť lyzínový zvyšok začlenený, napr. ktoroukoľvek zo substitúcií uvedených v spomenutej časti.

Ako alternatíva ku polymérovej konjugácii prostredníctvom cysteínovej alebo lyzínovej skupiny sa môže konjugácia dosiahnuť prostredníctvom kyselinovej skupiny ako je opísané v časti s názvom "Konjugácia podľa vynálezu, pri ktorej sa

nepolypeptidová časť viaže na kyselinovú skupinu" alebo prostredníctvom akejkoľvek inej vhodnej skupiny.

Konjugát podľa vynálezu, v ktorom je prvou nepolypeptidovou časťou polymér

V alternatívnom uskutočnení je prvou nepolypeptidovou časťou polymér, napr. ktorýkoľvek z polymérov opísaných v časti s názvom "Konjugácia s polymérovou molekulou", najmä lineárna alebo rozvetvená PEG molekula, majúca napr. cysteín, lyzín, kyselinu asparágovú alebo kyselinu glutámovú ako pripájaciu skupinu. Začlenenie a/alebo odstránenie pripájacích skupín pre takéto polyméry je ilustrované v nasledujúcich častiach. IFNG polypeptidovou časťou konjugátu podľa tohto uskutočnenia môže byť glykozylovaný polypeptid, napr. použitím jedného alebo oboch prirodzených N-glykozylačných miest hulFNG alebo použitím začleneného glykozylačného miesta ako je opísané v predchádzajúcej časti.

Konjugát podľa vynálezu, v ktorom je nepolypeptidovou časťou molekula majúca cysteín ako pripájaciu skupinu

Vo výhodnom uskutočnení je prvou nepolypeptidovou časťou polymér, ktorý má cysteín ako pripájaciu skupinu a aspoň jeden cysteínový zvyšok začlenený do polohy IFNG polypeptidu, v ktorej sa v divom type ľudského IFNG nachádza na povrchu exponovaný aminokyselinový zvyšok. Výhodne sa cysteínový zvyšok začleňuje v súlade so všeobecným zvážením začleňovania a/alebo odstraňovania pripájacích skupín pre nepolypeptidovú časť, ktoré je uvedené v časti s názvom "Konjugát podľa vynálezu". IFNG polypeptid môže napríklad obsahovať aspoň jednu substitúciu vybranú zo skupiny, ktorá zahŕňa P3C, K6C, N10C, K13C, N16C, D21C, N25C, G26C, G31C, K34C, K37C, E38C, E39C, K55C, K58C, N59C, D62C, Q64C, S65C, K68C, E71C, E75C, N83C, S84C, K86C, K87C, K94C, N97C, S99C, T101C, D102C, L103C a N104C (začlenenie cysteínového zvyšku do polohy, v ktorej sa nachádza aminokyselinový zvyšok majúci viac ako 50 % svojho bočného reťazca exponovaných na povrchu v štruktúre s receptorom). Výnimočne zaujímavé sú substitúcie N25C a N97C a špeciálne N25C+N97C, keď sa IFNG polypeptid exprimuje v neglykozylujúcej hostiteľskej bunke, ako napríklad *E. coli*, keďže N25 a N97 tvoria časť vlastného glykozylačného miesta hulFNG.

Taktiež alebo alternatívne, môže IFNG polypeptid podľa tohto uskutočnenia obsahovať aspoň jeden cysteínový zvyšok začlenený v polohe, v ktorej sa nachádza ktorýkoľvek z aminokyselinových zvyškov 121 až 143 polypeptidu hulFNG.

Výhodne obsahuje IFNG polypeptid konjugátu podľa tohto uskutočnenia celkovo 1 až 8, ako napríklad 2 až 6 Cys zvyškov, napr. 1 až 3 Cys zvyšky, na monomér.

Konjugácia medzi polypeptidom a polymérom sa môže dosiahnuť akýmkoľvek vhodným spôsobom, ako je opísané napr. v časti s názvom "Konjugácia s polymérovou molekulou", napr. použitím jednokrokového spôsobu alebo postupného spôsobu, ktoré sú uvedené v spomenutej časti. Keď konjugát obsahuje dve alebo viac prvých nepolypeptidových častí, má normálne každá z nich molekulovú hmotnosť 5 alebo 10 kDa. Vhodným polymérom je VS-PEG.

Konjugát podľa vynálezu, v ktorom je nepolypeptidovou časťou molekula majúca lyzín ako pripájaciu skupinu

V súlade s týmto uskutočnením je nepolypeptidovou časťou polymér majúci lyzín ako pripájaciu skupinu a IFNG polypeptid je modifikovaný tak, aby bol aspoň jeden lyzínový zvyšok odstránený, pričom tento lyzínový zvyšok je vybraný zo skupiny obsahujúcej K6, K12, K13, K34, K37, K43, K55, K58, K61, K68, K74, K80, K86, K87, K88, K94, K108, K125, K128 a K130, pričom číslovanie je vztiahnuté na sekv. č. 2. Výhodnejšie sa odstraňuje aspoň jeden lyzínový zvyšok vybraný zo skupiny obsahujúcej K12, K34, K37, K108, K128 a K130. Tým je možné zabrániť konjugácii týchto zvyškov. Lyzínový zvyšok (zvyšky) môže byť nahradený akýmkoľvek iným aminokyselinovým zvyškom, ale výhodne je nahradený arginínom alebo glutamínom.

Okrem toho môže byť IFNG polypeptid modifikovaný tak, aby mal začlenený jeden alebo viacero lyzínových zvyškov, najmä v takej polohe hulFNG, v ktorej sa nachádza na povrchu exponovaný aminokyselinový zvyšok. Výhodne sa lyzínový zvyšok začleňuje v súlade so všeobecným zvážením začleňovania a/alebo odstraňovania pripájacích skupín pre nepolypeptidovú časť, ktoré je uvedené v časti s názvom "Konjugát podľa vynálezu", najmä do polohy, v ktorej sa nachádza

aminokyselinový zvyšok majúci aspoň 25 %, ako napríklad aspoň 50 %, svojho bočného reťazca exponovaných na povrchu (takéto polohy sú uvedené nižšie, v časti Materiály a metódy). Aspoň jeden lyzínový zvyšok môže byť začlenený aj substitúciou ktoréhokoľvek z aminokyselinových zvyškov 121 až 143 sekv. č. 2. Alternatívne môže IFNG polypeptid obsahovať lyzín v aspoň jednej polohe vybranej zo skupiny obsahujúcej D2, E7, E9, H19, D21, D24, N25, E38, E39, D41, R42, D62, E71, E75, D76, R89, D90, D91, E93, N97, R107, H111, E112, E119, R129, R131, R137, R139 a R140 sekv. č. 2 (polohy v ktorých sa nachádza N, R, D, E alebo H zvyšok v hulFNG).

Podľa tohto uskutočnenia IFNG polypeptid obsahuje substitúciu v jednej alebo viacerých z uvedených polôh, konkrétne v 1 až 15, ako napríklad 1 až 8 alebo 2 až 8, výhodne v 1 až 5 alebo 2 až 5 polohách (odstránenie a/alebo začlenenie lyzínových zvyškov), na monomér. Napríklad, IFNG polypeptid môže obsahovať substitúciu v 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 alebo 15 z vyššie uvedených polôh. Výnimočne zaujímavé sú substitúcie N25K a N97K a špeciálne N25K+N97K, keď sa IFNG polypeptid exprimuje v neglykozylujúcej hostiteľskej bunke, ako napríklad *E. coli*, keďže N25 a N97 tvoria časť vlastného glykozylačného miesta hulFNG.

Napríklad, IFNG polypeptid konjugátu podľa tohto uskutočnenia môže obsahovať aspoň jednu z vyššie uvedených substitúcií na začlenenie lyzínového zvyšku v kombinácii s aspoň jednou substitúciou na odstránenie lyzínového zvyšku ako sú definované vyššie (výhodne substitúciu na R alebo Q). Napríklad IFNG polypeptid obsahuje aspoň jednu z nasledujúcich substitúcií N25K a N97K v kombinácii s aspoň jednou zo substitúcií K128R, K128Q, K130R a K130Q. Ešte špecifickejšie, IFNG polypeptid obsahuje substitúciu N25K+K128R, N25K+K130R, N25K+K128R+K130R, N97K+K128R, N97K+K130R, N97K+K128R+K130R, N25K+N97K+K128R+K130R, N25K+N97K+K128R a N25K+N97K+K130R.

Hoci nepolypeptidovou časťou konjugátu podľa tohto uskutočnenia vynálezu môže byť ktorákoľvek molekula, ktorá keď sa použije daný spôsob konjugácie, má lyzín ako pripájaciu skupinu (ako napríklad sacharidová časť, lipofilná skupina alebo organické derivatizačné činidlo), výhodné je, aby nepolypeptidovou časťou bola polymérna molekula. Polymérnou molekulou môže byť ktorákoľvek z molekúl

uvedených v časti s názvom "Konjugácia s polymérnou molekulou", ale výhodne je vybraná zo skupiny obsahujúcej lineárny alebo rozvetvený polyetylénglykol alebo polyalkylén oxid. Najvýhodnejšie je polymérnou molekulou SS-PEG, NPC-PEG, aldehyd-PEG, mPEG-SPA, mPEG-SCM, mPEG-BTC od Shearwater Polymers, Inc., SC-PEG od Enzon, Inc., trezylovaný mPEG, ako je opísaný v US 5880255 alebo oxykarbonyl-oxy-*N*-dikarboxyimid-PEG (US 5122614). Normálne má nepolypeptidová časť na konjugáciu s lyzínovým zvyškom molekulovú hmotnosť približne 5 alebo 10 kDa.

Konjugát podľa vynálezu, v ktorom sa nepolypeptidová časť viaže na kyselinovú skupinu

V ešte ďalšom uskutočnení je nepolypeptidovou časťou konjugátu podľa vynálezu molekula, ktorá má kyselinovú skupinu ako pripájaciu skupinu, a IFNG polypeptid obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od aminokyselinovej sekvencie označenej ako sekv. č. 2 v tom, že aspoň jeden na povrchu exponovaný aminokyselinový zvyšok bol substituovaný zvyškom kyseliny asparágovej alebo zvyškom kyseliny glutámovej, výhodne v súlade so všeobecným zvážením uvedeným v časti s názvom "Konjugát podľa vynálezu". Alternatívne môže byť Asp alebo Glu zvyšok začlenený do polohy rodičovského IFNG polypeptidu, v ktorej sa nachádza K, R, Q alebo N. Asp alebo Glu zvyškom môžu byť substituované napríklad N25, N97, K125, K128, R129, K130 a/alebo R131, výhodnejšie N25 a/alebo N97, najvýhodnejšie N25+N97.

Analogicky s opisom v predchádzajúcich častiach môže byť jeden alebo viacero Asp alebo Glu zvyškov odstránených, napr. z receptor viažuceho miesta, v prípade, že sa nepolypeptidová časť viaže na tieto zvyšky.

Hoci nepolypeptidovou časťou konjugátu podľa tohto uskutočnenia vynálezu, ktorá má kyselinovú skupinu ako pripájaciu skupinu, môže byť akákoľvek nepolypeptidová časť s takouto vlastnosťou, tu je výhodné, aby nepolypeptidovou časťou bola polymérna molekula alebo organické derivatizačné činidlo, najmä polymérna molekula, a aby sa konjugát pripravoval ako je opísané napr. v Sakane a Pardridge, Pharmaceutical Research, zv. 14, č. 8, 1997, str. 1085-1091.

Nepolypeptidová časť konjugátu podľa vynálezu

Ako je podrobnejšie uvedené vyššie, nepolypeptidová časť konjugátu podľa vynálezu je výhodne vybraná zo skupiny, ktorá obsahuje polymérovú molekulu, lipofilnú zlúčeninu, sacharidovú časť (prostredníctvom *in vivo* glykozylácie) a organické derivatizačné činidlo. Všetky tieto činidlá môžu poskytnúť polypeptidovej časti konjugátu požadované vlastnosti, najmä predĺžený funkčný *in vivo* polčas rozpadu a/alebo zníženú imunogénnosť. Polypeptidová časť konjugátu je normálne konjugovaná len s jedným typom nepolypeptidovej časti, ale môže byť konjugovaná aj s dvoma alebo viacerými odlišnými typmi nepolypeptidových častí, napr. s polymérovou molekulou a sacharidovou časťou, s lipofilnou skupinou a sacharidovou časťou, s organickým derivatizačným činidlom a sacharidovou časťou, s lipofilnou skupinou a polymérovou molekulou, atď. Konjugácia s dvoma alebo viacerými odlišnými nepolypeptidovými časťami sa môže uskutočňovať simultánne alebo postupne.

Spôsoby prípravy konjugátu podľa vynálezu

V nasledujúcich častiach "Konjugácia s lipofilnou zlúčeninou", "Konjugácia s polymérovou molekulou", "Konjugácia so sacharidovou časťou" a "Konjugácia s organickým derivatizačným činidlom" je opísaná konjugácia so špecifickými typmi nepolypeptidových častí.

Konjugácia s lipofilnou zlúčeninou

Polypeptid a lipofilná zlúčenina sa môžu navzájom konjugovať buď priamo, alebo použitím spojovníka. Lipofilnou zlúčeninou môže byť prirodzená zlúčenina, ako napríklad nasýtená alebo nenasýtená mastná kyselina, diketón mastnej kyseliny, terpén, prostaglandín, vitamín, karotenoid alebo steroid, alebo syntetická zlúčenina, ako napríklad kyselina uhličitá, alkohol, amín a kyselina sírová s jednou alebo viacerými alkylovými, arylovými, alkenylovými alebo inými viacnásobne nenasýtenými zlúčeninami. Konjugácia medzi polypeptidom a lipofilnou zlúčeninou, voliteľne prostredníctvom spojovníka, sa môže uskutočňovať v súlade s metódami známymi v oblasti, ako je opísané napr. v Bodanszky, Peptid Synthesis, John Wiley, New York, 1976 a vo WO 96/12505.

Konjugácia s polymérovou molekulou

Polymérovou molekulou na párovanie s polypeptidom môže byť akákoľvek vhodná polymérová molekula, ako napríklad prirodzený alebo syntetický homopolymér alebo heteropolymér, typicky s molekulovou hmotnosťou v rozsahu 300 až 100000 Da, ako napríklad 300 až 20000 Da, výhodnejšie v rozsahu 500 až 10000 Da, ešte výhodnejšie v rozsahu 500 až 5000 Da.

Príklady homopolymérov zahŕňajú polyol (tzn. poly-OH), polyamín (tzn. poly-NH_2) a polykarboxylovú kyselinu (tzn. poly-COOH). Heteropolymérom je polymér, ktorý obsahuje jednu alebo viacero odlišných párovacích skupín, ako napr. hydroxylovú skupinu a amínovú skupinu.

Príklady vhodných polymérových molekúl zahŕňajú polymérové molekuly vybrané zo skupiny, ktorá obsahuje polyalkylénoxid (PAO), vrátane polyalkylénglykolu (PAG), ako napríklad polyetylénglykolu (PEG) a polypropylénglykolu (PPG), rozvetvené PEGs, polyvinylalkohol (PVA), polykarboxylát, poly-(vinylpyrolidón), anhydrid kyseliny polyetylén-ko-maleínovej, anhydrid kyseliny polystyrén-ko-malónovej, dextrán vrátane karboxymetyldextránu alebo ktorýkoľvek iný biopolymér vhodný na redukciu imunogénnosti a/alebo na predĺženie funkčného *in vivo* polčasu rozpadu. Iným príkladom polymérnej molekuly je ľudský albumín alebo iný hojne sa vyskytujúci plazmatický proteín. Vo všeobecnosti sú polyméry, ktoré sú derivátmi polyalkylénglykolu, biokompatibilné, netoxické, neantigénne, neimunogénne, majú rôzne vlastnosti rozpustnosti vo vode a ľahko sa vylučujú zo živých organizmov.

PEG je výhodnou polymérovou molekulou na použitie, keďže má len niekoľko reaktívnych skupín, ktoré sú schopné vytvárať priečne väzby, v porovnaní napr. s polysacharidmi, ako napríklad dextránom a podobne. Zaujímavý je najmä monofunkčný PEG, napr. monometoxypolyetylénglykol (mPEG), keďže chemický proces jeho párovania je relatívne jednoduchý (len jedna reaktívna skupina je prístupná na konjugáciu s pripájacími skupinami na polypeptide). Takže je eliminované riziko vytvárania priečnych väzieb, výsledné polypeptidové konjugáty sú homogénnejšie a je možné jednoduchšie riadiť reakciu polymérnych molekúl s polypeptidom.

Na účinné kovalentné pripojenie polymérnej molekuly (molekúl) na polypeptid, musia byť hydroxylové koncové skupiny polymérnej molekuly poskytnuté

v aktivovanej forme, tzn. s reaktívnymi funkčnými skupinami (príklady ktorých zahŕňajú primárne aminoskupiny, hydrazín (HZ), tiol, jantaran (SUC), sukcinimidyl jantaran (SS), sukcinimidyl sukcinamid (SSA), sukcinimidyl propionát (SPA), sukcinimidyl karboxymetylát (SCM), benzotriazol karbonát (BTC), *N*-hydroxy-sukcinimid (NHS), aldehyd, nitrofenylkarbonát (NPC) a trezylát (TRES)).Vhodné aktivované polymérové molekuly sú komerčne dostupné napr. od Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL, USA. Alternatívne je možné polymérové molekuly aktivovať bežnými metódami známymi v oblasti, ako sú opísané napr. vo WO 90/13540. Konkrétne príklady aktivovaných lineárnych alebo rozvetvených polymérových molekúl na použitie v predloženom vynáleze sú opísané v katalógoch firmy Shearwater Polymers, Inc. 1997 a 2000 (Functionalized Biocompatible Polymers for Research and pharmaceuticals, Polyethylene Glycol and Derivatives, ktoré sú tu zahrnuté ich citáciou). Konkrétne príklady aktivovaných PEG polymérov zahŕňajú nasledujúce lineárne PEGs: NHS-PEG (napr. SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG a SCM-PEG) a NOR-PEG, BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG a MAL-PEG a rozvetvené PEGs, ako napríklad PEG2-NHS a tie, ktoré sú opísané v US 5932462 a US 5643575, pričom oba tieto dokumenty sú tu zahrnuté ich citáciou. Okrem toho, nasledujúce publikácie, ktoré sú tu zahrnuté ich citáciou, opisujú užitočné polymérne molekuly a/alebo PEGylačné chemické postupy: US 5824778, US 5476653, WO 97/32607, EP 229108, EP 402378, US 4902502, US 5281698, US 5122614, US 5219564, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO95/13090, 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, EP 439508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921131, US 5736625, WO 98/05363, EP 809996, US 5629384, WO 96/41813, WO 96/07670, US 5473034, US 5516673, EP 605963, US 5382657, EP 510356, EP 400472, EP 183503 a EP 154316.

Konjugácia polypeptidu a aktivovaných polymérnych molekúl sa uskutočňuje použitím ktoréhokoľvek bežného spôsobu, ako je opísané napr. v nasledujúcich publikáciách (ktoré opisujú aj vhodné metódy na aktiváciu polymérnych molekúl):

Harris a Zalipsky, vyd., Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications, AZC, Washington; R. F. Taylor, (1991), "Protein immobilisation. Fundamental and applications", Marcel Dekker, N. Y.; S. S. Wong, (1992), "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson a ďalší, (1993), "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, N.Y. Pre priemerného odborníka v oblasti bude zrejmé, že spôsob aktivácie a/alebo konjugačný chemický proces, ktorý sa má použiť, bude závisieť na pripájacej skupine (skupinách) IFNG polypeptidu, ako aj na funkčných skupinách polyméru (ktorými sú napr. amino, hydroxyl, karboxyl, aldehyd alebo sulfhydryl). PEGylácia môže byť riadená tak, aby sa konjugovali všetky dostupné pripájacie skupiny polypeptidu (tzn. také pripájacie skupiny, ktoré sú vystavené na povrchu polypeptidu) alebo sa môže smerovať na špecifické pripájacie skupiny, napr. N-koncovú aminoskupinu (US 5985265). Okrem toho je možné konjugáciu dosiahnuť v jednom kroku alebo postupným spôsobom (ako je opísané napr. vo WO 99/55377).

Bude zrejmé, že PEGylácia sa navrhuje tak, aby produkovala optimálnu molekulu čo sa týka počtu pripojených PEG molekúl, veľkosti a formy (napr. či sú lineárne alebo rozvetvené) takýchto molekúl, a toho kde na polypeptide sú takéto molekuly pripojené. Napríklad molekulová hmotnosť polyméru, ktorý sa má použiť, môže byť vybraná na základe požadovaného účinku, ktorý sa má dosiahnuť. Ak je napríklad primárnym účelom konjugácie dosiahnuť konjugát s vysokou molekulovou hmotnosťou (napr. na redukciu odstraňovania obličkami), zvyčajne je želateľné konjugovať čo najmenej polymérnych molekúl s vysokou molekulovou hmotnosťou, aby sa získala požadovaná molekulová hmotnosť. Keď je želateľný vysoký stupeň epitopového zatienenia, je to možné získať použitím dostatočne vysokého počtu polymérov s nízkou molekulovou hmotnosťou (napr. s molekulovou hmotnosťou približne 5000 Da), aby sa účinne zatienili všetky alebo väčšina epitopov polypeptidu. Použitých môže byť napríklad 2 až 8, ako napríklad 3 až 6 polymérov.

V spojitosti s konjugáciou len s jednou pripájacou skupinou v proteíne (ako je opísané v US 5985265) môže byť výhodné, aby polymérová molekula, ktorá môže byť lineárna alebo rozvetvená, mala vysokú molekulovú hmotnosť, napr. približne 20 kDa.

Normálne sa polymérová konjugácia uskutočňuje v podmienkach, ktorých cieľom je reagovanie všetkých dostupných polymérových pripájacích skupín s polymérovými molekulami. Typicky je molárny pomer aktivovaných polymérových molekúl ku polypeptidu 1000:1, najmä 200:1, výhodne 100:1, ako napríklad 10:1 alebo 5:1, aby sa získala optimálna reakcia. Použité však môžu byť aj ekvimolárne pomery.

Vynález zahŕňa aj párovanie polymérových molekúl s polypeptidom prostredníctvom spojovníka. Vhodné spojovníky sú pre priemerného odborníka v danej oblasti techniky dobre známe. Výhodným príkladom je kyanúrový chlorid (Abuchowski a ďalší, (1977), J. Biol. Chem., 252, 3578-3581; US 4179337; Shafer a ďalší, (1986), J. Polym. Sci. Polym. Chem. vyd., 24,375-378.

Následne po konjugácii sa zvyšné aktivované polymérové molekuly blokujú spôsobmi známymi v oblasti, napr. pridaním primárneho amínu do reakčnej zmesi, a výsledné inaktivované polymérové molekuly sa odstraňujú vhodným spôsobom.

Spájanie so sacharidovou časťou

Pripájanie sacharidovej časti sa môže uskutočniť *in vivo* alebo *in vitro*. Na dosiahnutie *in vivo* glykozylácie polypeptidu s IFNG aktivitou, ktorý bol modifikovaný začlenením jedného alebo viacerých *in vivo* glykozylačných miest (pozri časť "Konjugáty podľa vynálezu, v ktorých je nepolypeptidovou časťou sacharidová časť"), sa musí sekvencia kódujúca polypeptidovú časť konjugátu vniesť do glykozylujúceho eukaryotického expresného hostiteľa. Expresná hostiteľská bunka môže byť vybraná z plesňovej bunky (bunka vláknitých húb alebo kvasinková bunka), hmyzej bunky, cicavčej bunky, alebo z buniek transgénnych rastlín. Okrem toho je možné glykozyláciu dosiahnuť v ľudskom tele, keď sa nukleotidová sekvencia kódujúca polypeptidovú časť konjugátu podľa vynálezu alebo polypeptid podľa vynálezu používa na génovú terapiu. V jednom uskutočnení je hostiteľskou bunkou cicavčia bunka, ako napríklad CHO bunka, BHK alebo HEK bunka, napr. HEK293, alebo hmyzia bunka, ako napríklad SF9 bunka, alebo kvasinková bunka, napr. *Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris*, alebo akýkoľvek iný vhodný glykozylujúci hostiteľ, ako je podrobnejšie opísané napr. nižšie. Voliteľne sa sacharidové časti pripojené na IFNG polypeptid *in vivo* glykozyláciou ďalej

modifikujú použitím glykozyltransferáz, napr. použitím glycoAdvance® technológie predávanej firmou Neose, Horsham, PA, USA. Tým je možné napr. zvýšiť sialyáciu glykozylovaného IFNG polypeptidu po jeho expresii a *in vivo* glykozylácii CHO bunkami.

Kovalentné *in vitro* pripájanie glykozidov na aminokyselinové zvyšky IFNG sa môže používať na modifikáciu alebo na zvýšenie počtu alebo profilu uhľovodíkových substituentov. V závislosti na použitom spôsobe pripájania sa sacharid (sacharidy) môže pripájať na a) arginín a histidín, b) voľné karboxylové skupiny, c) voľné sulfhydrylové skupiny, ako napríklad sulfhydrylové skupiny cysteínu, d) voľné hydroxylové skupiny, ako napríklad na hydroxylové skupiny serínu, treonínu, tyrozínu alebo hydroxyprolínu, e) aromatické zvyšky, ako napríklad fenylalanínové alebo tryptofánové alebo f) na amidovú skupinu glutamínu. Tieto aminokyselinové zvyšky predstavujú príklady pripájacích skupín pre sacharidovú časť, ktoré môžu byť začlenené do a/alebo odstránené z IFNG polypeptidu konjugátu podľa vynálezu. Vhodné spôsoby *in vitro* pripájania sú opísané napríklad vo WO 87/05330 a v Aplin a ďalší, CRC Crit Rev. Biochem., str. 259-306, 1981. *In vitro* pripájanie sacharidových častí alebo PEG na Gln zvyšky naviazané na proteín a peptid sa môže uskutočňovať aj transglutaminázami (TGázy), ako je opísané napr. v Sato a ďalší, 1996, Biochemistry, 35, 13072-13080 alebo v EP 725145.

Konjugácia s organickým derivatizačným činidlom

Kovalentnú modifikáciu IFNG polypeptidu je možné uskutočňovať reagovaním pripájacej skupiny (skupín) polypeptidu s organickým derivatizačným činidlom. Vhodné derivatizačné činidlá a spôsoby sú v oblasti dobre známe. Napríklad cysteinylové zvyšky najbežnejšie reagujú s α-halogénacetátmi (a zodpovedajúcimi amínmi), ako napríklad kyselinou chlóroctovou alebo chlóracetamidom, čím vznikajú karboxymetylové alebo karboxyamidometylové deriváty. Cysteinylové zvyšky je možné derivatizovať aj reakciou s brómtrifluóracetónom, kyselinou α-bróm-β-(4-imidozoyl)propiónovou, chlóracetylfosfátom, N-alkylmaleimidmi, 3-nitro-2-pyridyldisulfidom, metyl-2-pyridyldisulfidom, *p*-chlórmerkuribenzoátom, 2-chlórmerkuri-4-nitrofenolom alebo chlór-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolom. Histidylové zvyšky sa derivatizujú reakciou s dietylpyro-karbonátom, pri

pH 5,5 až 7,0, pretože toto činidlo je relatívne špecifické pre histidylový bočný reťazec. Užitočný je aj *para*-brómfenacylbromid; reakcia sa výhodne uskutočňuje v 0,1M kakodyláte sodnom pri pH 6,0. Lyzinylové alebo aminokoncové zvyšky reagujú s anhydridom kyseliny jantárovej alebo anhydridmi iných karboxylových kyselín. Účinkom derivatizácie týmito činidlami je reverzia náboja lyzinylových zvyškov. Iné vhodné reakčné činidlá na derivatizáciu zvyškov obsahujúcich α-amino zahŕňajú imidoestery, ako napríklad metylpikolinimidát; pyridoxalfosfát; pyridoxal; chlórbórhydrid; kyselinu trinitrobenzénsulfónovú; *O*-metylizomočovinu; 2,4-pentándión a transaminázou katalyzovanú reakciu s glyoxylátom. Arginylové zvyšky sa modifikujú reakciou s jedným alebo niekoľkými bežnými reakčnými činidlami zahŕňajúcimi fenylglyoxal, 2,3-butándión, 1,2-cyklohexándión a ninhydrín. Derivatizácia arginínových zvyškov vyžaduje, aby sa reakcia uskutočňovala v alkalických podmienkach, kvôli vysokej pKa guanidínovej funkčnej skupiny. Okrem toho, tieto reakčné činidlá môžu reagovať so skupinami lyzínu, ako aj s arginínovou guanidino skupinou. Karboxylové bočné skupiny (aspartylová alebo glutamylová skupina) sa selektívne modifikujú reakciou s karbodiimidmi (R-N=C=N-R'), kde R a R' znamenajú rozličné alkylové skupiny, ako napríklad 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinyl-4-etyl)karbodiimid alebo 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetylpentyl)karbodiimid. Okrem toho sa aspartylové a glutamylové zvyšky konvertujú na asparaginylové a glutaminylové zvyšky reakciou s amónnymi iónmi.

Blokovanie funkčného miesta

Bolo publikované, že nadmerná polymérová konjugácia môže viesť k strate aktivity polypeptidu, s ktorým sa polymér konjuguje. Tento problém je možné eliminovať napr. odstránením pripájacích skupín umiestnených vo funkčnom mieste alebo blokovaním funkčného miesta pred konjugáciou. Tieto druhé stratégie predstavujú ďalšie uskutočnenia vynálezu (príklad prvej stratégie je podrobnejšie uvedený vyššie, napr. odstraňovanie lyzínových zvyškov, ktoré môžu byť lokalizované v blízkosti funkčného miesta). Konkrétnejšie, v súlade s druhou stratégiou sa konjugácia medzi polypeptidom a nepolypeptidovou časťou uskutočňuje v podmienkach, v ktorých sa funkčné miesto IFNG polypeptidu blokuje pomocnou molekulou, ktorá je schopná viazať sa na funkčné miesto polypeptidu.

Výhodne je pomocnou molekulou molekula, ktorá špecificky rozoznáva funkčné miesto polypeptidu, ako napríklad receptor. Alternatívne môže byť pomocnou molekulou protilátka, najmä monoklonálna protilátka rozoznávajúca polypeptid vykazujúci IFNG aktivitu. Pomocnou molekulou môže byť najmä neutralizačná monoklonálna protilátka.

Polypeptid sa nechá interagovať s pomocnou molekulou pred uskutočňovaním konjugácie. Toto zaisťuje, aby bolo funkčné miesto polypeptidu tienené alebo chránené a následkom toho nedostupné pre derivatizáciu nepolypeptidovou časťou, ako napríklad polymérom. Po eluovaní od pomocnej molekuly sa môže znova izolovať konjugát medzi nepolypeptidovou časťou a polypeptidom s aspoň čiastočne zachovaným funkčným miestom.

Následná konjugácia polypeptidu majúceho blokované funkčné miesto s polymérom, lipofilnou zlúčeninou, organickým derivatizačným činidlom alebo akoukoľvek inou zlúčeninou sa uskutočňuje normálnym spôsobom, ako je opísané napr. vo vyššie uvedených častiach s názvom "Konjugácia s...".

V ďalšom uskutočnení sa pomocná molekula najprv kovalentne naviaže na tuhú fázu, ako napríklad kolónové baliace materiály, napríklad Sephadex alebo agarózové guličky, alebo na povrch, napr. na reakčnú nádobu. Potom sa polypeptid nanesie na kolónový materiál nesúci pomocnú molekulu a uskutočňuje sa konjugácia v súlade so spôsobmi známymi v oblasti, ako je opísané napr. vo vyššie uvedených častiach s názvom "Konjugácia s...". Tento postup umožňuje oddelenie polypeptidového konjugátu od pomocnej molekuly eluovaním. Polypeptidový konjugát sa eluuje bežnými technikami v takých fyzikálnych a chemických podmienkach, ktoré nevedú k podstatnej degradácii polypeptidového konjugátu. Tekutá fáza obsahujúca polypeptidový konjugát sa oddeľuje od tuhej fázy, na ktorú ostáva naviazaná pomocná molekula. Separáciu je možné dosiahnuť inými spôsobmi: Napríklad, pomocná molekula sa môže derivatizovať druhou molekulou (napr. biotínom), ktorý môže byť rozoznávaný špecifickou viažucou látkou (napr. streptavidínom). Špecifická viažuca látka môže byť spojená s tuhou fázou, čím sa umožní separovanie polypeptidového konjugátu od komplexu pomocnej molekuly a druhej molekuly prostredníctvom pasážovania cez kolónu, v ktorej je na tuhej fáze naviazaná druhá pomocná molekula, pričom táto kolóna bude pri následnej elúcii

zadržiavať komplex pomocnej molekuly a druhej molekuly, ale nebude zadržiavať polypeptidový konjugát. Polypeptidový konjugát je možné uvoľniť z pomocnej molekuly akýmkoľvek vhodným spôsobom. Odstránenie ochrannej molekuly je možné dosiahnuť poskytnutím podmienok, v ktorých pomocná molekula disociuje z funkčného miesta IFNG, na ktoré bola naviazaná. Napríklad, komplex medzi protilátkou, s ktorou je polymér konjugovaný, a antiidiotypovou protilátkou je možné disociovať nastavením pH na kyslé alebo zásadité pH.

Konjugácia polypeptidu s príveskom

V alternatívnom uskutočnení sa IFNG polypeptid exprimuje ako fúzovaný proteín s príveskom, tzn. aminokyselinovou sekvenciou alebo peptidovým reťazcom vytvoreným typicky z 1 až 30, ako napríklad 1 až 20, aminokyselinových zvyškov. Okrem toho, že umožňuje rýchlu a jednoduchú purifikáciu, je prívesok bežným nástrojom na dosiahnutie konjugácie medzi IFNG polypeptidom s príveskom a nepolypeptidovou časťou. Prívesok môže byť použitý najmä na dosiahnutie konjugácie v mikrotitračných platniach alebo na iných nosičoch, ako napríklad paramagnetických guličkách, na ktorých môže byť polypeptid s príveskom imobilizovaný prostredníctvom prívesku. Konjugácia polypeptidu s príveskom, napr. v mikrotitračných platniach, má tú výhodu, že polypeptid s príveskom sa môže imobilizovať na mikrotitračných platniach priamo z kultivačného média (v princípe bez akejkoľvek purifikácie) a môže sa priamo podrobiť konjugácii. Tým je možné redukovať celkový počet procesných krokov (od expresie po konjugáciu). Okrem toho môže prívesok fungovať ako medzerníková molekula na zaistenie zlepšenej dostupnosti imobilizovaného polypeptidu, ktorý sa má konjugovať. Polypeptid s príveskom sa môže použiť na konjugáciu s ktoroukoľvek z tu opísaných nepolypeptidových častí, napr. s polymérovou molekulou, ako napríklad PEG.

Identita špecifického prívesku, ktorý sa má použiť, nie je kritická, pokiaľ je prívesok schopný exprimovať sa s polypeptidom a pokiaľ je schopný byť imobilizovaný na vhodnom povrchu alebo nosičovom materiáli. Množstvo vhodných príveskov je komerčne dostupných, napr. od Unizyme Laboratories, Dánsko. Prívesok môže mať napríklad ktorúkoľvek z nasledujúcich sekvencií:
His-His-His-His-His-His

Met-Lys-His-His-His-His-His-His
Met-Lys-His-His-Ala-His-His-Gln-His-His
Met-Lys-His-Gln-His-Gln-His-Gln-His-Gln-His-Gln-His-Gln
(všetky sú dostupné od Unizyme Laboratories, Dánsko)
alebo ktorúkoľvek z nasledujúcich:
EQKLI SEEDL (C-koncový prívesok opísaný v Mol. Cell. Biol. 5: 3610-16,1985)
DYKDDDDK (C- alebo N-koncový prívesok)
YPYDVPDYA

Protilátky proti vyššie uvedeným príveskom sú komerčne dostupné napr. od ADI, Aves Lab and Research Diagnostics.

Bežný spôsob na použitie polypeptidu s príveskom na PEGyláciu je uvedený v časti Materiály a metódy, nižšie.

Následné odštiepenie prívesku od polypeptidu je možné dosiahnuť použitím komerčne dostupných enzýmov.

Polypeptidy podľa vynálezu

Ďalšie uskutočnenia vynálezu sa vo všeobecnosti týkajú tu opísaných nových IFNG polypeptidov. Nové polypeptidy sú dôležitými medziproduktami na prípravu konjugátu podľa vynálezu. Okrem toho, samotné tieto polypeptidy majú zaujímavé vlastnosti.

Napríklad, nový IFNG polypeptid obsahuje aspoň jednu substitúciu na povrchu exponovaného aminokyselinového zvyšku s K, R, D, E, C, S, T alebo N, ako je podrobnejšie opísané v predchádzajúcej časti prihlášky.

Spôsoby prípravy IFNG polypeptidu

IFNG polypeptid, voliteľne v glykozylovanej forme, môže byť produkovaný akýmkoľvek vhodným spôsobom známym v oblasti. Takéto spôsoby zahŕňajú konštruovanie nukleotidovej sekvencie kódujúcej polypeptid a exprimovanie sekvencie vo vhodnom transformovanom alebo transfekovanom hostiteľovi. Avšak polypeptidy podľa vynálezu môžu byť produkované, hoci s menšou účinnosťou, chemickou syntézou alebo kombináciou chemickej syntézy a technológie rekombinantnej DNA.

Nukleotidová sekvencia podľa vynálezu kódujúca IFNG polypeptid (v monomérnej alebo jednoreťazcovej forme) môže byť konštruovaná izoláciou alebo syntézou nukleotidovej sekvencie kódujúcej rodičovský IFNG, napr. huIFNG s aminokyselinovou sekvenciou označenou ako sekv. č. 2, a potom zmenou nukleotidovej sekvencie tak, aby sa uskutočnilo začlenenie (tzn. inzercia alebo substitúcia) alebo delécia (tzn. odstránenie alebo substitúcia) relevantného aminokyselinového zvyšku (zvyškov).

Nukleotidová sekvencia sa bežne modifikuje miestne špecifickou mutagenézou v súlade s dobre známymi metódami, pozri napr. Mark a ďalší, "Site-specific Mutagenesis of the Human Fibroblast Interferon Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, str. 5662-66 (1984) a US 4588585.

Alternatívne sa nukleotidová sekvencia pripravuje chemickou syntézou, napr. použitím oligonukleotidového syntetizéra, v ktorom sa oligonukleotidy navrhujú na základe aminokyselinovej sekvencie požadovaného polypeptidu a výhodne sa vyberajú tie kodóny, ktoré sú uprednostňované hostiteľskou bunkou, v ktorej bude produkovaný rekombinantný polypeptid. Napríklad, niekoľko malých oligonukleotidov kódujúcich časti požadovaného polypeptidu môže byť syntetizovaných a zostavených prostredníctvom PCR, ligácie alebo ligačnej reťazovej reakcie (LCR). Jednotlivé oligonukleotidy typicky obsahujú 5' alebo 3' prečnievania na komplementárne zostavovanie.

Keď už je zostavená (prostredníctvom syntézy, miestne špecifickej mutagenézy alebo iným spôsobom), začlení sa nukleotidová sekvencia kódujúca polypeptid do rekombinantného vektora a operatívne sa napojí na riadiace sekvencie nevyhnutné pre expresiu IFNG v požadovanej transformovanej hostiteľskej bunke.

Samozrejme je potrebné, aby bolo jasné, že nie všetky vektory a expresné riadiace sekvencie fungujú rovnako dobre pri expresii nukleotidovej sekvencie kódujúcej tu opísaný IFNG polypeptid. Nie všetci hostitelia budú fungovať rovnako dobre s rovnakým expresným systémom. Avšak priemerný odborník v oblasti môže vybrať spomedzi týchto vektorov, expresných riadiacich sekvencií a hostiteľov bez nadmerného experimentovania. Napríklad, pri výbere vektora je potrebné brať do úvahy hostiteľa, pretože vektor sa v ňom musí replikovať alebo musí byť schopný

integrovať sa do chromozómu. Do úvahy je potrebné brať aj počet kópií vektora, schopnosť kontrolovať tento počet kópií a expresiu akýchkoľvek iných proteínov kódovaných vektorom, ako napríklad antibiotikových markerov. Pri výbere expresnej riadiacej sekvencie by sa mali zvažovať rôzne faktory. Tieto zahŕňajú napríklad relatívnu silu sekvencie, jej kontrolovateľnosť a jej kompatibilitu s nukleotidovou sekvenciou kódujúcou polypeptid, najmä čo sa týka potenciálnych sekundárnych štruktúr. Hostitelia by sa mali vyberať po zvážení ich kompatibility s vybraným vektorom, toxicity produktu kódovaného nukleotidovou sekvenciou, ich sekrečných vlastností, ich schopnosti správne poskladať polypeptid, ich fermentačných alebo kultivačných požiadaviek a jednoduchosti purifikácie produktov kódovaných nukleotidovou sekvenciou.

Rekombinantným vektorom môže byť autonómne sa replikujúci vektor, tzn. vektor, ktorý existuje ako extrachromozomálna entita, ktorej replikácia nie je závislá na chromozomálnej replikácii, napr. plazmid. Alternatívne je vektorom taký vektor, ktorý sa po zavedení do hostiteľskej bunky integruje do hostiteľského bunkového genómu a replikuje sa spolu s chromozómom (chromozómami), do ktorého sa integroval.

Vektorom je výhodne expresný vektor, v ktorom je nukleotidová sekvencia kódujúca IFNG polypeptid operatívne spojená s ďalšími segmentami potrebnými na transkripciu nukleotidovej sekvencie. Vektor je typicky odvodený od plazmidovej alebo vírusovej DNA. Množstvo tu uvedených vhodných expresných vektorov na expresiu v hostiteľských bunkách je dostupných komerčne alebo opísaných v literatúre. Užitočné expresné vektory pre eukaryotických hostiteľov zahŕňajú napríklad vektory obsahujúce expresné riadiace sekvencie z SV40, hovädzieho papilloma vírusu, adenovírusu a cytomegalovírusu. Konkrétnymi vektormi sú napr. pCDNA3.1 (+)\Hyg (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a pCI-neo (Stratagene, La Jola, CA, USA). Užitočné expresné vektory pre bakteriálnych hostiteľov zahŕňajú známe bakteriálne plazmidy, ako napríklad plazmidy z *E. coli*, vrátane pBR322, pET3a a pET12a (oba od Novagen Inc., WI, USA), plazmidy so širším rozsahom hostiteľov, ako napríklad RP4, fágové DNAs, napr. početné deriváty fága lambda, napr. NM989, a iných DNA fágov, ako napríklad M13 a vláknitých jednoreťazcových DNA fágov. Užitočné expresné vektory pre kvasinkové bunky zahŕňajú 2μ plazmid a jeho

deriváty, POT1 vektor (US 4931373), pJS037 vektor opísaný v Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782, 202-207,1996 a pPICZ A, B alebo C (Invitrogen). Užitočné vektory pre hmyzie bunky zahŕňajú pVL941, pBG311 (Cate a ďalší, "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance And Expression of the Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, str. 685-98 (1986), pBluebac 4.5 a pMelbac (oba dostupné od Invitrogen).

Iné vektory na použitie v tomto vynáleze zahŕňajú vektory, ktoré umožňujú, aby sa sekvencia kódujúca IFNG polypeptid amplifikovala v určitom počte kópií. Takéto amplifikovateľné vektory sú v oblasti dobre známe. Zahŕňajú napríklad vektory schopné amplifikovať sa prostredníctvom DHFR amplifikácie (pozri napr. Kaufman, US 4470461, Kaufman a Sharp, "Construction Of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression", Mol. Cell. Biol., 2, str. 1304-19 (1982)) a glutamín syntetázovej ("GS") amplifikácie (pozri napr. US 5122464 a EP 338841).

Rekombinantný vektor môže ďalej obsahovať DNA sekvenciu, ktorá umožňuje replikáciu vektora v danej hostiteľskej bunke. Príkladom takejto sekvencie (keď je hostiteľskou bunkou cicavčia bunka) je SV40 počiatok replikácie. Keď je hostiteľskou bunkou kvasinková bunka, vhodnými sekvenciami umožňujúcimi replikáciu vektora sú replikačné gény kvasinkového plazmidu 2μ, REP 1 až 3 a počiatok replikácie.

Vektor môže obsahovať aj selektovateľný marker, napr. gén, ktorého produkt komplementuje defekt v hostiteľskej bunke, ako napríklad gén kódujúci dihydrofolát reduktázu (DHFR) alebo *Schizosaccharomyces pombe* TPI gén (opísaný v P. R. Russell, Gene 40,1985, str. 125-130), alebo gén poskytujúci rezistenciu voči liečivu, napr. ampicilínu, kanamycínu, tetracyklínu, chloramfenikolu, neomycínu, hygromycínu alebo metotrexátu. Selektovateľné markery pre vláknité huby zahŕňajú *amdS*, *pyrG*, *arcB*, *niaD*, *sC*.

Výraz "riadiace sekvencie" je tu definovaný tak, aby zahŕňal všetky komponenty, ktoré sú nevyhnutné alebo výhodné na expresiu IFNG polypeptidu. Každá riadiaca sekvencia môže byť prirodzená alebo cudzia vo vzťahu k nukleokyselinovej sekvencii kódujúcej polypeptid. Takéto riadiace sekvencie zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na vedúcu sekvenciu, polyadenylačnú sekvenciu, propeptidovú

sekvenciu, promótor, zosiľovač alebo upstream aktivačnú sekvenciu, signálnu peptidovú sekvenciu a transkripčný terminátor. Minimálne zahŕňajú riadiace sekvencie promótor.

V predloženom vynáleze môže byť použité široké spektrum expresných riadiacich sekvencií. Takéto užitočné expresné riadiace sekvencie zahŕňajú expresné riadiace sekvencie spojené so štrukturálnymi génmi uvedených expresných vektorov, ako aj akúkoľvek sekvenciu, o ktorej je známe, že riadi expresiu génov prokaryotických alebo eukaryotických buniek alebo ich vírusov, a rôzne kombinácie uvedených sekvencií.

Príklady vhodných riadiacich sekvencií na riadenie transkripcie v cicavčích bunkách zahŕňajú skoré a neskoré promótory SV40 a adenovírusov, napr. adenovírusový 2. hlavný neskorý promótor, promótor MT-1 (metalotioneínového génu), okamžitý skorý promótor ľudského cytomegalovírusového génu (CMV), promótor ľudského elongačného faktora 1α (EF-1α), promótor minimálneho tepelného šokového *Drosophila* proteínu 70, promótor Rous sarkóma vírusu (RSV), promótor ľudského ubiquitínu C (UbC), terminátor ľudského rastového hormónu, polyadenylačné signály SV40 alebo adenovírusovej Elb oblasti a Kozakovu konsenzus sekvenciu (Kozak, M. J Mol Biol 1987 Aug 20; 196 (4): 947-50).

Na zlepšenie expresie v cicavčích bunkách je možné začleniť syntetický intrón do 5' netranslatovanej oblasti nukleotidovej sekvencie kódujúcej IFNG polypeptid. Príkladom syntetického intrónu je syntetický intrón z plazmidu pCI-Neo (dostupný od Promega Corporation, WI, USA).

Príklady vhodných riadiacich sekvencií na riadenie transkripcie v hmyzích bunkách zahŕňajú polyhedrínový promótor, P10 promótor, základný promótor polyhedrického vírusu *Autographa californica*, promótor bakulovírusového okamžitého skorého génu 1 a promótor bakulovírusového 39K posunutého skorého génu a SV40 polyadenylačnú sekvenciu.

Príklady vhodných riadiacich sekvencií na použitie v kvasinkových hostiteľských bunkách zahŕňajú promótory kvasinkového α-párovacieho systému, promótor kvasinkovej tiózofosfát izomerázy (TPI), promótory z kvasinkových glykolytických génov alebo alkohol dehydrogenázových génov, ADH2-4c promótor a inducibilný GAL promótor.

Príklady vhodných riadiacich sekvencií na použitie vo vláknitých hubových hostiteľských bunkách zahŕňajú ADH3 promótor a terminátor, promótor odvodený od génov kódujúcich *Aspergillus oryzae* TAKA amyláza triózofosfát izomerázu alebo alkalickú proteázu, *A. niger* α-amylázu, *A. niger* alebo *A. nidulans* glukoamylázu, *A. nidulans* acetamidázu, *Rhizomucor miehei* asparágovú proteínázu alebo lipázu, TPI1 terminátor a ADH3 terminátor.

Príklady vhodných riadiacich sekvencií na použitie v bakteriálnych hostiteľských bunkách zahŕňajú promótory *lac* systému, *trp* systému, *TAC* alebo *TRC* systému a hlavné promótorové oblasti lambda fága.

Nukleotidová sekvencia podľa vynálezu, či už pripravená miestne špecifickou mutagenézou, syntézou alebo inými metódami, môže alebo nemusí obsahovať aj nukleotidovú sekvenciu, ktorá kóduje signálny peptid. Signálny peptid je prítomný, keď sa má polypeptid vylučovať z buniek, v ktorých sa exprimuje. Takýto signálny peptid, ak je prítomný, by mal byť rozoznávaný bunkou zvolenou na expresiu polypeptidu. Signálny peptid môže byť homologický (napr. to môže byť peptid, ktorý je normálne spojený s huIFNG) alebo heterologický (tzn. pochádzajúci z iného zdroja ako huIFNG) s polypeptidom alebo môže byť homologický alebo heterologický s hostiteľskou bunkou, tzn. môže byť peptidom, ktorý sa normálne exprimuje v hostiteľskej bunke, alebo môže byť peptidom, ktorý sa normálne neexprimuje v hostiteľskej bunke. Z toho vyplýva, že signálny peptid môže byť prokaryotický, napr. odvodený od baktérie, ako napríklad *E. coli*, alebo eukaryotický, napr. odvodený od cicavčej alebo hmyzej alebo kvasinkovej bunky.

Prítomnosť alebo neprítomnosť signálneho peptidu bude závisieť napr. na expresii hostiteľskej bunky použitej na produkciu polypeptidu, na proteíne, ktorý sa má exprimovať (či je to vnútrobunkový alebo extracelulárny proteín) a na tom, či je želateľné získať sekréciu. Na použitie vo vláknitých hubách môže byť signálny peptid bežne odvodený od génu kódujúceho *Aspergillus sp.* amylázu alebo glukoamylázu, génu kódujúceho *Rhizomucor miehei* lipázu alebo proteázu alebo *Humicola lanuginosa* lipázu. Signálny peptid je výhodne odvodený od génu kódujúceho *A. oryzae* TAKA amylázu, *A. niger* neutrálnu α-amylázu, *A. niger* amylázu stabilnú v kyslom prostredí alebo *A. niger* glukoamylázu. Na použitie v hmyzích bunkách môže byť signálny peptid jednoducho odvodený od hmyzieho

génu (cf. WO 90/05783), ako napríklad génu prekurzora adipokinetického hormónu motýľa *Manduca sexta*, (cf. US 5,023,328), génu pre včelí melitín (Invitrogen), génu pre ekdysteroidnú UDP glukozyltransferázu (*egt*) (Murphy a ďalší, Protein Expression and Purification 4, 349-357 (1993)) alebo génu pre ľudskú pankreatickú lipázu (*hpl*) (Methods in Enzymology 284, str. 262-272, 1997).

Výhodným signálnym peptidom na použitie v cicavčích bunkách je signálny peptid huIFNG alebo signálny peptid hlodavčieho Ig kapa ľahkého reťazca (Coloma, M (1992) J. Imm. Methods 152: 89-104). Zistilo sa, že na použitie v kvasinkových bunkách sú vhodnými signálnymi peptidmi signálny peptid α-faktora zo *S. cereviciae* (cf. US 4870008), signálny peptid myšacej slinnej amylázy (cf. O. Hagenbuchle a ďalší, Nature 289,1981, str. 643-646), modifikovaný karboxy-peptidázový signálny peptid (cf. L. A. Valls a ďalší, Cell 48,1987, str. 887-897), kvasinkový *BAR1* signálny peptid (cf. WO 87/02670) a signálny peptid kvasinkovej asparágovej proteázy 3 (YAP3) (cf. M. Egel-Mitani a ďalší, Yeast 6,1990, str. 127-137).

Na produkciu IFNG polypeptidu môže byť použitý akýkoľvek vhodný hostiteľ, vrátane bakteriálnych, plesňových (vrátane kvasinkových), rastlinných, hmyzích, cicavčích alebo iných vhodných živočíšnych buniek alebo bunkových línií, ako aj transgénne živočíchy alebo rastliny. Príklady bakteriálnych hostiteľských buniek zahŕňajú grampozitívne baktérie, ako napríklad kmene *Bacillus*, napr. *B. brevis* alebo *B. subtilis*, *Pseudomonas* alebo *Streptomyces*, alebo gramnegatívne baktérie, ako napríklad kmene *E. coli*. Zavedenie vektora do bakteriálnej hostiteľskej bunky sa môže uskutočňovať napríklad transformáciou protoplastov (pozri napr. Chang a Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), použitím kompetentných buniek (pozri napr. Young a Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, alebo Dubnau a Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), elektroporáciou (pozri napr. Shigekawa a Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751) alebo konjugáciou (pozri napr. Koehler a Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5771-5278).

Príklady vhodných vláknitých plesňových hostiteľských buniek zahŕňajú kmene *Aspergillus*, napr. *A. oryzae*, *A. niger* alebo *A. nidulans*, *Fusarium* alebo *Trichoderma*. Plesňové bunky je možné transformovať spôsobom zahŕňajúcim

formovanie protoplastov, transformáciu protoplastov a regeneráciu bunkovej steny, ktorý je sám o sebe známy. Vhodné postupy na transformáciu *Aspergillus* hostiteľských buniek sú opísané v EP 238023 a US 5679543. Vhodné postupy na transformovanie druhov *Fusarium* sú opísané v Malardier a ďalší, 1989, Gene 78: 147-156 a WO 96/00787. Kvasinky je možné transformovať použitím postupov opísaných v Becker a Guarente, v Abelson, J. N. a Simon, M. I., vyd, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, zv. 194, str. 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito a ďalší, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; a Hinnen a ďalší, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Príklady vhodných kvasinkových hostiteľských buniek zahŕňajú kmene *Saccharomyces*, napr. *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Klyveromyces*, *Pichia*, ako napríklad *P. pastoris* alebo *P. methanolica*, *Hansenula*, ako napríklad *H. polymorpha* alebo *Yarrowia*. Spôsoby na transformovanie kvasinkových buniek s heterológnou DNA a na produkciu heterológnych polypeptidov týmito bunkami sú opísané v Clontech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA, USA (v produktovom protokole pre Yeastmaker™ Yeast Tranformation System Kit) a v Reeves a ďalší, FEMS Microbiology Letters 99 (1992) 193-198, Manivasakam a Schiestl, Nucleic Acids Research, 1993, zv. 21, č. 18, str. 4414-4415 a Ganeva a ďalší, FEMS Microbiology Letters 121 (1994) 159-164.

Príklady vhodných hmyzích hostiteľských buniek zahŕňajú *Lepidoptera* bunkovú líniu, ako napríklad *Spodoptera frugiperda* (Sf9 alebo Sf21) alebo *Trichoplusioa ni* bunky (High Five) (US 5077214). Transformácia hmyzích buniek a produkcia heterológnych polypeptidov týmito bunkami sa môže uskutočňovať ako je opísané v Invitrogen.

Príklady vhodných cicavčích hostiteľských buniek zahŕňajú vaječníkové bunkové línie čínskeho škrečka (CHO) (napr. CHO-K1; ATCC CCL-61), mačiakové bunkové línie (COS) (napr. COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); myšacie bunky (napr. NS/O), obličkové bunkové línie z mladých škrečkov (napr. ATCC CRL-1632 alebo ATCC CCL-10) a ľudské bunky (napr. HEK 293 (ATCC CRL-1573)), ako aj rastlinné bunky v tkanivovej kultúre. Ďalšie vhodné bunkové línie sú známe v oblasti a dostupné z verejných zbierok, ako napríklad American

Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Cicavčie bunky, ako napríklad CHO bunky, môžu byť aj modifikované, aby exprimovali sialyltransferázu, napr. 1,6-sialyl-transferázu, ako je opísané napr. v US 5047335, aby sa poskytla zlepšená glykozylácia IFNG polypeptidu.

Spôsoby zavádzania exogénnej DNA do cicavčích hostiteľských buniek zahŕňajú transfekciu sprostredkovanú fosforečnanom vápenatým, elektroporáciu, DEAE-dextránom sprostredkovanú transfekciu, lipozómom sprostredkovanú transfekciu, vírusové vektory a transfekčné spôsoby opísané v Life Technologies Ltd, Paisley, UK použitím Lipofectamin 2000. Tieto spôsoby sú v oblasti dobre známe a opísané napr. v Ausbel a ďalší (vyd.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA. Kultivácia cicavčích buniek sa uskutočňuje podľa zavedených metód, ako je opísané napr. v Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, vyd. Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc, Totowa, New Jersey, USA a Harrison MA a Rae IF, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997.

Na produkciu glykozylovaného polypeptidu sa výhodne používa eukaryotická bunka, napr. eukaryotická bunka vyššie uvedeného typu.

V spôsoboch produkcie podľa predloženého vynálezu sa bunky kultivujú v nutričnom médiu vhodnom na produkciu polypeptidu použitím metód známych v oblasti. Bunky je možné napríklad kultivovať pretrepávacou fľašovou kultiváciou, fermentáciou v malom alebo vo veľkom meradle (vrátane kontinuálnej, dávkovej, napĺňacej dávkovej fermentácie alebo fermentácie v tuhom stave), v laboratórnych alebo priemyselných fermentoroch, ktoré sa uskutočňujú vo vhodnom médiu a v podmienkach umožňujúcich, aby sa exprimoval a/alebo izoloval polypeptid. Kultivácia sa uskutočňuje vo vhodnom nutričnom médiu obsahujúcom zdroj uhlíka a dusíka a anorganické soli, použitím postupov známych v oblasti. Vhodné médiá sú dostupné od komerčných dodávateľov alebo sa môžu pripraviť podľa publikovaných zložení (napr. v katalógoch American Type Culture Collection). Ak sa polypeptid vylučuje do nutričného média, je ho možné priamo izolovať z média. Ak sa polypeptid nevylučuje, môže byť izolovaný z bunkových lyzátov.

Výsledný polypeptid môže byť izolovaný spôsobmi známymi v oblasti. Polypeptid sa môže z nutričného média izolovať napríklad jednoduchými spôsobmi,

ktoré zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na centrifugáciu, filtráciu, extrakciu, sprejové sušenie, odparovanie alebo precipitáciu.

Polypeptidy sa môžu purifikovať rôznymi postupmi známymi v oblasti, ktoré zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na chromatografiu (napr. iónová výmenná, afinitná, hydrofóbna chromatografia, chromatofokusing a veľkostné vylučovanie), elektroforetické postupy (napr. preparatívna izoelektrická fokusácia), diferenciáciu rozpustnosti (napr. precipitácia so síranom amónnym), SDS-PAGE alebo extrakciu (pozri napr. Protein Purification, J.-C. Janson a Lars Ryden, vyd., VCH Publishers, New York, 1989). Konkrétne spôsoby purifikácie polypeptidov vykazujúcich IFNG aktivitu sú opísané v EP 110044 a v nepreskúmanej japonskej prihláške vynálezu č. 186995/84.

Biologická aktivita IFNG polypeptidu môže byť testovaná akýmkoľvek vhodným spôsobom známym v oblasti. Takéto testy zahŕňajú protilátkovú neutralizáciu protivírusovej aktivity, indukciu aktivity proteín kinázy, oligoadenylát 2,5-A syntetázy alebo fosfodiesterázy, ako je opísané v EP 41313 B1. Takéto testy zahŕňajú aj imunomodulačné testy (pozri napr. US 4753795), rastové inhibičné testy a meranie viazania sa na bunky, ktoré exprimujú interferónové receptory. Špecifické testy sú opísané v nižšie uvedenej časti Materiály a metódy.

Okrem toho sa vynález týka zlepšených spôsobov na liečbu, najmä intersticiálnych pľúcnych chorôb, ale aj granulomatóznych chorôb, rakoviny, infekcií, kostných porúch (napr. porúch metabolizmu v kostiach, ako napríklad malígnej osteopetrózy) a autoimunitných ochorení, ako napríklad reumatoidnej artritídy, pričom kľúčovými výhodami sú menej časté a/alebo menej rušivé podávanie účinnejšej terapie, a voliteľne nižšie riziko imunitných reakcií s terapeuticky aktívnou zlúčeninou (zlúčeninami).

Konjugát podľa vynálezu je výhodne podávaný v prostriedku obsahujúcom farmaceuticky prijateľný nosič alebo excipient. "Farmaceuticky prijateľný" znamená nosič alebo excipient, ktorý nespôsobuje žiadne nežiadúce účinky pacientom, ktorým sa podáva. Takéto farmaceuticky prijateľné nosiče a excipienty sú dobre známe v oblasti (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. vydanie, A. R. Gennaro, vyd. Mack Publishing Company [1990]: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer a L. Hovgaard, vyd., Taylor &

Francis [200]; a Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3. vydanie, A. Kibbe, vyd. Pharmaceutical Press [2000]).

Konjugát podľa vynálezu sa môže používať "ako taký" a/alebo vo forme soli. Vhodné soli zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na soli s alkalickými kovmi alebo kovmi alkalických zemín, ako napríklad sodné, draselné, vápenaté a horečnaté, ako aj napr. zinočnaté soli. Tieto soli alebo komplexy môžu mať kryštalickú a/alebo amorfnú štruktúru.

Konjugát podľa vynálezu sa podáva v dávke, ktorá je približne paralelná s dávkou používanou na terapiu so známymi komerčnými IFNG prípravkami, ako napríklad Actimmunom, alebo s dávkami špecifikovanými v EP 795332. Presná dávka, ktorá sa má podať, závisí na okolnostiach. Normálne má byť dávka schopná predchádzať alebo zmenšovať závažnosť alebo rozšírenie stavu alebo indikácie, ktorá sa má liečiť. Pre priemerných odborníkov v oblasti bude zrejmé, že účinné množstvo konjugátu alebo prostriedku podľa vynálezu závisí, *inter alia*, na ochorení, dávke, režime podávania, na tom či sa polypeptid alebo konjugát alebo prostriedok podáva samostatne alebo spolu s inými terapeutickými činidlami, na sérovom polčase rozpadu prostriedkov a na všeobecnom zdravotnom stave pacienta.

Vynález sa týka aj použitia a) konjugátu obsahujúceho aspoň jednu nepolypeptidovú časť kovalentne spojenú s IFNG polypeptidom, pričom IFNG polypeptid je vybraný zo skupiny obsahujúcej huIFNG, rhuIFNG alebo tu opísaný IFNG polypeptid (tzn. konjugátom je konjugát podľa vynálezu), alebo b) farmaceutického prostriedku podľa vynálezu na výrobu liečiva, farmaceutického prostriedku alebo „kit-of-parts" na liečbu intersticiálnych pľúcnych ochorení, rakoviny, infekcií, kostných porúch (napr. poruchy metabolizmu kostí, ako napríklad malígnej osteopetrózy) a/alebo zápalových ochorení, najmä intersticiálnych pľúcnych ochorení, najmä idiopatickej pľúcnej fibrózy. Zahrnutý môže byť aj glukokortikoid, ako napríklad prednizolón. Výhodné dávkovanie je 1 až 4, výhodnejšie 2 až 3 μg polypeptidovej zložky na kg hmotnosti pacienta na dávku. Výhodné dávkovanie je 100 až 350, výhodnejšie 100 až 150 μg glukokortikoidu na kg hmotnosti pacienta na dávku.

Opísané sú aj zlepšené prostriedky na dodávanie molekúl alebo prípravkov, voliteľne obsahujúce aj glukokortikoidy.

Vynález sa týka aj kitu vhodného na liečbu intersticiálnych pľúcnych ochorení obsahujúceho prvý farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje aktívne zložky a) alebo b) uvedené vyššie, a druhý farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje aspoň jeden glukokortikoid, pričom každý je voliteľne spolu s farmaceuticky prijateľným nosičom a/alebo excipientom.

Konjugát podľa vynálezu je možné formulovať do farmaceutických prostriedkov dobre známymi spôsobmi. Vhodné formulácie sú opísané v Remington' Pharmaceutical Sciences E.W. Martinom a v US 5183746.

Farmaceutický prostriedok môže byť formulovaný v rôznych formách, vrátane kvapalnej, gélovej, lyofilizovanej formy, vo forme stlačenej tuhej látky alebo v akejkoľvek inej forme. Výhodná forma bude závisieť na konkrétnej indikácii, ktorá sa má liečiť, a bude pre priemerného odborníka v oblasti zrejmá.

Farmaceutický prostriedok sa môže podávať orálne, subkutánne, intravenózne, intracerebrálne, intranazálne, transdermálne, intraperitoneálne, intramuskulárne, intrapulmonárne, vaginálne rektálne, intraokulárne alebo akýmkoľvek iným prijateľným spôsobom, napr. použitím PowderJect alebo ProLease technológie. Formulácie sa môžu podávať kontinuálne infúziou, hoci prijateľná je aj bolusová injekcia, použitím techník, ktoré sú v oblasti dobre známe, napríklad použitím púmp alebo implantátu. V niektorých prípadoch sa môžu formulácie priamo aplikovať vo forme roztoku alebo spreja. Výhodný spôsob podávania bude závisieť na konkrétnej indikácii, ktorá sa má liečiť, a bude pre priemerného odborníka v danej oblasti techniky zrejmý.

Farmaceutický prostriedok podľa vynálezu sa môže podávať spolu s inými terapeutickými činidlami. Tieto činidlá môžu byť inkorporované ako časť rovnakého farmaceutického prostriedku, alebo sa môžu podávať oddelene od polypeptidu alebo konjugátu podľa vynálezu, buď zároveň alebo v súlade s akýmkoľvek prijateľným režimom liečby. Okrem toho sa polypeptid, konjugát alebo farmaceutický prostriedok podľa vynálezu môže použiť ako doplnok k iným terapiám. Do úvahy pripadajú najmä kombinácie s glukokortikoidmi, ako sú opísané v EP 795332.

Parenterálne prostriedky

Príkladom farmaceutického prostriedku je roztok upravený na parenterálne podávanie. Hoci sú v mnohých prípadoch farmaceutické roztokové formulácie poskytnuté v kvapalnej forme, vhodnej na okamžité použitie, môžu byť takéto parenterálne formulácie poskytnuté aj v zmrazenej alebo lyofilizovanej forme. V prípade zmrazenej formy musí byť pred použitím prostriedok rozmrazený. Lyofilizovaná forma sa často používa na posilnenie stability účinnej zlúčeniny obsiahnutej v prostriedku v širokom rozsahu skladovacích podmienok. Ako je zrejmé pre priemerného odborníka v oblasti, lyofilizované prípravky sú vo všeobecnosti stabilnejšie ako ich kvapalné náprotivky. Takéto lyofilizované prípravky sa rekonštituujú pred použitím pridaním jedného alebo viacerých vhodných farmaceuticky prijateľných riedidiel, ako napríklad sterilnej vody pre injekcie alebo sterilného fyziologického roztoku.

V prípade parenterálnych prostriedkov sa tieto pripravujú na uskladnenie ako lyofilizované formulácie alebo vodné roztoky miešaním, podľa toho ako je to vhodné, polypeptidu majúceho požadovaný stupeň čistoty s jedným alebo viacerými farmaceuticky prijateľnými nosičmi, excipientami alebo stabilizátormi, ktoré sa typicky využívajú v oblasti (všetky sú označované ako "excipienty"), napríklad tlmivými činidlami, stabilizačnými činidlami, konzervačnými látkami, izotonifikačnými látkami, neiónovými detergentami, antioxidantami a/alebo inými rôznymi aditívami.

Tlmivé činidlá pomáhajú udržiavať pH v rozsahu, ktorý sa približuje fyziologickým podmienkam. Typicky sú prítomné v koncentrácii v rozsahu od približne 2 mM do približne 50 mM. Vhodné tlmivé činidlá na použitie s predloženým vynálezom zahŕňajú tak organické, ako aj anorganické kyseliny a ich soli, ako napríklad citrátové tlmivé roztoky (napr. zmes citrátu monosodného a citrátu disodného, zmes kyseliny citrónovej a citrátu trisodného, zmes kyseliny citrónovej a citrátu monosodného, atď.), jantaranové tlmivé roztoky (napr. zmes kyseliny jantárovej a jantaranu monosodného, zmes kyseliny jantárovej a hydroxidu sodného, zmes kyseliny jantárovej a jantaranu disodného, atď.), vínanové tlmivé roztoky (napr. zmes kyseliny vínnej a vínanu sodného, zmes kyseliny vínnej a vínanu draselného, zmes kyseliny vínnej a hydroxidu sodného, atď.), fumarátové tlmivé roztoky (napr. zmes kyseliny fumarovej a fumarátu monosodného, zmes

kyseliny fumarovej a fumarátu disodného, zmes fumarátu monosodného a fumarátu disodného, atď.), glukonátové tlmivé roztoky (napr. zmes kyseliny glukónovej a glykonátu sodného, zmes kyseliny glukónovej a hydroxidu sodného, zmes kyseliny glukónovej a glykonátu draselného, atď.), oxalátové tlmivé roztoky (napr. zmes kyseliny oxálovej a oxalátu sodného, zmes kyseliny oxálovej a hydroxidu sodného, zmes kyseliny oxálovej a oxalátu draselného, atď.), mliečnanové tlmivé roztoky (napr. zmes kyseliny mliečnej a mliečnanu sodného, zmes kyseliny mliečnej a hydroxidu sodného, zmes kyseliny mliečnej a mliečnanu draselného, atď.) a acetátové tlmivé roztoky (napr. zmes kyseliny octovej a octanu sodného, zmes kyseliny octovej a hydroxidu sodného, atď.). Ďalšími možnosťami sú fosfátové tlmivé roztoky, histidínové tlmivé roztoky a trimetylamínové soli, ako napríklad Tris.

Konzervačné látky sa pridávajú na zastavenie mikrobiálneho rastu a typicky sa pridávajú v množstvách približne 0,2 % až 1 % (hmotnosť/objem). Vhodné konzervačné látky na použitie v predloženom vynáleze zahŕňajú fenol, benzylalkohol, *meta*-krezol, metylparabén, propylparabén, oktadecyldimetylbenzyl, chlorid amónny, benzalkóniové halogenidy (napr. benzalkóniumchlorid, -bromid alebo jodid), hexametóniumchlorid, alkylparabény, ako napríklad metyl- alebo propylparabén, katechol, rezorcinol, cyklohexanol a 3-pentanol.

Izotonifikačné látky sa pridávajú na zaistenie izotonicity kvapalných prostriedkov a zahŕňajú polyhydrické sacharidové alkoholy, výhodné trihydrické a vyššie sacharidové alkoholy, ako napríklad glycerín, erytritol, arabitol, xylitol, sorbitol a manitol. Polyhydrické alkoholy môžu byť prítomné v množstve medzi 0,1 % a 25 % hmotn., typicky 1 % až 5 % hmotn., berúc do úvahy relatívne množstvá iných zložiek.

Stabilizátory označujú širokú kategóriu excipientov, ktorých funkcia môže byť rôzna, od zväčšovania objemu po aditívum, ktoré solubilizuje terapeutické činidlo alebo pomáha zabraňovať denaturácii alebo adherovaniu na steny nádoby. Typickými stabilizátormi môžu byť polyhydrické sacharidové alkoholy (vymenované vyššie); aminokyseliny, ako napríklad arginín, lyzín, glycín, glutamín, asparagín, histidín, alanín, ornitín, L-leucín, 2-fenylalanín, kyselina glutámová, treonín, atď.; organické sacharidy alebo sacharidové alkoholy, ako napríklad laktóza, trehalóza, stachyóza, manitol, sorbitol, xylitol, ribitol, myoinizitol, galaktitol, glycerol a podobne,

vrátane cyklitolov, ako napríklad inozitolu; polyetylénglykol; aminokyselinové polyméry; redukčné činidlá obsahujúce síru, ako napríklad močovina, glutatión, kyselina tiooktová, tioglykolát sodný, tioglycerol, α-monotioglycerol a tiosulfát sodný; polypeptidy s nízkou molekulovou hmotnosťou (tzn. < 10 zvyškov); proteíny, ako napríklad ľudský sérový albumín, hovädzí sérový albumín, želatína alebo imunoglobulíny; hydrofilné polyméry, ako napríklad polyvinylpyrolidón; monosacharidy, ako napríklad xylóza, manóza, fruktóza a glukóza; disacharidy, ako napríklad laktóza, maltóza a sacharóza; trisacharidy, ako napríklad rafinóza, a polysacharidy, ako napríklad dextrán. Stabilizátory sú typicky prítomné v rozsahu od 0,1 do 10000 hmotn. častí, vztiahnuté k hmotnosti účinného proteínu.

Neiónové povrchovo aktívne látky alebo detergenty (známe aj ako "zmáčacie činidlá") môžu byť prítomné na napomáhanie solubilizácie terapeutického činidla, ako aj na ochranu terapeutického polypeptidu pre agregáciou indukovanou pretrepávaním, čo tiež umožňuje, aby bola formulácia vystavená šmykovému povrchovému tlaku bez spôsobenia denaturácie polypeptidu. Vhodné neiónové povrchovo aktívne látky zahŕňajú polysorbáty (20, 80, atď.), polyoxaméry (184, 188, atď.), Pluronic® polyoly, monoestery polyoxyetylén sorbitanu (Tween®-20, Tween®-80, atď.).

Ďalšie rôzne excipienty zahŕňajú činidlá zväčšujúce objem alebo plnivá (napr. škrob), chelatačné činidlá (napr. EDTA), antioxidanty (napr. kyselinu askorbovú, metionín, vitamín E) a korozpúšťadlá. Účinná zložka môže byť zachytená aj v mikrokapsulách, ktoré sa pripravujú napríklad koascervačnými technikami alebo medzifázovou polymerizáciou napríklad hydroxymetylcelulózy, želatíny alebo poly-(metylmetacylátových) mikrokapsúl, v koloidálnych liekových dodávacích systémoch (napríklad v lipozómoch, albumínových mikrosférach, mikroemulziách, nanočasticiach a nanokapsulách) alebo v makroemulziách. Takéto techniky sú opísané v Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

Parenterálne formulácie, ktoré sa majú použiť na *in vivo* podávanie, musia byť sterilné. To je možné jednoducho dosiahnuť napríklad filtráciou cez sterilné filtračné membrány.

Prípravky s nepretržitým uvoľňovaním

Vhodné príklady prípravkov s nepretržitým uvoľňovaním zahŕňajú semi-permeabilné matrice tuhých hydrofóbnych polymérov obsahujúce polypeptid alebo konjugát, ktoré majú vhodnú formu, sú napríklad vo forme filmu alebo mikrokapsúl. Príklady matríc s nepretržitým uvoľňovaním zahŕňajú polyestery, hydrogély (napríklad poly(2-hydroxyetyl-metakrylát) alebo poly(vinylalkohol)), polylaktidy, kopolyméry kyseliny L-glutámovej a etyl-L-glutamátu, nedegradovateľný etylén-vinylacetát, degradovateľné kopolyméry kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej, ako napríklad ProLease® technológia alebo Lupron Depot® (injektovateľné mikrosféry zložené z kopolyméru kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej a leuprolidového acetátu) a kyselinu poly-D-(-)-3-hydroxybutyrovú. Zatiaľ čo polyméry, ako etylén-vinyl acetát a kopolymér kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej, umožňujú vylučovanie molekúl v priebehu dlhej časovej periódy, ako napríklad do 100 dní alebo viac ako 100 dní, určité hydrogély vylučujú proteíny v priebehu kratších časových periód. Keď enkapsulované polypeptidy ostávajú v tele dlhý čas, môžu v dôsledku ich vystavenia vlhkosti pri 37 °C denaturovať alebo agregovať, čo vedie k strate biologickej aktivity a možným zmenám imunogénnosti. V závislosti na použitom mechanizme je možné navrhnúť racionalizačné stratégie na stabilizáciu. Napríklad, ak sa zistí, že agregačným mechanizmom je vytváranie medzi-molekulových S-S väzieb prostredníctvom tiodisulfidovej výmeny, je možné dosiahnuť stabilizáciou prostredníctvom modifikácie sulfhydrylových zvyškov, lyofilizáciou z kyslých roztokov, kontrolou obsahu vlhkosti, použitím príslušných aditív a vývojom špecifických polymérových matricových zložení.

Orálne podávanie

Na orálne podávanie môže byť farmaceutický prostriedok v tuhej alebo kvapalnej forme, napr. vo forme kapsuly, tabletky, suspenzie, emulzie alebo roztoku. Farmaceutický prostriedok sa výhodne vyrába vo forme dávkovej jednotky obsahujúcej dané množstvo účinnej zložky. Vhodná denná dávka pre človeka alebo iného cicavca sa môže meniť v širokom rozsahu v závislosti na stave pacienta a iných faktoroch, ale priemerní odborníci v oblasti sú schopní ju stanoviť použitím rutinných spôsobov.

Tuhé dávkové formy na orálne podávanie môžu zahŕňať kapsuly, tabletky, čípky, prášky a granuly. V takýchto tuhých dávkových formách môže byť aktívna zlúčenina zmiešaná s aspoň jedným inertným riedidlom, ako napríklad sacharózou, laktózou alebo škrobom. Takéto dávkové formy môžu tiež obsahovať, čo je aj normálnou praxou, ďalšie látky, napr. mazacie činidlá, ako napríklad stearan horečnatý. V prípade kapsúl, tabletiek a piluliek môžu dávkové formy obsahovať aj tlmivé činidlá. Tabletky a pilulky môžu byť okrem toho pripravené s enterickými poťahmi.

Konjugáty môžu byť zmiešané s adjuvans, ako napríklad laktózou, sacharózou, škrobovým práškom, celulózovými estermi alkánových kyselín, kyselinou steárovou, mastencom, stearanom horečnatým, oxidom horečnatým, sodnými a vápenatými soľami kyseliny fosforečnej a kyseliny sírovej, akáciou, želatínou, alginátom sodným, polyvinylpyrolidínom a/alebo polyvinylalkoholom, a tabletované alebo enkapsulované na bežné podávanie. Alternatívne môžu byť rozpustené vo fyziologickom roztoku, vode, polyetylénglykole, propylénglykole, etanole, olejoch (ako napríklad pšeničnom oleji, arašidovom oleji, oleji so semien bavlny alebo v sézamovom oleji), tragakantovej gume a/alebo v rôznych tlmivých roztokoch. Vo farmaceutickej oblasti sú dobre známe aj iné adjuvans a spôsoby podávania. Nosič alebo riedidlo môže obsahovať opozďovací materiál, ako napríklad glycerylmonostearan alebo glyceryldistearan, samostatne, alebo s voskom, alebo inými materiálmi, ktoré sú v oblasti dobre známe.

Farmaceutické prostriedky sa môžu podrobiť bežným farmaceutickým operáciám, ako napríklad sterilizácii a/alebo môžu obsahovať bežné adjuvans, ako napríklad konzervačné látky, stabilizátory, zmáčacie činidlá, emulzifikátory, tlmivé roztoky, plnivá, atď., ako je opísané napr. v tejto prihláške.

Kvapalné dávkové formy na orálne podávanie môžu zahŕňať farmaceuticky prijateľné emulzie, roztoky, suspenzie, sirupy a elixíry obsahujúce inertné riedidlá, ktoré sa bežne používajú v oblasti, ako napríklad vodu. Takéto prostriedky môžu obsahovať aj adjuvans, ako napríklad zmáčacie činidlá, sladidlá, dochucovacie činidlá a parfumovacie činidlá.

Topické podávanie

Formulácie vhodné na topické podávanie zahŕňajú kvapalné alebo polokvapalné prípravky vhodné na penetráciu cez kožu (napr. tekuto masti, pleťové vody, masti, krémy alebo pasty) a kvapky vhodné na podávanie do oka, ucha alebo nosa.

Pľúcne dodávanie

Formulácie vhodné na použitie s rozprašovačom, buď tryskovým alebo ultrasonickým, budú typicky obsahovať polypeptid alebo konjugát rozpustený vo vode v koncentrácii napr. približne 0,01 až 25 mg konjugátu na ml roztoku, výhodne približne 0,1 až 10 mg/ml. Formulácia môže obsahovať aj tlmivý roztok a jednoduchý sacharid (napr. na stabilizáciu proteínu a reguláciu osmotického tlaku) a/alebo ľudský sérový albumín s koncentráciou v rozsahu 0,1 až 10 mg/ml. Príkladmi tlmivých roztokov, ktoré môžu byť použité sú, octan sodný, citrát a glycín. Výhodne bude mať tlmivý roztok zloženie a molaritu vhodnú na nastavenie roztoku na pH v rozsahu 3 až 9. Vo všeobecnosti sú na tento účel vhodné molarity tlmivých roztokov od 1 mM do 50 mM. Príkladmi sacharidov, ktoré je možné využiť, sú laktóza, maltóza, manitol, sorbitol, trehalóza a xylóza, zvyčajne v množstvách v rozsahu od 1 % do 10 % hmotn. formulácie.

Rozprašovačová formulácia môže obsahovať aj povrchovo aktívnu látku na redukciu alebo zabránenie povrchovo indukovanej agregácii proteínu spôsobenej atomizáciou roztoku pri vytváraní aerosólu. Využité môžu byť rôzne bežné povrchovo aktívne látky, ako napríklad estery a alkoholy polyoxyetylénovej mastnej kyseliny a estery polyoxyetylénsorbitanovej mastnej kyseliny. Množstvá budú vo všeobecnosti v rozsahu 0,001 % až 4 % hmotn. formulácie. Výnimočne výhodnou povrchovo aktívnou látkou na účely tohto vynálezu je monooleát polyoxyetylénsorbitanu.

Konkrétne formulácie a spôsoby generovania vhodných disperzií kvapalných častíc podľa vynálezu sú opísané vo WO 9420069, US 5915378, US 5960792, US 5957124, US 5934272, US 5915378, US 5855564, US 5826570 a US 5522385, ktoré sú tu zahrnuté ich citáciou.

Formulácie na použitie v inhalačnom zariadení s odmerným dávkovaním budú vo všeobecnosti obsahovať jemne rozdrvený prášok. Tento prášok je možné vyrábať lyofilizáciou a následným mletím kvapalnej konjugátovej formulácie a môže obsahovať aj stabilizátor, ako napríklad ľudský sérový albumín (HSA). Typicky sa pridáva viac ako 0,5 % (hmotn.) HSA. Okrem toho, ak je to nevyhnuté, môžu sa k prípravku pridávať sacharidy alebo sacharidové alkoholy. Príklady zahŕňajú laktózu, maltózu, manitol, sorbitol, sorbitózu, trehalózu, xylitol a xylózu. Množstvo pridávané do formulácie môže byť v rozsahu od približne 0,01 do 200 % (hmotn.), výhodne je prítomných od približne 1 % do 50 % konjugátu. Takéto formulácie sa potom lyofilizujú a melú na požadovanú veľkosť častíc.

Častice so správnou veľkosťou sa potom suspendujú v hnacom plyne pomocou povrchovo aktívnej látky. Hnacím plynom môže byť akýkoľvek bežný materiál používaný na tento účel, ako napríklad chlórfluóruhľovodík, fluóruhľovodík alebo uhľovodík, vrátane trichlórfluórmetánu, dichlórdifluórmetánu, dichlórtetrafluóretanolu a 1,1,1,2-tetrafluóretánu alebo ich kombinácií. Vhodné povrchovo aktívne látky zahŕňajú trioleát sorbitanu a sójový lecitín. Ako povrchovo aktívna látka môže byť užitočná aj kyselina olejová. Táto zmes sa potom naplní do dodávacieho zariadenia. Príkladom komerčne dostupného inhalátora s odmerným dávkovaním vhodného na použitie podľa predloženého vynálezu je Ventolin inhalátor s odmerným dávkovaním vyrábaný firmou Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.

Formulácie pre práškové inhalátory budú obsahovať jemne rozdrvený suchý prášok obsahujúci konjugát a môžu obsahovať aj činidlo zväčšujúce objem, ako napríklad laktózu, sorbitol, sacharózu alebo manitol, v množstvách, ktoré uľahčujú dispergovanie prášku zo zariadenia, napr. 50 % až 90 % hmotn. formulácie. Častice prášku by mali mať v pľúcach aerodynamické vlastnosti zodpovedajúce časticiam s hustotou približne 1 g/cm^2, so stredným priemerom menším ako 10 μm, výhodne medzi 0,5 a 5 μm, najvýhodnejšie medzi 1,5 a 3,5 μm. Príkladom práškového inhalátora vhodného na použitie v súlade s tu uvedeným opisom je Spinhaler práškový inhalátor vyrábaný firmou Fisons Corp., Bedford, Mass.

Prášky pre tieto zariadenia môžu byť generované a/alebo dodávané spôsobmi opísanými v US 5997848, US 5993783, US 5985248, US 5976574, US 5922354, US 5785049 a US 55654007.

Mechanické zariadenia skonštruované na dodávanie terapeutických produktov do pľúc zahŕňajú, ale bez obmedzenia, rozprašovače, inhalátory s odmerným dávkovaním a práškové inhalátory, ktoré sú všetky pre priemerného odborníka v oblasti dobre známe. Konkrétnymi príkladmi komerčne dostupných zariadení vhodných na uskutočňovanie tohto vynálezu sú Ultravent rozprašovač vyrábaný firmou Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; Acorn II rozprašovač vyrábaný firmou Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; Ventolin inhalátor s odmerným dávkovaním vyrábaný firmou Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; Spinhaler práškový inhalátor vyrábaný firmou Fisons Corp., Bedford, Massachusetts; "standing cloud" zariadenie od Inhale Therapeutic Systems, Inc., San Carlos, California; AIR inhalátor vyrábaný firmou Alkermes, Cambridge, Massachusetts a AERx systém na dodávanie liečiva do pľúc vyrábaný firmou Aradigm Corporation, Hayward, California.

Vynález poskytuje prostriedky a spôsoby na liečbu bakteriálnych a vírusových infekcií, rakoviny alebo nádorov, intersticiálnych pľúcnych ochorení, ako napríklad idiopatickej pľúcnej fibrózy, granulomatóznych ochorení, kostných porúch (napr. poruchy metabolizmu kostí, ako napríklad malígnej osteopetrózy) a auto-imunitných ochorení, ako napríklad reumatoidnej artritídy.

Ďalší predmet vynálezu sa týka spôsobu liečby cicavca majúceho cirkulujúce protilátky proti huIFNG alebo rhuIFNG, ktorý zahŕňa podávanie zlúčeniny majúcej biologickú aktivitu IFNG, ktorá nereaguje s uvedenými protilátkami. Zlúčeninou je výhodne tu opísaný konjugát a cicavcom je výhodne človek. Cicavce, ktoré sa majú liečiť, môžu trpieť ktoroukoľvek z vyššie uvedených chorôb, na ktorých liečbu je užitočný IFNG. Okrem toho sa vynález týka spôsobu výroby farmaceutického prostriedku na použitie na liečbu cicavcov majúcich cirkulujúce protilátky proti huIFNG alebo rhuIFNG, pričom zlúčenina majúca biologickú aktivitu IFNG, ktorá nereaguje s týmito protilátkami, je formulovaná do injektovateľnej alebo iným spôsobom vhodnej formulácie. Výraz "cirkulujúce protilátky" je mienený ako označenie autoprotilátok vytvorených v cicavcovi ako odpoveď na to, že bol ošetrený komerčne dostupnými IFNG prípravkami.

Vynález zahŕňa aj použitie nukleotidovej sekvencie kódujúcej IFNG polypeptid podľa vynálezu na génové terapeutické aplikácie. Zaujímavé môže byť

najmä použitie nukleotidovej sekvencie kódujúcej IFNG polypeptid opísaný vo vyššie uvedenej časti s názvom "Glykozylované polypeptidy podľa vynálezu modifikované tak, aby sa začlenili ďalšie glykozylačné miesta". Glykozylácia polypeptidu sa tak musí dosiahnuť v priebehu génovej terapie, tzn. po expresii nukleotidovej sekvencie v ľudskom tele.

Do úvahy prichádzajú tie aplikácie génovej terapie, ktoré zahŕňajú liečbu tých ochorení, pri ktorých sa očakáva, že polypeptid poskytne účinnú terapiu.

Lokálne dodanie IFNG použitím génovej terapie môže poskytnúť terapeutické činidlo v cieľovej oblasti, a tým vylúčiť potenciálne problémy s toxicitou spojené s nešpecifickým podávaním.

Zahrnuté sú metodológie tak *in vitro*, ako aj *in vivo* génovej terapie.

Známych je niekoľko metód na prenos potenciálnych terapeutických génov do definovaných bunkových populácií. Podrobnejšie informácie pozri napr. v Mulligan, "The Basic Science Of Gene Therapy", Science, 260, str. 926-31 (1993). Tieto metódy zahŕňajú:

Priamy génový prenos, ako je napr. opísané v Wolff a ďalší, "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle In vivo", Science 247, str. 1465-68 (1990);

Lipozómom sprostredkovaný prenos DNA, ako je opísané napr. v Caplen a ďalší, "Liposomemediated CFTR Gene Transfer to the Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis" Nature Med., 3, str. 39-46 (1995); Crystal, "The Gene As A Drug", Nature Med., 1, str.-15-17 (1995); Gao a Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection of Mammalian Cells", Biochem. Biophys Res. Comm., 179, str. 280-85 (1991);

Retrovírusom sprostredkovaný prenos DNA, ako je opísané napr. v Kay a ďalší, "In vivo Gene Therapy of Hemophilia B: Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs", Science, 262, str. 117-19 (1993); Anderson, "Human Gene Therapy", Science, 256, str. 808-13 (1992);

DNA vírusom sprostredkovaný prenos DNA. Takéto DNA vírusy zahŕňajú adenovírusy (výhodne vektory založené na Ad-2 alebo Ad-5), herpes vírusy (výhodne vektory založené na víruse herpes simplex) a parvovírusy (výhodne vektory založené na "defektných" alebo neautonómnych parvovírusoch, výhodnejšie vektory založené na adeno-asociovaných vírusoch, najvýhodnejšie vektory

založené na AAV-2). Pozri napr. Ali a ďalší, "The Use Of DNA Viruses as Vectors for Gene Therapy", Gene Therapy, 1, str. 367-84 (1994); US 4797368 a US 5139941.

Vynález bude podrobnejšie opísaný v nasledujúcich príkladoch. Príklady nemajú byť nijakým spôsobom ponímané ako obmedzujúce všeobecnosť predloženého opisu a nárokov.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Materiály a metódy

Testy

Prehľad interferónových testov

Už bolo zverejnené, že IFNG interaguje a aktivuje IFNG receptory na HeLa bunkách. V dôsledku toho sa aktivuje transkripcia v promótoroch obsahujúcich interferónom stimulovaný responzívny element (ISRE). Takže je možné robiť skríning na agonistov interferónových receptorov použitím luciferázového reporterového génu spojeného s ISRE (ISRE-luc), ktorý sa nachádza v HeLa bunkách.

Primárny test

HeLa bunky sa kotransfekujú s ISRE-Luc a pCDNA 3.1/hygro a fokusy (bunkové klony) sa vytvoria selekciou na DMEM médiu obsahujúcom hygromycín B. Bunkové klony sa skrínujú z hľadiska luciferázovej aktivity v prítomnosti alebo v neprítomnosti IFNG. Na ďalšie testovanie sa použijú tie klony, ktoré vykazujú najvyšší pomer stimulovanej luciferázovej aktivity ku nestimulovanej luciferázovej aktivite.

Na skríning muteínov sa naočkuje 150000 buniek/jamku na 96-jamkové kultivačné platne a inkubujú sa cez noc v DMEM médiu. Na nasledujúci deň sa k bunkám pridajú v rôznych koncentráciách muteíny, ako aj známe štandardy. Platne sa inkubujú 6 hodín pri 37 °C v 5% CO_2 vzdušnej atmosfére a následne sa do každej jamky pridá LucLite substrát (Packard Bioscience, Groningen, Holandsko).

Platne sa utesnia a meria sa luminiscencia na TopCount luminometri (Packard) SPC (počítanie jednotlivých fotónov) spôsobom. Každá platňa obsahuje jamky inkubované s IFNG, ako stimulovanú kontrolu, a iné jamky obsahujúce normálne médium, ako nestimulovanú kontrolu. Pomer medzi stimulovanou a nestimulovanou luciferázovou aktivitou slúži ako interný štandard tak pre muteínovú aktivitu, ako aj pre odchýlku medzi jednotlivými experimentmi.

Funkčný *in vivo* polčas rozpadu IFNG konjugátu

Meranie biologického polčasu rozpadu sa môže uskutočňovať množstvom spôsobov opísaných v literatúre. Jeden spôsob opisujú Rutenfranz a ďalší (J. Interferon Res. 1990, zv. 10, str. 337-341), ktorí používajú intravenóznu a intramuskulárnu injekciu IFNG 8 týždňovým C57BL/6 myšiam. Biologický polčas rozpadu sa meria biologickým testom stanovujúcim IFNG titer v hlodavčom sére použitím Hep-2 buniek a vírusu vezikulárnej stomatitídy (VVS). Ako alternatívu používali na detekciu IFNG hladiny v sére aj ELISA.

Ako alternatíva sa môže na štúdium subkutánnej absorpcie a lokálnej distribúcie IFNG použiť rádioaktívne značený IFNG. Croos a Roberts (J. Pharm., 1993, zv. 45, str. 606-609) uskutočnili štúdie ^{125}IFNG na anestetizovaných samičkách Spraque-Dawley potkanov. Po subkutánnom podaní sa odobrali vzorky krvi a tkaniva a gama snímaním sa stanovilo množstvo IFNG.

PEFylácia IFNG

PEGylovaný rhuIFNG sa môže pripraviť ako je opísané v príklade 2 patentu US 5109120. Analogicky môžu byť PEGylované tu opísané modifikované IFNG polypeptidy, nesúce napr. mutáciu N25K. Výsledný PEG-IFNG-N25K konjugát má v porovnaní s konjugátom rhuIFNG ďalšiu pripojenú PEG molekulu.

Príprava farmaceutického prostriedku

Farmaceutický prostriedok, napr. na liečenie intersticiálnych pľúcnych ochorení, sa môže pripraviť formulovaním relevantného purifikovaného konjugátu do injektovateľných prostriedkov v súlade s procedúrami, ktoré sú pre priemerného odborníka v oblasti dobre známe, napríklad takým spôsobom, že každá liekovka

obsahuje konjugát v množstve obsahujúcom 50, 100, 200, 300, 400 alebo 500 mikrogramov, napr. rhuIFNG alebo IFNG-N25K.

Identifikácia na povrchu exponovaných aminokyselinových zvyškov

Štruktúry

Experimentálne 3D štruktúry huIFNG stanovené röntgenovou kryštalografiou boli publikované v: Ealick a ďalší, Science 252:698-702 (1991) uvádzajúcej C-alfa stopu IFNG homodiméru; vo Walter a ďalší, Nature 376: 230-235 (1995) uvádzajúcej štruktúru IFNG homodiméru v komplexe s dvoma molekulami rozpustnej formy IFNG receptora. Koordináty tejto štruktúry neboli nikdy verejne dostupné; v Thiel a ďalší, Structure 8: 927-936 (2000) uvádzajúcej štruktúru IFNG homodiméru v komplexe s dvoma molekulami rozpustnej formy IFNG receptora majúceho tretiu molekulu receptora v štruktúre, pričom táto neinteraguje s IFNG homodimérom.

Spôsoby

Prístupná povrchová oblasť (ASA)

Počítačový program Access (B. Lee a F. M. Richards, J. Mol. Biol. 55: 379400 (1971)) verzia 2 (Copyright (c) 1983 Yale University) sa použil na vypočítanie prístupnej povrchovej oblasti (ASA) jednotlivých atómov v štruktúre. Tento spôsob typicky používa veľkosť sondy 1,4 Å a definuje prístupnú povrchovú oblasť (ASA) ako oblasť tvorenú centrom sondy. Pred touto kalkuláciou sa z koordinátovej sady odstránia všetky molekuly vody a všetky atómy vodíka, ako aj iné atómy, ktoré priamo nesúvisia s proteínom.

Frakčná ASA bočného reťazca

Frakčná ASA bočných reťazcových atómov sa vypočítava vydelením súčtu ASA atómov v bočnom reťazci s hodnotou reprezentujúcou ASA bočných reťazcových atómov zvyšku v predĺženom ALA-x-ALA tripeptide. Pozri Hubbard, Campbell & Thornton (1991) J. Mol. Biol. 220, 507-530. V tomto príklade je CA atóm braný ako časť bočného reťazca glycínových zvyškov, ale nie ostávajúcich

zvyškov. Nasledujúca tabuľka sa používa ako 100% ASA štandard pre bočný reťazec:

Ala 69,23 Å^2
Arg 200,35 Å^2
Asn 106,25 Å^2
Asp 102,06 Å^2
Cys 96,69 Å^2
Gln 140,58 Å^2
Glu 134,61 Å^2
Gly 32,28 Å^2
His 147,00 Å^2
Ile 137,91 Å^2
Leu 140,76 Å^2
Lys 162,50 Å^2
Met 156,08 Å^2
Phe 163,90 Å^2
Pro 119,65 Å^2
Ser 78,16 Å^2
Thr 101,67 Å^2
Trp 210,89 Å^2
Tyr 176,61 Å^2
Val 114,14 Å^2

Zvyšky nedetegované v štruktúre sú definované ako majúce 100% expozíciu, keďže sú považované za zvyšok vo flexibilných oblastiach.

Stanovenie vzdialenosti medzi atómami

Vzdialenosť medzi atómami sa stanovuje použitím molekulového grafického softwaru, napr. InsightII v. 98,0, MSI INC.

Determinácia receptor viažuceho miesta

Receptor viažuce miesto je definované ako miesto zahŕňajúce všetky zvyšky, ktorých prístupová povrchová oblasť sa mení po naviazaní receptora. Toto sa

stanovuje prostredníctvom aspoň dvoch ASA kalkulácií; jednou pre izolovaný ligand (ligandy) v komplexe ligandu (ligandov) a receptora (receptorov), a druhou pre kompletný komplex ligandu (ligandov) a receptora (receptorov).

Výsledky

Použitou röntgenovou štruktúrou bol IFNG homodimér v komplexe s dvoma molekulami rozpustnej formy IFNG receptora, ktorý mal tretiu molekulu IFNG receptora v štruktúre, ktorá neinteragovala s IFNG homodimérom, táto štruktúra bola publikovaná v Thiel a ďalší, Structure 8: 927-936 (2000). Štruktúra pozostáva z IFNG homodiméru, v ktorom sú dve molekuly označené ako A a B. Na konštrukčné účely sa pred IFNG sekvenciu umiestnil ďalší metionín označený ako M0 a sekvencia sa skrátila na C-konci o desať zvyškov (Q133 bol posledný zvyšok v skonštruovaných molekulách). Pri všetkých kalkuláciách tohto príkladu sa zo štruktúry odstránil M0. Štruktúra dvoch IFNG monomérov má veľmi slabú elektrónovú hustotu za zvyškom 120 a zvyšky po zvyšok T126 boli len modelované. Preto sa v tomto príklade pred kalkuláciami odstránili zo štruktúry zvyšky S121 až T126. Dva receptorové fragmenty označené C a D sú v priamom kontakte s IFNG homodimérom a tretia receptorová molekula označená E nie je v kontakte s IFNG homodimérom a nie je zahrnutá v týchto kalkuláciách.

Povrchová expozícia

Výsledkom uskutočňovania frakčných ASA kalkulácií pre homodimér molekúl A a B s vylúčením M0 a S121 až T126 v oboch molekulách bolo zistenie, že nasledujúce zvyšky mali viac ako 25 % ich bočného reťazca exponovaných na povrchu aspoň v jednom z monomérov: Q1, D2, P3, K6, E9, N10, K12, K13, Y14, N16, G18, H19, S20, D21, A23, D24, N25, G26, T27, G31, K34, N35, K37, E38, E39, S40, K55, K58, N59, K61, D62, D63, Q64, S65, Q67, K68, E71, T72, K74, E75, N78, V79, K80, N83, S84, N85, K86, K87, D90, E93, K94, N97, S99, T101, D102, L103, N104, H111, Q115, A118 a E119.

Nasledujúce zvyšky mali viac ako 50 % ich bočného reťazca exponovaných na povrchu aspoň v jednom z monomérov: Q1, D2, P3, K6, E9, N10, K13, N16, G18, H19, S20, D21, A23, D24, N25, G26, T27, G31, K34, K37, E38, E39, K55,

K58, N59, D62, Q64, S65, K68, E71, E75, N83, S84, K86, K87, K94, N97, S99, T101, D102, L103, N104, Q115, A118 a E119.

Výsledkom uskutočňovania frakčných ASA kalkulácií pre homodimér molekúl A a B s vylúčením M0 a S121 až T126 v oboch molekulách a vrátane receptorových molekúl C a D bolo zistenie, že nasledujúce zvyšky mali viac ako 25 % ich bočného reťazca exponovaných na povrchu aspoň v jednom z monomérov: Q1, D2, P3, K6, E9, N10, K13, Y14, N16, G18, H19, D21, N25, G26, G31, K34, N35, K37, E38, E39, S40, K55, K58, N59, K61, D62, D63, Q64, S65, Q67, K68, E71, T72, K74, E75, N78, V79, K80, N83, S84, N85, K86, K87, D90, E93, K94, N97, S99, T101, D102, L103, N104 a E119. Nasledujúce zvyšky mali viac ako 50 % ich bočného reťazca exponovaných na povrchu aspoň v jednom z monomérov: P3, K6, N10, K13, N16, D21, N25, G26, G31, K34, K37, E38, E39, K55, K58, N59, D62, Q64, S65, K68, E71, E75, N83, S84, K86, K87, K94, N97, S99, T101, D102, L103 a N104.

Všetky z vyššie uvedených polôh sú cieľmi modifikácie podľa vynálezu.

Výsledkom porovnania dvoch zoznamov bolo odstránenie polôh K12, S20, A23, D24, T27, H111, Q115 a A118 z 25% bočného reťazcového ASA zoznamu po naviazaní receptora a odstránenie polôh Q1, D2, E9, G18, H19, S20, A23, D24, T27, Q115, A118 a E119 z 50% bočného reťazcového ASA zoznamu po naviazaní receptora.

Zvyšky nedeterminované v štruktúre sú považované za kompletne na povrchu exponované zvyšky, tzn. S121, P122, A123, K125, T126, G127, K128, R129, K130, R131, S132, Q133, M134, L135, F136, R137, G138, R139, R140, A141, S142, Q143. Aj tieto zvyšky predstavujú separátne ciele na začlenenie pripájacích skupín podľa predloženého vynálezu (alebo môžu byť považované za patriace do skupiny na povrchu exponovaných aminokyselinových zvyškov, majúcich napr. viac ako 25 % alebo viac ako 50 % ich bočných reťazcov exponovaných).

Miesto viažuce receptor

Uskutočňovanie vyššie opísaných ASA kalkulácií viedlo k nasledujúcim zvyškom IFNG molekuly, ktoré majú redukované ASA aspoň v jednom z

monomérov v komplexe, v porovnaní s kalkuláciou pre izolovaný dimér: Q1, D2, Y4, V5, E9, K12, G18, H19, S20, D21, V22, A23, D24, N25, G26, T27, L30, K34, K37, K108, H111, E112, I114, Q115, A118, E119.

Príklad 1

Návrh expresnej kazety na expresiu IFNG v kvasinkových a CHO bunkách

DNA sekvencia, GenBank prístupové číslo X13274, zahŕňajúca kompletnú cDNA kódujúcu zrelý huIFNG bez jeho natívneho signálneho peptidu, sa modifikovala na uľahčenie vysokej expresie v kvasinkových bunkách. Najprv sa namiesto IFNG signálneho peptidu zaviedol MATa signálny peptid, aby sa uľahčila sekrécia do kvasinkového média. Potom sa modifikovali kodóny huIFNG nukleotidovej sekvencie použitím kodónov, ktoré sú často používané v kvasinkách. Následne sa určité nukleotidy v sekvencii substituovali inými, aby sa začlenili miesta rozoznávané DNA restrikčnými endonukleázami. Primery sa navrhli tak, aby bolo možné syntetizovať gén. Primery sa zostavili na syntézu génu jednokrokovou PCR použitím Platinum *Pfx*-polymerázového kitu (Liefe Technologies) a štandardných trojkrokových PCR cyklických parametrov. Zostavený gén sa amplifikoval prostredníctvom PCR použitím rovnakých podmienok a má sekvenciu uvedenú ako sekv. č. 3.

Syntetizovaný gén sa klonoval do pJSO37-lip (Okkels, J.S. (1996) Rec. DNA Biotech. III., zv. 782, 202-207) medzi *HindIII* miesto na 5' konci a *XbaI* miesto na 3' konci, čím vznikol pIGY-1.

Na vytvorenie jednoreťazcového konštruktu obsahujúceho kovalentne spojené monomérne IFNG polypeptidy sa vyrobili nasledujúce tri konštrukty:

I) Konštrukt obsahujúci dva huIFNG polypeptidy s úplnou dĺžkou spojené 19-mérnym spojovníkovým peptidom vymodelovaným podľa ľudských IgA1 pántových oblastí (Lunn CA a ďalší, J. Biol. Chem., 267, 17920-17924, 1992). Toto sa uskutočnilo prostredníctvom PCR použitím nasledujúcich primerov:

ADJ002	5'-GGTTTGATATCGATGGCCAA-3'	(sekv. č. 4)
ADJ003	5'-GCGGCCCTCTAGATTACT-3'	(sekv. č. 5)

ADJ004 5'-CATCTCCGTCCACTCCGACTCCATAGCATGCAAGATCCATATG-TGAAAGAA-3' (sekv. č. 6)

ADJ007 5'-ATCTTGCATGCTATGGAGTCGGAGTGGACGGAGATGGAGTTG-GCGGAGTAGAAGGAACCGCTGTTTTAGCAGCTGGAGACAATT-3' (sekv. č. 7)

PCR fragmenty sa klonovali do pIGY-1 medzi *ClaI* na 5' konci a *XbaI* na 3' konci, čím sa spojili dva monoméry v *SphI* (začlenené v spojovníkovej oblasti). Tento konštrukt sa nazýval pIGY-2.

II) Konštrukt obsahujúci dva monomérne zrelé huIFNG polypeptidy s úplnou dĺžkou bez spojovníka. Na toto sa použili nasledujúce primery pre PCR.

ADJ002 5'-GGTTTGATATCGATGGCCAA-3' (sekv. č. 8)

ADJ003 5'-GCGGCCCTCTAGATTACT-3' (sekv. č. 9)

ADJ006 5'-TTTAGAGGTAGAAGAGCTTCTCAGCAAGATCCATATGTGAAAG-AAGCT-3' (sekv. č. 10)

ADJ009 5'-AGCTTCTTTCACATATGGATCTTGCTGAGAAGCTCTTCTACGT-CTAAA-3' (sekv. č. 11)

PCR fragment sa zostavil dvojkrokovu PCR a klonoval sa medzi *ClaI* na 5' konci a *XbaI* na 3' konci v pIGY-1 a označil sa pIGY-3.

III) Konštrukt obsahujúci dva monomérne IFNG polypeptidy skrátené na C-konci (o posledných 11 aminokyselín), ktoré sú spojené vyššie uvedeným 19-mérnym spojovníkom. Použité boli nasledujúce primery:

ADJ001 5'-TGCTCTAGACATCTGAGATCGTTTTCTCTTTCC-3' (sekv. č. 12)

ADJ002 5'-GGTTTGATATCGATGGCCAA-3' (sekv. č. 13)

ADJ004 5'-CATCTCCGTCCACTCCGACTCCATAGCATGCAAGATCCATA-TGTGAAAGAA-3' (sekv. č. 14)

ADJ005 5'-ATCTTGCATGCTATGGAGTCGGAGTGGACGGAGATGGAGTT-GGCGGAGTAGAAGGAACCGGCATCTGAGATCTTTTTCTCC-3' (sekv. č. 15)

PCR fragmenty sa klonovali do pIGY-1 medzi *ClaI* na 5' konci a *XbaI* na 3' konci, čím sa spojili dva monoméry v *SphI* (začlenené v spojovníkovej oblasti). Tento konštrukt sa nazýval pIGY-4.

Konštrukty na expresiu v CHO bunkách

Na expresiu IFNG v CHO bunkách sa syntetizoval nasledujúci oligonukleotid, aby sa umožnilo klonovanie IFNG vrátane jeho signálneho peptidu do pcDNA3.1/hygro (Invitrogen).

ADJ012 5'-GCGGATCCATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTTTCAGCT-
CTGCATCGTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGCCAAGATCCATA
TGTGAAAGAAGCT-3' (sekv. č. 16)

Na klonovanie IFNG v tomto expresnom vektore vyprodukuje PCR amplifikácia použitím ADJ012 a ADJ003 a pIGY-1 ako templátu 450bp fragment, ktorý môže byť klonovaný medzi *BamHI* na 5' konci a *XbaI* na 3' konci pcDNA3.1/hygro, čím vznikne pIGY-5.

Na začlenenie glykozylačných miest do IFNG sa oligonukleotidy navrhli takým spôsobom, že PCR generované zmeny mohli byť zavedené do expresného plazmidu (pIGY-5) klasickou dvojkrokovou PCR, po ktorej nasledovalo klonovanie PCR fragmentu medzi *BamHI* na 5' konci a *XbaI* na 3' konci.

Preto sa navrhli dva vektorové primery na použitie so špecifickými mutačnými primermi:

ADJ013 5'-GATGGCTGGCAACTAGAAG-3' (sekv. č. 17); (antisense, downstream vektorový primer)

ADJ014 5'-TGTACGGTGGGAGGTCTAT-3' (sekv. č. 18); (sense upstream vektorový primer

Pre rozličné muteíny sa navrhli nasledujúce primery.

K12T

ADJ015 5'-AGCATTAAAATACTTCGTCAAGTTTTCAGC-3' (sekv. č. 19)

ADJ016 5'-GCTGAAAACTTGACGAAGTATTTTAATGCT-3' (sekv. č. 20)

G18T

ADJ017 5'-CACATCAGAATGAGTAGCATTAAAATA-3' (sekv. č. 21)

ADJ018 5'-TATTTTAATGCTACTCATTCTGATGTG-3' (sekv. č. 22)

E38N

ADJ019 5'-CATAATTTTTCGATCGGATTCGTTTTTCCAATTCTT-3' (sekv. č. 23)

ADJ020 5'-AAGAATTGGAAAAACGAATCCGATCGAAAAATTATG-3' (sekv. č. 24)

K61T

ADJ021 5'-AATAGACTGATCGTCTGTAAAGTTTTTAAA-3' (sekv. č. 25)

ADJ022 5'-TTTAAAAACTTTACAGACGATCAGTCTATT-3' (sekv. č. 26)

N85T

ADJ023 5'-TCTTTTCTTTTTAGTACTATTGAAAAACTT-3' (sekv. č. 27)

ADJ024 5'-AAGTTTTTCAATAGTACTAAAAAGAAAAGA-3' (sekv. č. 28)

K94N

ADJ025 5'-ATAATTAGTCAAATTTTCGAAGTCATG-3' (sekv. č. 29)

ADJ026 5'-GATGACTTCGAAAATTTGACTAATTAT-3' (sekv. č. 30)

S99N

ADJ027 5'-AATCAAGTCAGTAACGTTATAATTAGTCAA-3' (sekv. č. 31)

ADJ028 5'-TTGACTAATTATAACGTTACTGACTTGAAT-3' (sekv. č. 32)

Q106T

ADJ029 5'-ATGAATAGCTTTACTAGTCACATTCAAGTC-3' (sekv. č. 33)

ADJ030 5'-GACTTGAATGTGACTAGTAAAGCTATTCAT-3' (sekv. č. 34)

Po dvojkrokovej PCR a poštiepení s *BamHI* a *XbaI* sa očakávalo, že každý z týchto primerových párov povedie k 447bp fragmentu, ktorý je možné klonovať do pIGY-5.

Expresia interferónu γ v CHO bunkách

Vyššie uvedený konštrukt sa transfekuje do CHO K1 bunkovej línie (ATCC č. CCL-61) použitím Lipofectamine 2000 (Life Technologies, USA) ako transfekčného činidla. O 24 hodín neskôr sa kultivačné médium odoberie a testuje sa z hľadiska aktivity a koncentrácie interferónu γ.

ZOZNAM SEKVENCIÍ

<110> Maxygen ApS

<120> Konjugáty interferónu gama

<130> 7wo

<160> 34

<170> PatentIn verzia 3.0

<210> 1
<211> 166
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

```
Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val
         115                 120                 125
Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
     130                 135                 140
Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
145                 150                 155                 160
Gly Arg Arg Ala Ser Gln
                165
```

<210> 2

<211> 143

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

<210> 3

<211> 375

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 3

tctgatgtgg ctgataatgg aactttgttc ttaggcattt tgaagaattg gaaagaagaa 60
tctgatagaa aaattatgca gtctcaaatt gtgtcttttt acttcaaatt gtttaaaaac 120
tttaaagatg atcagtctat tcaaaagtct gtggaaacta ttaaggaaga tatgaatgtg 180
aagtttttca attctaacaa aaagaaaaga gatgacttcg aaaagttgac taattattct 240
gtgactgact tgaatgtgca aagaaaagct attcatgaat tgatccaagt gatggctgaa 300
ttgtctccag ctgctaaaac aggaaagaga aaaagatctc agatgttgtt tagaggtaga 360
agagcttctc agtaa 375

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 4

ggtttgatat cgatggccaa 20

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 5

gcggccctct agattact 18

<210> 6

<211> 51

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 6

catctccgtc cactccgact ccatagcatg caagatccat atgtgaaaga a 51

<210> 7

<211> 84

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 7

atcttgcatg ctatggagtc ggagtggacg gagatggagt tggcggagta gaaggaaccg 60

ctgttttagc agctggagac aatt 84

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 8

ggtttgatat cgatggccaa 20

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 9

gcggccctct agattact 18

<210> 10

<211> 48

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 10

tttagaggta gaagagcttc tcagcaagat ccatatgtga aagaagct 48

<210> 11

<211> 48

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 11

agcttctttc acatatggat cttgctgaga agctcttcta cgtctaaa 48

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 12

tgctctagac atctgagatc gttttctctt tcc 33

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 13

ggtttgatat cgatggccaa 20

<210> 14

<211> 51

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 14

catctccgtc cactccgact ccatagcatg caagatccat atgtgaaaga a 51

<210> 15

<211> 81

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 15

atcttgcatg ctatggagtc ggagtggacg gagatggagt tggcggagta gaaggaaccg 60
gcatctgaga tcttttttctc c 81

<210> 16

<211> 102

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 16

cgcggatcca tgaaatatac aagttatatc ttggcttttc agctctgcat cgttttgggt 60
tctcttggct gttactgcca agatccatat gtgaaagaag ct 102

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 17

gatggctggc aactagaag 19

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 18

tgtacggtgg gaggtctat 19

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 19

agcattaaaa tacttcgtca agttttcagc 30

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 20

gctgaaaact tgacgaagta ttttaatgct 30

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 21

cacatcagaa tgagtagcat taaaata 27

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 22

tattttaatg ctactcattc tgatgtg 27

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 23

cataattttt cgatcggatt cgtttttcca attctt 36

<210> 24

<211> 36

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 24

aagaattgga aaaacgaatc cgatcgaaaa attatg 36

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 25

aatagactga tcgtctgtaa agtttttaaa 30

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 26

tttaaaaact ttacagacga tcagtctatt 30

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 27

tcttttcttt ttagtactat tgaaaaactt 30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 28

aagtttttca atagtactaa aaagaaaaga 30

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 29

ataattagtc aaattttcga agtcatg 27

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 30

gatgacttcg aaaatttgac taattat 27

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 31

aatcaagtca gtaacgttat aattagtcaa 30

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 32

ttgactaatt ataacgttac tgacttgaat 30

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 33

atgaatagct ttactagtca cattcaagtc 30

<210> 34

<211> 30

<212> DNA

<213> syntetický konštrukt

<400> 34

gacttgaatg tgactagtaa agctattcat 30

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Konjugát vykazujúci IFNG aktivitu a obsahujúci aspoň jednu N-pripojenú sacharidovú časť kovalentne pripojenú na začlenené N-glykozylačné miesto IFNG polypeptidu, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu líšiacu sa od sekvencie rodičovského IFNG polypeptidu aspoň jedným začleneným N-glykozylačným miestom.

2. Konjugát podľa nároku 1, v ktorom je rodičovským polypeptidom divý typ ľudského IFNG, huIFNG, alebo jeho variant alebo fragment.

3. Konjugát podľa nároku 1 alebo 2, v ktorom bolo N-glykozylačné miesto začlenené do polohy, v ktorej sa v huIFNG nachádza aminokyselinový zvyšok majúci aspoň 25 % svojho bočného reťazca exponovaných na povrchu.

4. Konjugát podľa nároku 3, v ktorom bolo N-glykozylačné miesto začlenené do polohy, v ktorej sa v huIFNG nachádza aminokyselinový zvyšok majúci aspoň 50 % svojho bočného reťazca exponovaných na povrchu.

5. Konjugát podľa nároku 3, v ktorom je uvedené začlenené N-glykozylačné miesto zavedené substitúciou vybranou zo skupiny obsahujúcej Q1N+P3S/T, P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, E9N+L11S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, Y14N+N16S/T, G18S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40T, E39N+D41S/T, S40N+R42S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, K61N+D63S/T, D62N+Q64S/T, D63N, D63N+S65T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, Q67N, Q67N+S69T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, T72N+K74S/T, K74N+D76S/T, E75N+M77S/T, K80S/T, V79N+F81S/T, K80N+F82S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K87S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, D90N+F92S/T, E93N+L95S/T, K94N, K94N+T96S, S99N, S99N+T101S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T, Q106S/T, E119N, E119N+S121T, P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, T126N+K128S/T,

G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T, K130N, K130N+S132T, R131N+Q133S/T, S132N+M134S/T, Q133N+L135S/T, M134N+F136S/T, L135N+R137S/T, F136N+G138S/T, R137N+R139S/T, G138N+R140S/T, R139N+A141S/T, R140N a R140N+S142T, pričom substitúcie sú označované vo vzťahu k hulFNG s aminokyselinovou sekvenciou uvedenou ako sekv. č. 2.

6. Konjugát podľa nároku 4, v ktorom je uvedené začlenené N-glykozylačné miesto zavedené substitúciou vybranou zo skupiny obsahujúcej P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, G18S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40S/T, E39N+D41S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, D62N+Q64S/T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, E75N+M77S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, K94N, K94N+T96S, S99N, S99N+T101S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T, Q106S/T, P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, T126N+K128S/T, G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T, K130N, K130N+S132T, R131N+Q133S/T, S132N+M134S/T, Q133N+L135S/T, M134N+F136S/T, L135N+R137S/T, F136N+G138S/T, R137N+R139S/T, G138N+R140S/T, R139N+A141S/T, R140N a R140N+S142T, pričom substitúcie sú označované vo vzťahu k hulFNG s aminokyselinovou sekvenciou uvedenou ako sekv. č. 2.

7. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 3 až 6, v ktorom je uvedené začlenené N-glykozylačné miesto zavedené substitúciou vybranou zo skupiny obsahujúcej K12S/T, G18S/T, E38N, E38N+S40T, K61S/T, N85S/T, K94N a Q106S/T.

8. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, ktorý obsahuje aspoň jednu ďalšiu nepolypeptidovú časť.

9. Konjugát podľa nároku 8, v ktorom je ďalšou nepolypeptidovou časťou polymérová molekula.

10. Konjugát vykazujúci IFNG aktivitu a obsahujúci aspoň jednu nepolypeptidovú časť kovalentne pripojenú na IFNG polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu líšiacu sa od sekvencie rodičovského IFNG polypeptidu aspoň jedným začleneným cysteínovým zvyškom.

11. Konjugát podľa nároku 10, v ktorom je rodičovským polypeptidom divý typ ľudského IFNG, huIFNG, alebo jeho variant alebo fragment.

12. Konjugát podľa nároku 11, v ktorom bol cysteínový zvyšok začlenený do polohy, v ktorej sa v huIFNG nachádza aminokyselinový zvyšok majúci aspoň 25 % svojho bočného reťazca exponovaných na povrchu.

13. Konjugát podľa nároku 12, v ktorom bol cysteínový zvyšok začlenený do polohy, v ktorej sa v huIFNG nachádza aminokyselinový zvyšok majúci aspoň 50 % svojho bočného reťazca exponovaných na povrchu.

14. Konjugát podľa nároku 13, v ktorom je uvedený začlenený cysteínový zvyšok zavedený substitúciou vybranou zo skupiny obsahujúcej N10C, N16C, E38C, N59C, N83C, K94C a N104C.

15. Konjugát podľa nároku 13, v ktorom je uvedený cysteínový zvyšok začlenený v polohe, v ktorej sa nachádza ktorýkoľvek z aminokyselinových zvyškov 121 až 143 huIFNG.

16. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 10 až 15, v ktorom je nepolypeptidovou časťou polymérová molekula.

17. Konjugát podľa nároku 9 alebo 16, v ktorom je polymérovou molekulou lineárny alebo rozvetvený polyetylénglykol.

18. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 17, v ktorom je IFNG polypeptid skrátený na C-konci.

19. Nukleotidová sekvencia kódujúca polypeptidovú časť konjugátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 18.

20. Expresný vektor nesúci nukleotidovú sekvenciu podľa nároku 19.

21. Hostiteľská bunka obsahujúca nukleotidovú sekvenciu podľa nároku 19 alebo expresný vektor podľa nároku 20.

22. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 18 a farmaceuticky prijateľné riedidlo, nosič alebo adjuvans.

23. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 18 alebo farmaceutický prostriedok podľa nároku 22 na použitie ako liečivo.

24. Použitie konjugátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 18 alebo farmaceutického prostriedku podľa nároku 22 na výrobu lieku na liečenie intersticiálnych pľúcnych ochorení.

25. Použitie podľa nároku 24, kde intersticiálnym pľúcnym ochorením je idiopatická pľúcna fibróza.

26. Použitie podľa nároku 24 alebo 25 na výrobu lieku na subkutánne podanie.

27. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 18 na liečenie intersticiálnych pľúcnych ochorení.

28. Konjugát podľa nároku 27, kde intersticiálnym pľúcnym ochorením je idiopatická pľúcna fibróza.