



(12) **PATENT**

(11) **344802**

(13) **B1**

**NORGE**

(19) **NO**

(51) **Int.Cl.**

**C07K 14/54 (2006.01)**

**C07K 16/24 (2006.01)**

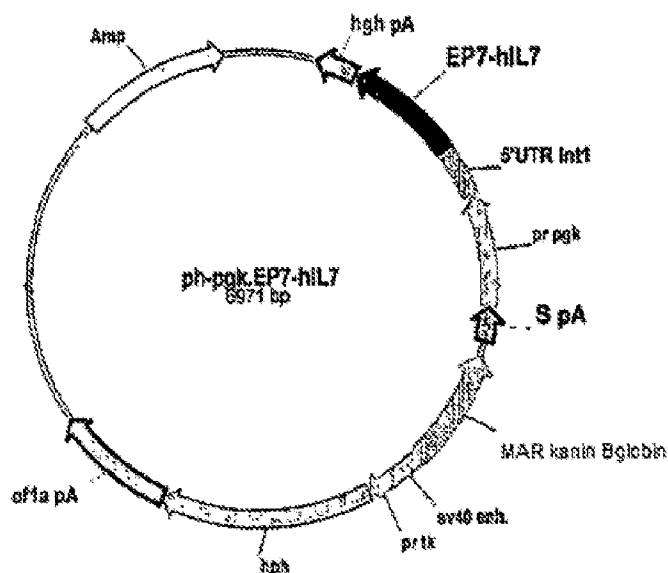
**A61K 38/00 (2006.01)**

**A61K 39/00 (2006.01)**

## Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20080045	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.07.19 PCT/IB2006/002663
(22)	Inng.dag	2008.01.03	(85)	Videreføringsdag	2008.01.03
(24)	Løpedag	2006.07.19	(30)	Prioritet	2005.07.20, EP, 05291556
(41)	Alm.tilgj	2008.04.21			
(45)	Meddelt	2020.05.04			
(73)	Innehaver	Cytheris, 175, Avenue Jean-Jacques Rousseau, 92130 ISSY LES MOULINEAUX, Frankrike			
(72)	Oppfinner	Brigitte Assouline, 12/14, rue Sébastopol, 92400 COURBEVOIE, Frankrike Michel Morre, 67, rue Nationale, 7000 Portage Road, 92100 KALAMAZOO, BOULOGNE, Frankrike Iann Rance, 18 Grande Rue, 92310 SÈVRES, Frankrike Anne Gregoire, 17 Grande Rue, 55800 AUZÈCORT, Frankrike Corinne Breque, 33 rue d'Issy, 92170 VANVES, Frankrike			
(74)	Fullmektig	ACAPO AS, Postboks 1880 Nordnes, 5817 BERGEN, Norge			
(54)	Benevnelse	<b>Glykosylert UL-7, fremstilling og anvendelse av samme.</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 1391513 A, US 5328988 A, US 5153310 A GOODWIN G.G. ET AL. Human interleukin 7: Molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1989, Vol. 86, side 302-306.			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives nye og forbedrede interleukin-7 polypeptider, og likeledes sammen-setninger omfattende samme, deres framstilling og anvendelser. Nærmere bestemt vedrører oppfinnelsen hyperglykosylerte IL-7 polypeptider som har forbedrede egenskaper, og likeledes framstilling og terapeutiske anvendelser av disse. Oppfinnelsen beskriver også nye IL-7 polypeptider som har modifiserte aminosyresekvenser inneholdende artifi-sielt etablerte glykosyleringssete(r), og likeledes korresponderende nukleinsyremolekyler, vektorer og rekombinante vertsceller. Oppfinnelsen vedrører også anvendelse av slike polypeptider, celler eller nukleinsyrer for helbredende eller preventiv behandling av mammaiske individer, inkluderende mennesker.



Den foreliggende oppfinnelse vedrører nye og forbedrete interleukin-7 polypeptider, og likeledes sammensetninger omfattende disse, samt deres framstilling og anvendelse. Nærmere bestemt vedrører oppfinnelsen hyperglykosylerte IL-7 polypeptider som har forbedrete egenskaper, og likeledes framstilling og terapeutisk anvendelse av disse. Det beskrives også nye IL-7 polypeptider som har modifiserte aminosyresekvenser inneholdende artifielt etablerte glykosyleringssete(r), og likeledes korresponderende nukleinsyremolekyler, vektorer og rekombinante verter eller vertsceller. Det beskrives også anvendelse av slike polypeptider, celler eller nukleinsyrer for helbredende eller preventiv behandling av pattedyr, inkluderende mennesker.

#### BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

B- og T-lymfocytter er de primære effektorceller i immunresponsene. Begge celleklasser vurderes endelig å være avledet fra hematopoietiske stamceller i mammalsk benmarg, *via* progenitor- eller forløperceller og representerer skillbare trinn i differensieringen av hver klasse. Modne T-celler utvikles prinsipielt i thymus, sannsynligvis fra en forløpercelle som migrerer fra benmargen til thymus i et tidlig trinn av T-lymfocytutvikling. Lymfoide cellers utvikling er avhengig av vekst, overlevelse og differensieringsfaktorer produsert av forskjellige stromale celler. Et antall faktorer er aktive på modne perifere B- og T-celler, inkluderende IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, interferon gamma, BSF-2, neuroleukin, transformerende vekstfaktor beta og IL-7.

”Interleukin-7” eller ”IL-7” referer til et mammalsk endogent sekretorisk glykoprotein som er i stand til å indusere proliferasjon av benmargavledete lymfocyt progenitorer og forløpere, inkluderende de spesialiserte forløpere kjent som pre-B-celler. Opprinnelig avledet fra dets stromale element av en benmargcellelinje, utskilles IL-7 også av thymiske stromale celler, intestinale og andre epitelceller, noen dendrittceller og follikulære dendrittceller, keratinocytter og generelt alt lymfoid vev. Alternative angivelser av dette molekyl er ”pre-B-cellevekstfaktor”, og lymfopoietin-1”.

EP0314415 (eller US4,965,195) beskriver mammalske interleukin-7 proteiner og korresponderende DNAer. Human IL-7 aminosyresekvens inneholder tre putative N-koblede glykosyleringsseter, lokalisert ved Asn-enheter ved posisjoner 70, 91 og 116.

Transient rekombinant ekspresjon av hIL-7 (human IL-7) i COS-celler muliggjør visualisering av r-huIL-7 (rekombinant humant IL-7) som tre proteinbånd med tilsynelatende molekylvekter på ca. 20, 24 og 28 kDa (Cosman *et al.*; Lymphokine Receptor Interactions; 1989; 179:229-236). Stabil rekombinant ekspresjon av hIL-7 i BHK-celler ble også rapportert (Armitage *et al.*; The Journal of Immunology; 1990; 144:938-941). Imidlertid, glykosyleringsstatus av naturlig forekommende human IL-7, spesielt O-glykosyleringsstatus, har aldri blitt dokumentert eller studert, og virkningen på glykosyleringsprofilen på IL-7 egenskapene har aldri blitt vurdert. Videre, ikke-glykosylerte modne human IL-7 (r-hIL-7) produsert i *E. coli*, som beskrevet i EP0314415, oppviser en 17.387 Dalton molekylvekt og oppviser en høy aktivitet *in vitro* i spesifikke bioanalyser basert på proliferasjon av forskjellige lymfocyttopulasjoner. Andre cytokiner og vekstfaktorer, så som G-CSF, GM-CSF, IFN, HGF, etc., oppviser også full terapeutisk aktivitet uten glykosylering.

WO2004/018681 beskriver en aktiv konformer av human IL-7, omfattende følgende disulfid broer: 1-4 (C2-C92), 2-5 (C34-C129) og 3-6 (C47-C141), og likeledes framgangsmåter for å produsere eller karakterisere samme, og anvendelser derav.

IL-7 ble opprinnelig beskrevet som et cytokin hvis hovedaktivitet var induksjon av forløper B-celle proliferasjon (Namen A.E. *et al.*; Journal of Experimental medicine; 1988; 167:988-1002). IL-7 har i det siste blitt beskrevet til å være involvert i overlevelse og proliferasjon av tymocytter (T-celler) under tidlig fase av T-celleutvikling (Schluns K.S. *et al.*; Nature Immunology; 2000; 1(5):426-432). IL-7 reaksjonsvei er essensiell for lymfocytutvikling særskilt ved utvikling av tymocytter (Maeurer M.J. *et al.*; Int. Rev. Immunol.; 1998; 16:309-22 - Fry T.J. *et al.*; Blood; 2002; 99:3892-904). Fry og samarbeidspartnere identifiserte videre IL-7 som en potent modulator av tymisk avhengig T-celle regenerering i en multifaktoriell virkning (Fry T.J. *et al.*; Blood; 2001; 97(6):1525-1533). IL-7 modulerer potent modne T-celler og i tillegg til denne effekt på modne T-celler, kan IL-7 påvirke utvikling av antigenpresenterende celler (Marquez C. *et al.*; J. Exp. Med.; 1995; 181:475-83). IL-7 er essensiell for minne T-celle regenerering, både i CD4+ og CD8+ undergruppene (Kondrack R.M.

*et al.*; J. Exp. Med.; 2003; 198:1797-806 - Kaech S.M. *et al.*; Nat. Immunol.; 2003; 4:1191-8).

EP1391513 beskriver nye og forbedrete IL-7 medikamentsubstanser.

5

US5328988 beskriver Interleukin-7 proteiner fra pattedyr.

US5153310 beskriver biologisk aktive analoger av humant IL-2.

10 Goodwin G.G. et al. Human interleukin 7: Molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1989, Vol. 86, side 303-306, beskriver cDNA som koder for biologisk aktivt Interleukin 7.

15 IL-7 har således et stort terapeutisk potensiale for anvendelse i stimulering av proliferasjon av T-celle forløpere, og antistoffutskillende B-celler, i stimuleringen av antigendrevet T-celle perifer ekspansjon, og i produksjon av naive T-celler, og likeledes andre hematopoietiske celletyper. En spesielt interessant terapeutisk anvendelse av aktive IL-7 molekyler er for immunrekonstituering for lymfomatiske  
 20 pasienter: pasienter behandlet for en cancer, pasienter som har mottatt benmarg eller en stamcelleoverføring, pasienter som presenterer en ervervet eller genetisk immunsvikt, eldre pasienter og i pasienter som har lav CD4-tall. Andre anvendelser beror på evnen av IL-7 til å produsere nye naive CD4 T-celler eller å ekspandere spesifikke poler for å produsere eller øke spesifikke immunresponser (vaksine-  
 25 forbedring).

I lys av dets terapeutiske potensialer, er der betydelig interesse i å utvikle biologisk aktive eller forbedrete IL-7 polypeptider som er egnet for effektive terapeutiske anvendelser. I denne sammenheng, blant de forskjellige cytokiner og vekstfaktorer  
 30 som er kommersielt tilgjengelige, er noen svake immunogeniske (for eksempel Interferon alfa "IFN $\alpha$ " granulocyt kolonistimulerende faktor "G-CSF") slik at de korresponderende medikamentsubstanser ikke krever en svært spesifikk polypeptid-

renhet annet enn konvensjonelt nivå som vanligvis er akseptert for rekombinante proteiner. I motsetning, andre vekstfaktorer er mer immunogene (*for eksempel* Beta interferon "β-IFN", Granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor "GM-CSF") eller deres spesifikke aktivitet er så kritisk for liv (*for eksempel* Erythropoietin "EPO") at medikamentsubstansens polypeptidrenhet og profil må studeres spesifikt og opprettholdes innen smale grenser for å beskytte fra immunogenisitet.

IL-7 er et unikt molekyl. På grunn av dets iboende immunforbedrende egenskaper, så er IL-7 anvendt som et terapeutisk middel spesielt utsatt for å utløse anti-IL-7 immunogenisitet (anti-IL-7 binding eller nøytraliserende antistoff). Denne immunogenisitet er skadelig for langtids terapeutisk aktivitet av proteinet. Anti-IL-7 antistoff kan modifisere IL-7 farmakokinetikk og nøytraliserer dets terapeutiske aktivitet.

Forskjellige IL-7 isoformer er involvert i å utløse anti-IL-7 immunogenisitet, og blant disse er: forandrete polypeptidsekvenser (*for eksempel* oksiderte, reduserte, deamiderte eller trunkerte former), kovalente eller ikke-kovalente IL-7 multimerer, så som aggregerte IL-7 molekyler og lignende. Derfor er det kritisk å definere IL-7 polypeptider og medikamentsubstanser som er mer stabile, mindre tilbøyelig for intermolekylær aggregering, mindre immunogeniske og framdeles biologisk aktive. Faktisk, idet aktiviteten av de fleste medikamenter er korrelert med AUC-parameteren, er aktiviteten av IL-7 korrelert til halveringstidparameteren og mer bestemt til gjennomsnittlig oppholdstid.

#### SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en hyperglykosylert IL-7 sammensetning, kjennetegnet ved at nevnte sammensetning omfatter minst 80% mammalske IL-7 polypeptider som er glykosylert ved fra tre og opp til åtte distinkte aminosyreenheter, inkluderende én O- og opp til syv N-glykosyleringssteder, som har et midlet isoelektrisk punkt under 6,5 og en midlet molekylvekt over 27 kDa som bestemt med SDS gel elektroforese.

Ytterligere utførelser er angitt i underkravene 2-10 og 12.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en fremgangsmåte for å produsere et IL-7 polypeptid som definert over, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter å:

- 5 a) dyrke, i en mate-batch eller perfusjonsmodus, en rekombinant vertscelle omfattende et rekombinant nukleinsyremolekyl som koder for et IL-7 polypeptid,
- b) samle IL-7-polypeptidet produsert fra nevnte celle, og
- 10 c) rense nevnte IL-7 polypeptid med en fremgangsmåte omfattende minst ett trinn med hydrofob interaksjonskromatografi, ionutbytterkromatografi, affinitetskromatografi eller gelfiltreringskromatografi, enten alene eller i forskjellige kombinasjoner.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en anvendelse av en sammensetning som angitt over, hvor sammensetningen ytterligere omfatter én eller flere farma-  
15 søytiske kompatible bærere eller eksipienter.

Ytterligere utførelser er angitt i underkravene 14-20.

Den foreliggende oppfinnelse beskriver nye og forbedrete IL-7 polypeptider, medika-  
20 mentsubstanser og sammensetninger. Nærmere bestemt beskriver oppfinnelsen nye IL-7 molekulære former som har en høy grad av glykosylering og en oligosakkarid profil som er skiftet til en høyere molekylstørrelse med øket sialylering og fukosylalering av karbohydratenhetene og et lavere isoelektrisk punkt. Oppfinnelsen at disse nye oligosakkaridprofiler gir forbedret kjemisk og farmasøytisk stabilitet til  
25 disse nye medikamentsubstanser og en forlenget farmakokinetisk profil etter *in vivo* administrering, kjennetegnet ved en økt gjennomsnittlig oppholdstid (MRT) som muliggjør et mindre hyppig doseringsregime.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer derfor nye sterkt glykosylerte eller hyper-  
30 glykosylerte IL-7 polypeptider med forbedrete egenskaper. Det beskrives også nye IL-7 polypeptider som har modifiserte aminosyresekvenser inneholdende artifielt etablerte glykosyleringssete(r), og likeledes korresponderende nukleinsyremolekyler, vektorer og rekombinante verter eller vertsceller. Det beskrives også anvendelse av

slike polypeptider, celler eller nukleinsyrer for helbredende eller preventiv behandling av pattedyr (inkluderende mennesker). Foreliggende oppfinnelse vedrører således nye aktive IL-7 polypeptider, medikamentsubstanser og farmasøytiske sammensetninger som oppviser økt stabilitet, redusert mottakelighet for proteolyse og aggregering, fordelaktig *in vivo* langtidsaktivitet og redusert immunogenisitet, som dermed muliggjør forbedret globale eller spesifikke immunresponser til å genereres i pattedyr.

Et formål med foreliggende oppfinnelse vedrører en hyperglykosylert IL-7 sammensetning.

Et ytterligere formål med foreliggende oppfinnelse vedrører renset hyperglykosylert IL-7 polypeptid.

Slike hyperglykosylerte IL-7 polypeptid inneholder minst tre N-glykosylerte aminosyreenheter.

Et ytterligere formål med foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av hyperglykosylert IL-7 for framstilling av et medikament omfattende nevnte hyperglykosylert IL-7 og en farmasøytisk akseptabel eksipient eller vehikkel for å behandle et pattedyr.

Et ytterligere formål med foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av en hyperglykosylert IL-7 sammensetning for framstilling av et medikament for behandling av et pattedyr.

Det beskrives også en framgangsmåte for å bevirke eller stimulere en immunrespons i et individ, omfattende å administrere til individet en effektiv mengde av en hyperglykosylert IL-7 sammensetning.

Det beskrives også en framgangsmåte for *ex vivo* å forbedre ekspansjon av T-celler, hvor framgangsmåten omfatter å sette T-cellene i forbindelse med et

hyperglykosylert IL-7 polypeptid eller sammensetning, for dermed å forbedre ekspansjon av T-celler.

5 I en bestemt utførelse er den hyperglykosylerte IL-7 sammensetning en sammensetning omfattende minst 80%, fortrinnsvis mellom 80% og 95%, IL-7 polypeptider som er hyperglykosylert ved minst tre distinkte aminosyreenheter. Slike enheter kan være enten naturlig foreliggende innen en IL-7 polypeptidsekvens og/eller artifi-

10 I en ytterligere foretrukket utførelse er den hyperglykosylerte IL-7 sammensetning en sammensetning omfattende minst 80%, fortrinnsvis mellom 80% og 95%, IL-7 polypeptider som er glykosylert fra tre og opptil åtte distinkte aminosyreenheter, inkluderende en O- og opptil syv N-glykosylerings seter. Slike enheter kan være enten naturlig foreliggende innen en IL-7 polypeptidsekvens og/eller artifi-

15 glykosylerings seter.

I denne sammenheng er et ytterligere formål med foreliggende oppfinnelse IL-7 polypeptider som har en modifisert aminosyresekvens, hvor nevnte sekvens omfatter minst ett artifi-

20 7 polypeptidene ifølge oppfinnelsen omfatter 1, 2, 3 eller 4 artifielt dannede glykosylerings seter, mer fortrinnsvis 1, 2 eller 3; enda mer foretrukket 1 eller 2. Som det vil bli beskrevet ytterligere, de artifielt etablerte glykosylerings seter er fortrinnsvis N-koblede glykosylerings seter. IL-7 polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan være av enhver pattedyropprinnelse, fortrinnsvis fra et menneske. Ytterligere, slike IL-7

25 polypeptider kan omfatte sekvensen av et modent IL-7 polypeptid, eller ytterligere omfatte ytterligere aminosyreenheter, så som et sekresjonspeptid for eksempel. I tillegg, eller som alternativ, IL-7 polypeptidet er fortrinnsvis en spesifikk konformer omfattende følgende tre disulfidbroer: Cys: 1-4 (Cys2- Cys92); 2-5 (Cys34- Cys129); 3-6 (Cys47- Cys141). Spesifikke eksempler av slike IL-7 polypeptider omfatter minst

30 én aminosyremodifisering som beskrevet i tabell 1 nedenfor, eller en kombinasjon derav.

Det beskrives videre et nukleinsyremolekyl som koder for et IL-7 polypeptid som beskrevet over. Nukleinsyremolekylet kan være enhver DNA eller RNA molekyl, typisk et cDNA molekyl.

- 5 Et nukleinsyremolekyl som koder for sekresjonssignal omfattende SEQ ID NO: 19 beskrives.

Det beskrives en vektor omfattende et nukleinsyremolekyl som definert over.

- 10 Vektoren kan være enhver prokaryot eller eukaryot vektor, typisk en eukaryot vektor, og kan utvelges blant et plasmid, episomal DNA, cosmid, viral vektor, artifielt kromosom, *etc.* Vektoren kan omfatte enhver regulatorisk sekvens som muliggjør egnet ekspresjon av den kodende nukleinsyre i en utvalgt vertscelle, *for eksempel* en promoter, terminator, polyA, replikasjonsorigo, homolog region, intron, gener 5' eller 3' ikke-translaterte regioner (UTR) *etc.*

15

Ovennevnte nukleinsyrer og vektorer kan anvendes for eksempel for å produsere rekombinante mammalske IL-7 polypeptider i forskjellige kompetente vertsceller, og likeledes for genterapiformål.

- 20 Det beskrives en rekombinant vertscelle omfattende en nukleinsyre eller en vektor som beskrevet over. En slik rekombinant celle kan være prokaryotisk, eller mer foretrukket eukaryotisk, så som en gjær, insekt, plante eller mammalsk celle, for eksempel, mer foretrukket rekombinant vertscelle transdusert for å uttrykke eller overuttrykke et glykosyltransferase og/eller et 2-6-sialyltransferasegen, for eksempel
- 25 av human opprinnelse.

- Det beskrives en medikamentsubstans omfattende et IL-7 polypeptid som beskrevet over, typisk et hyperglykosylert IL-7 polypeptid. Nærmere bestemt, medikament-substansen inneholdende mindre enn ca. 10% av ikke- eller monoglykosylert IL-7
- 30 polypeptid og/eller er i hovedsak fri for produktrelaterte urenheter.

Det beskrives en medikamentsubstans som beskrevet over for framstilling av et medikament (medikamentprodukt) eller farmasøytisk sammensetning.

- 5 Oppfinnelsen vedrører videre en farmasøytisk sammensetning omfattende en effektiv mengde av et IL-7 polypeptid eller sammensetning eller medikament- substans som beskrevet over og én eller flere farmasøytiske kompatible bærere eller eksipienter.
- 10 Et ytterligere aspekt med oppfinnelsen vedrører en framgangsmåte for å produsere et IL-7 polypeptid som beskrevet over, fra prokaryote eller eukaryote vertsceller, og likeledes en framgangsmåte for å detektere eller måle nærvær av et slikt IL-7 polypeptid i en prøve, eller for å karakterisere en prøve.
- 15 I et bestemt aspekt, framgangsmåten for å produsere et IL-7 polypeptid som definert over omfatter:
- a) dyrke en rekombinant vertscelle som definert over, og
  - b) samle IL-7 polypeptidet produsert fra nevnte celle.
- 20 I samsvar med en foretrukket utførelse utføres ekspresjon under betingelser som muliggjør at effektive glykosyleringsmotiver kan tilføyes til IL-7 polypeptidet, spesielt sialisk syreenheter.
- 25 I en ytterligere foretrukket utførelse utføres produksjonen i en mate-batch eller perfusjonsmodus som opprettholder cellene ved slutten av den eksponentielle vekstfase. Slike betingelser øker kvaliteten av post-translasjonsmodifiseringer og bidrar til en høyere grad av sialylering per IL-7 polypeptid. I samsvar med bestemte utførelser, de kodende nukleinsyrer omfatter et sekresjonssignal og/eller en optimalisert nukleinsyresekvens og/eller vertscellen er en eukaryotisk vertscelle (for eksem-
- 30 pel en mammalsk celle eller insektcelle eller gjærcele).

Et ytterligere formål med foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av et IL-7 polypeptid eller en hyperglykosylert IL-7 sammensetning, som definert over eller som oppnådd under framgangsmåte som beskrevet over, for framstilling av en farmasøytisk sammensetning for å bevirke eller modulere en immunrespons i et individ, spesielt for å indusere forlenget lymfopoiesestimulering og/eller forsterke en immunrespons.

Oppfinnelsen vedrører også anvendelse av et IL-7 polypeptid som definert over eller oppnådd med en framgangsmåte som beskrevet over, for framstilling av en farmasøytisk sammensetning for å hindre eller behandle en sykdom assosiert med en immunsvikt.

Som vil bli diskutert nedenfor, polypeptidene ifølge oppfinnelsen oppviser en forlenget plasma halveringstid og gjennomsnittlig oppholdstid, som fremmer *in vivo* reseptorinteraksjon og aktivitet, og/eller forbedrer stabilitet og/eller en mindre langtidsvirkende immunogenisitet, og muliggjør dermed deres anvendelse for å behandle en rekke patologiske tilstander i pattedyr, spesielt i mennesker.

#### KORT FORKLARING AV FIGURENE

20

Figur 1: Plasmid ph-pgk.EP7-hIL-7:

**ef1a pA**: "elongeringsfaktor 1 alfa" poly A sekvens; **hgh pA**: "human veksthormon" poly A sekvens ; **SpA**: syntetisk polyA sekvens ; **hph**: hygromycin resistens ; **Amp**: Ampicillin resistens ; **MAR kanin βglobin**: putativt kanin βglobin « Matrix tilfestingsregion » ; **pr. tk**: tymidin kinase promoter , **sv40 enh.**: sv40 enhancer ; **pr pgk**: fosfoglycerat kinase promoter; **5'UTRint1**: 5' ikke-translatert region omfattende et kimerisk intron (hBglobin-immunoglobulin); **EP7-hIL7**: optimalisert humant IL-7 cDNA oppstrøms fra EP7 signalpeptid.

30 Figur 2: Plasmid pBh-pgk.EP7-hIL-7 :

**Bcl2**: Bcl2 cDNA ; **IRES**: Indre ribosom inngangssete.

Figur 3: Ekspresjon av rekombinant hIL-7 i mammalske celler dyrket i bioreaktor fra dag 1 (D1) til dag 10 (D10) Western blot av intracellulær versus utskilt IL-7.

Figur 4: Kromatografisk fraksjonering av rec-hIL-7 glykoformer gjennom rensnings-  
 5 prosessen: SDS PAGE analyse av proteininnholdene i de forskjellige eluerings-  
 fraksjoner (B1-B10). IL-7 glykoformer ble separert både under opptaks- og HIC  
 trinnene. Buffergradienter ble anvendt for å differensielt eluere hIL-7 glykoformene i  
 samsvar med deres noe forskjellige fysiokjemiske egenskaper. Fraksjonering og  
 påfølgende seleksjon av adekvat fraksjon muliggjorde en anriking av den fullstendige  
 10 tre glykosylerte rekombinant hIL-7 (3 N- eller 2 N-assosiert med 1 O-sukkerenhet).  
 MWM, proteinmolekylvektmarkører (10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 37 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 ;  
 250kDa); B1-B10, elueringsfraksjoner; B1-B4, elueringsfraksjoner beholdt for  
 ytterligere rensing; CT, fraksjon B1 oppnådd fra en dyrking av HEK293 cellelinje  
 transfektert med den same optimaliserte hIL-7 cDNA.

15

Figur 5: Analyser av rensset rekombinant hIL-7 på SDS PAGE. Prøver av rensset  
 rekombinant hIL-7 ble applisert på SDS PAGE under reduserende betingelser.  
 Gelene ble detektert med:

20

- A. Coomassie farging
- B. Western blot

MWM: Molekylvektmarkører (10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 37 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 ; 250kDa).

Spor 1: HG-37-147 ; Spor 2: HG-40-104 ; Spor 3: HG-hIL-7 ; Spor 4: *E. coli* hIL-7.

25

Figur 6: Sammenlikne SDS-PAGE tilsynelatende molekylvekt av rensset glykosylert  
 rec-hIL-7 produkter.

Spor M = Molekylvektmarkør, spor 1 = skjematisk representasjon av rensset produkt  
 som beskrevet av Namen et al. i patent nr. US 5 328 988 (ca. 25 KDa),

30

spor 2 = CHO rec-sIL-7 produkt rensset av søker, spor 3 = CHO rec-hIL-7 produkt  
 rensset av søker, spor 4 = hIL-7 1N- og 2N-glykoformer som standard for

tilsynelatende molekylvektsammenlikning, spor 5 = *E.coli* rec-hIL-7 produkt rensset av søker (CYT 99 007).

Figur 7: Analyser av rensset rekombinant humant IL-7 på SDS PAGE under redu-  
5 serende betingelser etter deglykosylering.

Prøver av rensset rekombinant glykosylert humant IL-7 ble oppkuttet med PNGase F: Kinetiske prøver av 2 minutter til 24 t ble applisert på gel.

En annen prøve (OO/N) ble oppkuttet i løpet av 24 t med PNGase F + O-glykosi-  
10 dase/ $\beta$ (1-4)galaktosidase/neuraminidase/N-Acetylglukosaminidase. Som en kontroll ble glykosylert human IL-7 og *E.coli* human IL7 også applisert på gelen.

3N+1O, 2N+1O, 1N+1O, 1O glykoformer og deglykosylert human IL7 ble deretter separert i samsvar med deres MW estimert på gelen ved 33, 27, 24, 18 og 17 kDa, respektivt.

15

Figur 8: Massespektrumanalyser av forskjellige rensede rec-hIL-7 glykoformer.

- 23 kDa (23179 Da): Rec-hIL-7(CHO S,2N+3N)

- 25 kDa (25127 Da): Rec-hIL-7(CHO S,3N)

20 Figur 9: 2D elektroforeseanalyser av rensset rekombinant hyperglykosylert human IL-7 polypeptid. Etter isoelektrisk fokusering (pH-området 3-10), ble glykoformer separert på SDS PAGE under reduserende betingelser (farging med coomassie blue).

25 Figur 10: Massespektrumanalyser av rekombinant hIL-7 N-glykan kompleksitet. Renset glykosylert hIL-7 prøver ble enzymatisk oppkuttet med en endoglykosidase så som peptid-N-glykosidase F (PNGaseF, Roche). Frigjorte N-koblede oligo-sakkarider, frigjort proteinprøve med enzymatisk oppkutting ble separert fra peptidstrukturen og analysert med MALDI-TOF massespektrometri. M/z-verdiene  
30 korresponderende til hver topp ble søket mot internasjonale databaser som muliggjorde nøyaktig identifikasjon av panelet av N-glykaner på hIL-7 molekylet.

Figur 11: Karakterisering av O-glykaner på rekombinant hIL-7 ved anvendelse av spesifikke lektiner (lektin-blot). Etter separasjon av proteinprøvene og blotting til membran ble produktene identifisert med enten én av de to lektiner (MAA, fra *Maackia amurensis*, PNA, fra *Arachis hypogea*). Spor 1: Standard proteinfetuin, et sialilidert protein, spor 2, fetuin behandlet med en sialidase, spor 3, hIL-7, spor 4, hIL-7 behandlet med sialidase.

Figur 12: Lektinaffinitet av hyperglykosylert IL-7 polypeptid (ELISA-screening). Lektiner (LEA fra *Lycopersicon esculentum*, WGA fra *Triticum vulgare*, UEA.I fra *Ulex europeus*, MAA fra *Maackia amurensis*, ACA fra *Amaranthus caudatus*, AIA fra *Artocarpus intergrifolia*, ABA fra *Agaricus bisporus*, PHA.L fra *Phaseolus vulgaris*, - belagt plate anvendt for å binde identiske mengder av rekombinante rensete hIL-7 preparater. Mengde av IL-7, avhengig av lektinspesifisitet til glykanenhetene ble identifisert med en spesifikk anti hIL-7 antistoff (Ab) koblet til Biotin. Lektin-IL-7-Ab sandwich ble detektert med et streptavidin-peroksidase konjugat.

Figur 13: Bioanalyse av rekombinant humant IL-7 aktivitet. Doserrespons kinetikk av PB-1 cellevekst induert av ikke-glykosylert r-hIL-7 (uttrykt i *E.coli*) eller sterkt glykosylert r-hIL-7 (produsert i mammalske celler).

Figur 14: Bioanalyse av rekombinant human IL-7 aktivitet. Doserrespons kinetikkdata og kurver oppnådd rutinemessig i en typisk bioanalyse: PB-1 cellevekst ble induert av ikke-glykosylert r-hIL-7 (uttrykt i *E.coli*), sterkt glykosylert eller hyperglykosylert r-hIL-7 (produsert i mammalske celler). (Datapunktene representerer gjennomsnitt  $\pm$  SD av triplikate bestemmelser).

#### DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse vedrører hyperglykosylerte IL-7 sammensetninger, deres framstilling og anvendelse innen farmasøytisk industri. Foreliggende oppfinnelse, viser for første gang, at aktiviteten og/eller egenskapene av IL-7 kan forbedres avhengig av glykosyleringsprofilen til polypeptidet. Foreliggende oppfinnelse

beskriver også, overraskende og i motsetning til *in vitro* data, at den beste *in vivo* aktivitet kan oppnås med IL-7 polypeptider som har minst 2 til fortrinnsvis 3 okkuperte N-koblede glykosyleringsseter og et O-koblet glykosyleringssete og maksimert terminal sialylering av oligosakkaridenhetene. Foreliggende oppfinnelse  
5 beskriver også artifielt etablerte hyperglykosylerte IL-7 polypeptider, som oppviser forlenget aktivitet (og dermed muliggjør en redusert administreringsfrekvens), og/eller en redusert langtidsvirkende immunogenisitet. Ved vurdering av nytten av IL-7, kan slike polypeptider og sammensetninger representere sterkt verdifulle og nyttige aktive molekyler for anvendelse i regulering av en immunrespons i et individ,  
10 inkluderende i et menneske.

Et første formål med oppfinnelsen vedrører således hyperglykosylerte IL-7 sammensetninger.

15 Et ytterligere formål med oppfinnelsen vedrører anvendelse av hyperglykosylert IL-7 for framstilling av et medikament omfattende nevnte hyperglykosylert IL-7 og minst en farmasøytisk akseptabel bærer eller eksipient for behandling av et menneske.

Det beskrives en framgangsmåte for å forårsake eller stimulere en immunrespons i  
20 et individ, omfattende å administrere til individet en effektiv mengde av en hyperglykosylert IL-7 sammensetning.

Et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen vedrører anvendelse av en hyperglykosylert (og fortrinnsvis sterkt sialylert) IL-7 sammensetning for framstilling av et medikament  
25 for å forårsake eller stimulere en immunrespons i et individ.

#### IL-7 polypeptid

Innen konteksten av foreliggende oppfinnelse angir et "IL-7 polypeptid" et mammalsk (for eksempel humant, simiant, bovint, ekvin, feline eller canine) IL-7 polypeptid. Mer  
30 fortrinnsvis, IL-7 polypeptidet er et humant IL-7 polypeptid, spesielt for anvendelse som et terapeutikum eller vaksine. Alternativt, spesielt for anvendelse i ikke-humane primateseksperiment eller i veterinærapplikasjoner, kan IL-7 polypeptidet være et

annet enn mammalsk IL-7 polypeptider så som simian IL-7 polypeptid eller et canine polypeptid.

5 Foretrukne humane IL-7 polypeptider ifølge oppfinnelsen omfatter en aminosyre-sekvens som beskrevet i EP 314 415 eller i WO2004/018681 A2, og likeledes alle naturlige varianter og homologer derav. Sekvensen av human IL-7 er også tilgjengelig i genbanker. Det typiske villtypeprotein omfatter 152 aminosyrer og, valgfritt, en ytterligere N-terminal metioninenhet (SEQ ID NO: 1). Varianter derav inkluderer, mer foretrukket, naturlige alleliske varianter resulterende av naturlig polymorfisme, 10 inkluderende SNPer, spleisevarianter, *etc.* I en spesifikk utførelse menes termen IL-7 polypeptid å angi et polypeptid som har sekvensen SEQ ID NO: 1 eller naturlige varianter derav.

I en ytterligere utførelse er IL-7 polypeptidet et canine IL-7 polypeptid. I denne 15 sammenheng, beskriver oppfinnelsen, for første gang, sekvensen av et isolert IL-7 polypeptid, som representerer et ytterligere formål med denne søknad. Nærmere bestemt, oppfinnelsen vedrører et IL-7 polypeptid omfattende aminosyresekvensen avledet i SEQ ID NO: 7, og likeledes alle naturlige varianter, homologer eller distinktive fragmenter derav. Termen "varianter" eller "homologer" referer til polypeptider 20 som avviker fra SEQ ID NO: 7 med en deletering, substituering eller addisjon av én eller et begrenset antall aminosyrer. Fortrinnsvis viser slike homologer eller varianter en prosentandel identitet som er over 85%, fortrinnsvis over 90%, fortrinnsvis over 95%, mer fortrinnsvis mer enn 98% med SEQ ID NO: 7.

25 IL-7 polypeptider anvendt i foreliggende oppfinnelse er fortrinnsvis en rekombinant IL-7. Termen "rekombinant" som anvendt heri angir at polypeptidet er oppnådd eller avledet fra et rekombinant ekspresjonssystem, *det vil si* fra en kultur av vertsceller (*for eksempel* mikrobielle eller insekt eller plante eller mammalske) eller fra transgene planter eller dyr som er konstruert for å inneholde et nukleinsyremolekyl som 30 koder for et IL-7 polypeptid. "Mikrobiell" refererer til rekombinante proteiner framstilt i bakterielle ekspresjonssystemer. "Mammalsk" refererer til rekombinante glykoproteiner framstilt i mammalske ekspresjonssystemer. Som vil bli diskutert nedenfor,

alle disse vertsceller bør fortrinnsvis uttrykkes enten naturlig eller etter transgenese et egnet glykosyltransferase og/eller sialyltransferase gen. IL-7 polypeptidet kan også glykosyleres gjennom anvendelse av egnete *in vitro* eller *in vivo* glykosyltransferase og/eller sialyltransferase molekyler, eller ved innpoding av oligosakkaridstrukturer.

Et spesifikt eksempel på et humant IL-7 polypeptid er et polypeptid ifølge SEQ ID NO: 1 omfattende disulfidbroene Cys2-Cys92; Cys34-Cys129 and Cys47-Cys141.

Videre, IL-7 polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse kan omfatte sekvensen av et modent IL-7 polypeptid, eller ytterligere omfatte ytterligere aminosyreenheter, så som et sekresjonspeptid for eksempel. Foretrukne eksempler av slike sekresjonspeptider inkluderer, uten begrensning, et signalpeptid valgt blant gruppen omfattende EPO signalpeptid, SEAP signalpeptid, IgGkappa signalpeptid, Laktotransferin/vitronektin signalpeptid, VIP/vitronektin signalpeptid og cytotstatin bis signalpeptid. Sekvensen av disse signalpeptider er angitt, respektivt, i SEQ ID NO: 13 til 18. I en spesifikk utførelse er signalpeptidet et hybrid konstrukt framstilt av oppfinnerne, mellom sekvenser avledet fra EPO og IL-7 signalpeptidene. Sekvensen av dette signalpeptid, benevnt EPy7 eller EP7 er angitt i SEQ ID NO: 19 og representerer et bestemt aspekt av foreliggende oppfinnelse.

#### Hyperglykosylert IL-7 og sammensetninger

Innen konteksten av foreliggende oppfinnelse, termen "hyperglykosylert IL-7" angir et IL-7 polypeptid som har minst tre okkuperte glykosyleringssteder, *det vil si* som har minst tre glykosylerte aminosyreenheter.

Et "glykosyleringssete" angir aminosyreenheten eller regionen i et polypeptid som er subjekt for glykosylering, *det vil si* tilfesting av en karbohydratstruktur. Slike seter er typiske N-glykosyleringssteder (*det vil si* enhver aminosyreenhet eller region i et polypeptid som muliggjør tilfesting av en karbohydratstruktur gjennom N-kobling) og/eller O-glykosyleringssteder (*det vil si* enhver aminosyreenhet eller region i et polypeptid som muliggjør tilfesting av en karbohydratstruktur gjennom O-kobling).

Konsensussekvensene for glykosylerings seter er kjent *per se* innen fagfeltet. Som en illustrasjon, et konsensus N-glykolyserings sete har typisk følgende struktur: Asn-X-Ser/Thr, hvor X er enhver aminosyre med unntak av prolin. Som vil bli beskrevet nedenfor, slike glykosylerings seter kan være enten naturlig foreliggende innen et IL-7 polypeptidsekvens og/eller artifi sielt tilføyd eller etablert innen nevnte sekvens.

Termen "hyperglykosylert IL-7 sammensetning" angir en IL-7 sammensetning hvor minst 80% av IL-7 polypeptidene har minst tre okkuperte glykosylerings seter, *det vil si* har minst tre glykosylerte aminosyreenheter. Fortrinnsvis omfatter en slik sammensetning minst 80% IL-7 polypeptider som er glykosylert, i det minste ved tre N-glykosylerings sete(r), og valgfritt ved ett O-glykosylerings sete. En slik sammensetning er mest foretrukket fri for ikke-glykosylerte eller mono-glykosylerte IL-7 polypeptider, og omfatter således i det meste 20% bi-glykosylerte IL-7 polypeptider. I én foretrukket utførelse angir en hyperglykosylert IL-7 sammensetning en IL-7 sammensetning hvor minst 90% av IL-7 polypeptidene er glykosylert ved tre N-glykosylerings seter, og valgfritt ved ett O-glykosylerings sete. En slik sammensetning har mest fortrinnsvis ingen ikke-glykosylerte eller mono-glykosylerte IL-7 polypeptider, og omfatter således i det meste 10% bi-N-glykosylerte med eller uten mono-O-glykosylerte IL-7 polypeptider.

IL-7 primær aminosyresekvens omfatter tre putative N-glykosylerings seter, nemlig asparagin (Asn) enheter ved posisjon av 70, 91 og 116 (med respekt til human vill-typesekvens, se SEQ ID NO: 1). Videre, foreliggende oppfinnelse viser at IL-7 sekvensen også inneholder et O-glykosylerings sete, nemlig treonin (Thr) enheten ved posisjon 110. I én foretrukket utførelse er et hyperglykosylert IL-7 polypeptid ifølge oppfinnelsen et IL-7 polypeptid som har de ovennevnte tre N-glykosylerings seter okkupert assosiert eller ikke til et okkupert O-glykosylerings sete og en hyperglykosylert IL-7 sammensetning er en IL-7 sammensetning hvor minst 80% av IL-7 polypeptidene er glykosylert ved ovennevnte N-glykosylerings seter, og valgfritt også ved O-glykosylerings setet.

- I en foretrukket utførelse kan et hyperglykosylert IL-7 polypeptid omfatte ytterligere kunstig tilsatte eller etablerte glykosyleringssteder. Således, et hyperglykosylert IL-7 polypeptid ifølge oppfinnelsen er et IL-7 polypeptid som har minst tre N-glykosyleringssteder og et O-glykosyleringsstede okkupert, hvor nevnte steder er enten
- 5 naturlig forekommende og/eller kunstig tilsatt/etablert; og en hyperglykosylert IL-7 sammensetning er en IL-7 sammensetning hvor minst 80% av IL-7 polypeptidene er glykosylert ved fire glykosyleringsstede(r) i det minste, hvor nevnte steder er enten naturlig forekommende og/eller kunstig tilføyd/etablert.
- 10 I denne sammenheng, foreliggende oppfinnelse beskriver nå IL-7 polypeptider som har en modifisert aminosyresekvens, hvor nevnte sekvens omfatter minst et kunstig etablert glykosyleringsstede. I samsvar med bestemte utførelser omfatter IL-7 polypeptidene ifølge oppfinnelsen 1, 2, 3 eller 4 kunstig etablerte glykosyleringssteder, mer fortrinnsvis 1, 2 eller 3, enda mer foretrukket 1 eller 2.
- 15 De kunstig etablerte glykosyleringssteder er fortrinnsvis N-koblede glykosyleringssteder. Konsensus N-glykosyleringssteder har typisk følgende struktur: Asn-X-Ser/Thr, hvor X er enhver aminosyre med unntak av prolin.
- 20 Glykosyleringsstedene kan etableres eller tilføyes kjemisk fra sammenstilte syntetiske oligonukleotider eller ved anvendelse av flere teknikker inkluderende mutagenesemetoder ved forskjellige posisjoner innen IL-7 primær aminosyresekvens, og ved å følge teknikker kjent *per se* innen fagfeltet. På grunn av at den modifiserte IL-7 polypeptid skal opprettholde evnen til å binde til en IL-7 reseptor, må glykosylerings-
- 25 stede(r) mest fortrinnsvis etableres innen regionen(er) eller domene(r) av IL-7 polypeptidsekvensen som ikke forandrer evnen av IL-7 til å binde en IL-7 reseptor. Mer fortrinnsvis, stede(ene) introduseres på utsiden av alfa helikser av polypeptidet, fortrinnsvis også ikke i umiddelbar nærhet til glysinenheter. Foretrukket, de introduseres i den mest fleksible region, og unngår regioner som er mer rigid og viktige for
- 30 tertiær struktur av polypeptidet. Fortrinnsvis, etableringen av et glykosyleringsstede påvirker ikke noen cysteinheter involvert i disulfidbroer (*for eksempel* Cys 2, 34, 47, 92, 129 og 141), og heller ingen kritiske enheter involvert i interaksjonen av IL-7

polypeptidet med dets kognatreseptor (*for eksempel* Ser 19, Leu 23 og 77, Tyr 12, Val 15, Gln 22, Lys 81 og Glu 84), og heller ikke noen konservert enhet involvert i aktiviteten av polypeptidet (*for eksempel* Arg 133, Gln 136, Glu 137, Lys 139 og 144, Thr 140 og Asn 143). Glykosyleringssetene etableres typisk ved mutasjon, 5 delesjon eller addisjon av én eller flere aminosyreenheter i primærsekvensen av en referanse IL-7 polypeptid, for å etablere et typisk konsensus glykosyleringssete.

I én foretrukket utførelse vedrører foreliggende oppfinnelse IL-7 polypeptider omfattende sekvensen av et humant (eller mammalsk) IL-7 polypeptid omfattende én eller 10 flere aminosyremodifiseringer valgt blant Lys28Asn - Ile30Ser - Ile30Thr - Ile30Asn - Ser32Thr - Leu35Ser - Leu35Thr - Glu38Ser - Glu38Thr - Phe39Ser - Phe39Thr - Phe42Ser - Phe42Thr - Glu52Ser - Glu52Thr - Val82Asn - Glu84Thr - Glu84Ser - Lys97Asn - Arg99Thr - Arg99Ser - Ala102Asn - Leu104Thr - Leu104Ser - Leu104Asn - Glu106Thr - Glu106Ser - Leu128Ser - Leu128Thr - Ile145Asn - 15 Met147Thr - Met147Ser - Met147Asn - Thr149Ser (eller fra korresponderende posisjoner i andre mammalske IL-7 polypeptider).

Spesifikke eksempler på (humane) IL-7 polypeptider ifølge oppfinnelsen omfatter aminosyremodifiseringene beskrevet i tabell 1 nedenfor:

20

Tabell 1

IL-7 polypeptid analog	aminosyreforandringer
HG28a	Lys28Asn ; Ile30Ser
HG28b	Lys28Asn ; Ile30Thr
HG30	Ile30Asn ; Ser32Thr
HG33a	Leu35Ser
HG33b	Leu35Thr
HG36a	Glu38Ser
HG36b	Glu38Thr
HG37a	Phe39Ser
HG37b	Phe39Thr
HG40a	Phe42Ser

HG40b	Phe42Thr
HG50a	Glu52Ser
HG50b	Glu52Thr
HG82a	Val82Asn ; Glu84Ser
HG82b	Val82Asn ; Glu84Thr
HG97a	Lys97Asn ; Arg99Ser
HG97b	Lys97Asn ; Arg99Thr
HG102a	Ala102Asn ; Leu104Ser
HG102b	Ala102Asn ; Leu104Thr
HG104a	Leu104Asn ; Glu106Ser
HG104b	Leu104Asn ; Glu106Thr
HG126a	Leu128Ser
HG126b	Leu128Thr
HG145a	Ile145Asn ; Met147Ser
HG145b	Ile145Asn ; Met147Thr
HG147	Met147Asn ; Thr149Ser

De ovennevnte aminosyremodifiseringer etablerer N-glykosylerings seter uten å i vesentlig grad forandre bindingsaffinitet av IL-7, og etablerer dermed forbedrete IL-7 polypeptider i samsvar med foreliggende oppfinnelse.

5

Termen "uten i vesentlig grad å forandre bindingsaffinitet" angir at bindingsaffiniteten ikke forandres eller kan være noe redusert uten å ha en effekt på in vivo effektene resulterende fra interaksjon med reseptoren. Ved kvantifisering in vitro, kan bindingsaffiniteten være redusert med mindre enn 50%, fortrinnsvis mindre enn 40%, fortrinnsvis mindre enn 30%, fortrinnsvis mindre enn 20%, og fortrinnsvis mindre enn 5%.

10

Også, ovennevnte modifiseringer kan kombineres for å etablere flere ytterligere glykosylerings seter innen et IL-7 polypeptid ifølge oppfinnelsen. I denne forbindelse, oppfinnelsen vedrører et hvert biologisk aktivt IL-7 polypeptid som har den primære sekvens av (human eller mammalsk) interleukin-7 modifisert ved tilføyning av minst fra én til fire ytterligere (N-koblede) glykosylerings seter. En ytterligere foretrukket

15

utførelse av oppfinnelsen er et biologisk aktivt IL-7 polypeptid omfattende den primære sekvens av interleukin-7 omfattende ett eller to ytterligere (N-koblede) glykosyleringssteder.

- 5 Mest foretrukne IL-7 polypeptider ifølge oppfinnelsen er biologisk aktive, *det vil si* de er i stand til binding til en interleukin-7 reseptor og viser *in vitro* aktivitet i en spesifikk bioanalyse og/eller har en økt gjennomsnittlig oppholdstid (MRT) *in vivo*.

10 Sammenlikning av aktiviteter mellom den ikke-glykosylerte standard og den hyperglykosylerte IL-7 ble undersøkt i en dose-respons bioanalyseforsøk hvor en ED50-verdi korresponderer til en dosering lik til en halvpart av maksimal aktivitet. Hyperglykosylering fører vanligvis til redusert aktivitet i denne bioanalyse, som ikke overføres til en nedgang i *in vivo* aktivitet. I foreliggende situasjon, den utvidete kinetiske profil vil faktisk forbedre *in vivo* aktivitet.

15 Til tross for det faktum at ED50 ikke reflekterer aktiviteten av IL-7 *in vivo*, muliggjør det en sammenlikning mellom forskjellige prøver med det samme nivå av glykosylering. I denne ramme ble typiske ED50-verdier for en ikke-glykosylert standard varierende mellom 0,5 til 2,0 ng IL-7/ml mens hyperglykosylerte ED50-verdier var i  
20 området mellom 1,5 til 3,5 ng hyperglykosylert IL-7/ml.

De hyperglykosylerte IL-7 polypeptider ifølge oppfinnelsen viser en forbedret stabilitet, og en *in vivo* forlenget halveringstid og gjennomsnittlig oppholdstid i mammalske  
25 verter. Termen "forbedret stabilitet", "forlenget halveringstid og gjennomsnittlig oppholdstid" skal forstås sammenliknet med ikke-glykosylerte former. Fortrinnsvis er økningen i halveringstid minst ca. 3x, fortrinnsvis minst ca. 5 til 20x. Gjennomsnittlig oppholdstid (MRT) angir gjennomsnittet av oppholdstiden for hvert IL-7 molekyl i blodet i pasient etter innledende dosering. Fortrinnsvis, økningen i MRT er minst ca. 2x, eller fortrinnsvis minst ca. 4 til 10x sammenliknet med MRT av ikke-glykosylerte  
30 former.

For eksempel var plasma halveringstid for hyperglykosylert form vist å være i området 30 til 40 timer, mens plasma halveringstid for ikke-glykosylert form vanligvis er 5 til 8 timer (idet begge former administreres under samme betingelser, det vil si i én injeksjon, subkutanøst).

5

Gjennomsnittlig oppholdstid (MRT) var rundt 40 timer versus rundt 10 timer med den ikke-glykosylerte form.

10

Det skal forstås at oppfinnelsen også omfatter ethvert distinkt fragment av et IL-7 polypeptid ifølge oppfinnelsen, det vil si ethvert fragment som omfatter en aminosyremodifisering som beskrevet over, eller ethvert fragment som omfatter et artifielt etablert glykosyleringssete som beskrevet over. Slike fragmenter inneholder typisk minst 5 aminosyreenheter, typisk minst 8, 9, 10, 11, 12 eller 15 enheter, og kan inneholde opptil 20, 30, 40, 50 eller flere konsekutive aminosyreenheter. Slike

15

fragmenter kan anvendes som antagonister eller som immunogener, for å generere spesifikke antistoff.

Også, idet ovennevnte aminosyreposisjoner har blitt gitt med referanse til human IL-7 polypeptidsekvens, skal det forstås at foreliggende oppfinnelse også omfatter IL-7

20

polypeptider som har primærsekvensen av mammalsk IL-7 modifisert med homologe mutasjoner i mammalske sekvenser basert på sekvensalignment mot human sekvens.

En foretrukket utførelse av oppfinnelsen vedrører nye biologisk aktive IL-7 polypeptider omfattende én eller flere aminosyremodifiseringer valgt blant gruppen omfattende:

25

Phe39Ser - Phe39Thr- Phe42Ser - Phe42Thr - Leu104Asn - Glu106Thr -  
Glu106Ser - Leu128Ser - Leu128Thr - Met147Asn og en kombinasjon derav  
eller et distinkt fragment derav.

30

Mest foretrukne modifiserte IL-7 polypeptider ifølge oppfinnelsen er beskrevet i tabell 2 nedenfor:

Tabell 2

IL-7 polypeptid analog	aminosyreforandringer
HG37a	Phe39Ser
HG37b	Phe39Thr
HG40a	Phe42Ser
HG40b	Phe42Thr
HG104a	Leu104Asn ; Glu106Ser
HG104b	Leu104Asn ; Glu106Thr
HG126a	Leu128Ser
HG126b	Leu128Thr
HG147	Met147Asn ; Thr149Ser

Et ytterligere spesielt formål med oppfinnelsen er et hyperglykosylert IL-7 polypeptid omfattende en primær aminosyresekvens som beskrevet over.

#### Oligosakkaridenheter

Strukturen og antallet oligosakkaridenheter tilfestet til et bestemt glykosyleringssete i et hyperglykosylert IL-7 polypeptid ifølge oppfinnelsen kan varieres. Disse kan for eksempel være N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin, mannose, galaktose, glukose, fukose, xylose, glukuronisk syre, iduronisk syre og/eller sialiske syrer.

Mer fortrinnsvis, hyperglykosylerte IL-7 polypeptider omfatter (eller er anriktet i) N-koblete og/eller O-koblete karbohydratkjede(r) valgt blant:

- a) en mammalsk type sukkerkjede, fortrinnsvis av den type som uttrykkes av CHO-celler;
- b) en sukkerkjede omfattende en kompleks N-karbohydratkjede (*for eksempel* en triantenær eller biantenær struktur), mer fortrinnsvis inneholdende høy mannose og acetylglukosaminmolekyler og høy terminale sialiske syreenheter;
- c) en sukkerkjede omfattende en O-karbohydratkjede uten og fortrinnsvis med en terminal sialisk syreenhet;

- d) en sukkerkjede sialylert med alfa2,6-sialyltransferase eller alfa2,3-sialyltransferase; og/eller
- e) en sialylert sukkerkjede som framviser mellom 3 til 30 sialyl-N-acetylgalaktosamin, fortrinnsvis 7 til 23.

5

Spesielt foretrukne karbohydratkjede(r) omfatter en triantenær eller biantenær struktur med partiell eller komplett terminal sialylering. Ytterligere foretrukne karbohydratkjeder omfatter triantenære strukturer eller tri- eller bi-sialylering, og/eller en diantenær struktur med disialylering. Eksempler på slike karbohydrater er beskrevet i tabell 4, inkluderende motiver #2420, 2623, 2785 og 3092.

10

I samsvar med en ytterligere spesifikk utførelse har det hyperglykosylerte interleukin-7 polypeptid ifølge oppfinnelsen et gjennomsnittlig isoelektrisk punkt lavere enn 6,5 og en midlet tilsynelatende molekylvekt over 27 kDa, mellom 28 kDa og 65 kDa (teoretisk for en 7N + 1O glykosylering), fortrinnsvis mellom 28 kDa og 35 kDa (som vist for en 3N + 1O glykosylering), med gelelektroforese (bekreftet med Western blot), som er translatert til 25 kDa med massespektrometrianalyser.

15

I én bestemt utførelse produseres det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid ifølge oppfinnelsen med en mammalsk glykosyleringsmutant som stabilt uttrykker  $\alpha$ 2,6 sialyltransferase og presenterer en mangel i CMP-Neu5Ac hydrolaseaktivitet, fortrinnsvis en CHO glykosyleringsmutant. Slik glykosylering inkluderer typisk N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin, mannose, galaktose, glukose, fukose, xylose, glukuronisk syre, iduronisk syre og/eller sialiske syrer.

25

I en ytterligere utførelse produseres det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid med rekombinant teknologi i en human vertscelle, som kan utvelges blant humane stromale eller epitelcellelinjer, HEK-293 (human embryonisk nyre), HER (human embryonisk retina), HEK (human epidermal keratinocytter), human thymus eller human kortikale epiteliske cellelinjer, humane benmarg eller humane benmarg stromale cellelinjer.

30

Mest foretrukne hyperglykosylerte interleukin-7 polypeptider ifølge oppfinnelsen oppviser følgende egenskap(er):

- a) de har forbedret sekresjonsprofil og produksjonsrate i rekombinerte produktive cellelinjer; og/eller
- 5 b) de inneholder en høy grad av sialisk syreenheter per IL-7 polypeptid, som fører til redusert isoelektrisk punktverdi og til forbedret gjennomsnittlig oppholdstid; og/eller
- c) de er beskyttet fra intermolekylær aggregering; og/eller;
- d) de har redusert mottakelighet for proteolyse; og/eller
- e) de inneholder maskerte antigeniske seter, reflekterende redusert immunogenisk ulempe, redusert sårbarhet i forhold til APC (antigenpresenterende celler), fanging, 10 prosessering og presentering gjennom et MHCII molekyl; og/eller
- f) de har økt kjemisk stabilitet; og/eller
- g) de har en forlenget biologisk halveringstid *in vivo* (langtidsvirkende isoform av IL-7) sammenliknet med det ikke-glykosylerte mor-peptid; og/eller
- 15 h) de har en økt *in vivo* farmakologisk aktivitet sammenliknet med ikke-glykosylert mor-protein, for det meste på grunn av en bedre gjennomsnittlig oppholdstid (MRT); og/eller
- i) de muliggjør mindre hyppige doseringsregimer, fra tre/fire ganger i uken ned til to eller en gang i uken, eller en gang hver fjortende dag for de mer langtidsvirkende 20 produkter; og/eller
- j) de oppviser en forbedret farmakokinetisk profil ( redusert topp-konsentrasjon og forbedret gjennomsnittlig oppholdstid) og/eller
- k) de oppviser en midlet molekylvekt over 25 KDa som bestemt fra massespektrometrianalyser eller 27 KDa som bestemt fra SDS-PAGE analyser og et 25 gjennomsnittlig isoelektrisk punkt under 6,5.

Polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan være i form av en monomer, eller assosiert eller kompleksert med en bestemt utvalgt forbindelse. I denne sammenheng, i en foretrukket utførelse, IL-7 konformerer er assosiert til hepatocyt vekstfaktor ("HGF") 30 som en heterodimer. Heterodimeren kan oppnås kjemisk, med kompleksering eller med rekombinant teknologi (*det vil si* med genetisk fusjon).

I en annen foretrukket utførelse er IL-7 polypeptidet funksjonelt tilfestet til en Fc-porsjon av en IgG tungkjede, typisk gjennom et peptid hengselregion. Slike fusjonsmolekyler har potensielt økt stabilitet og halveringstid *in vivo*. IgG-enheten er mest foretrukket en human IgG1 eller IgG4.

5

I én ytterligere foretrukket utførelse er IL-7 polypeptidet funksjonelt assosiert til et humant serumalbumin ("HSA") eller en porsjon av en HSA, som et fusjonsprotein. Slike fusjonsmolekyler har potensielt økt stabilitet og forlenget halveringstid *in vivo*.

- 10 Et ytterligere objekt med foreliggende oppfinnelse er en hyperglykosylert IL-7 sammensetning. Slike sammensetninger omfatter fortrinnsvis minst 80%, fortrinnsvis mellom 80% og 95%, IL-7 polypeptider som er glykosylert på minst tre distinkte aminosyreenheter, som kan være naturlig foreliggende innen IL-7 polypeptidsekvensen (*for eksempel* konsensus N-koblet og O-koblet karbohydratseter) og/eller
- 15 artifielt etablerte glykosyleringssete(r) som beskrevet over.

I samsvar med en foretrukket, spesifikk utførelse vedrører oppfinnelsen hyperglykosylerte IL-7 sammensetninger omfattende:

- a) en hovedandel (>80%, fortrinnsvis mer enn 90%, mer fortrinnsvis mer enn ca. 20 95%) av interleukin-7 glykosylert på 3 konsensus N-koblet karbohydratseter (Asn 70/91/116) og ytterligere glykosylert eller ikke på 1 O-koblet karbohydratsete (Thr 110); fortrinnsvis, sammensetningen inneholder en mindre andel (<20%, fortrinnsvis mindre enn ca. 10%) av interleukin-7 glykosylert på 2 konsensus N-koblete karbohydratseter kun (assosiert eller ikke til 1 O-koblet
- 25 karbohydratsete) og/eller er i hovedsak fri for mono- eller ikke-glykosylert protein; eller
- b) en hovedandel (>80%, fortrinnsvis mer enn 90%, mer foretrukket mer enn ca. 30 95%) av en biologisk aktiv interleukin-7 analog, som har IL-7 primær aminosyresekvens modifisert for å introdusere et ytterligere sete for glykosylering, glykosylert på 4 N-koblete karbohydratseter og ytterligere glykosylert eller ikke på 1 O-koblet karbohydratsete (Thr 110); fortrinnsvis omfatter sammensetning en mindre andel av den samme analog (<20%, fortrinnsvis mindre enn ca.

10%) glykosylert på 3 eller 2 N-koblede karbohydratseter kun (assosiert eller ikke til 1 O-koblet hydratsete) og/eller er i hovedsak fri for mono- eller ikke-glykosylert protein; eller

- 5 c) en hovedandel (>80%, fortrinnsvis mer enn 90%, mer foretrukket mer enn ca. 95%) av en interleukin-7 biologisk aktiv analog, som har IL-7 primær aminosyresekvens modifisert for å introdusere to ytterligere seter av glykosylering, glykosylert på 5 N-koblede karbohydratseter og ytterligere glykosylert eller ikke på 1 O-koblet karbohydratsete (Thr 110); fortrinnsvis inneholder sammensetningen en mindre andel av den samme analog (<20%, fortrinnsvis mindre
- 10 enn ca. 10%) glykosylert på 4, 3 eller 2 N-koblede karbohydratseter kun assosiert eller ikke til 1 O-koblet karbohydratsete og/eller er i hovedsak fri for mono- eller ikke-glykosylert protein; eller
- 15 d) en hovedandel (>80%, fortrinnsvis mer enn 90%, mest foretrukket mer enn ca. 95%) av en interleukin-7 biologisk aktiv analog, som har IL-7 primær aminosyresekvens modifisert for å introdusere tre ytterligere seter av glykosylering, glykosylert på 6 N-koblede karbohydratseter og ytterligere glykosylert eller ikke på 1 O-koblet karbohydratsete (Thr 110); fortrinnsvis inneholder sammensetningen en mindre andel av den samme analog (<20%, fortrinnsvis mindre
- 20 enn ca. 10%) glykosylert på 5, 4, 3 eller 2 N-koblede karbohydratseter kun assosiert eller ikke til 1 O-koblet karbohydratsete og/eller er i hovedsak fri for mono- eller ikke-glykosylert protein; eller
- 25 e) en hovedandel (>80%, fortrinnsvis mer enn 90%, mer foretrukket mer enn ca. 95%) av en interleukin-7 biologisk aktiv analog, som har IL-7 primær aminosyresekvens modifisert for å introdusere fire ytterligere seter for glykosylering, glykosylert på 7 N-koblede karbohydratseter og ytterligere glykosylert eller ikke på 1 O-koblet karbohydratsete (Thr 110); fortrinnsvis inneholder sammensetning en mindre andel av den samme analog (<20%, fortrinnsvis mindre
- 30 enn ca. 10%) glykosylert på 6, 5, 4, 3 eller 2 N-koblede karbohydratseter kun assosiert eller ikke til 1 O-koblet karbohydratsete og/eller er i hovedsak fri for mono- eller ikke-glykosylert protein.

Oppfinnelsen vedrører også farmasøytiske sammensetninger omfattende ovennevnte sammensetninger som den aktive substans.

### Nukleinsyrer

5 Det beskrives videre et nukleinsyremolekyl som koder for et IL-7 polypeptid som diskutert over. Nukleinsyremolekylet kan være ethvert DNA eller RNA molekyl, typisk et cDNA molekyl.

10 Det beskrives spesifikt en nukleinsyre omfattende nukleotidenheter 79 til END av SEQ ID NO: 2, og likeledes distinktive fragmenter og komplementære tråder derav.

15 Det beskrives videre en nukleinsyre omfattende SEQ ID NO 4, og likeledes ethvert distinkt fragment derav, varianter derav (som har minst 90% identitet med SEQ ID NO: 4), og den komplementære tråd derav.

20 Det beskrives en nukleinsyre omfattende SEQ ID NO: 6, og likeledes ethvert distinkt fragment derav, varianter derav (som har minst 90% identitet med SEQ ID NO: 6) og den komplementære tråd derav. Det beskrives ytterligere en nukleinsyre omfattende SEQ ID NO: 6, og likeledes ethvert distinkt fragment derav, varianter derav (som har minst 90% identitet med SEQ ID NO: 6) og den komplementære tråd derav. Et spesifikt objekt av oppfinnelsen er en nukleinsyre omfattende nukleotidenheter 79 til END av SEQ ID NO: 6, og likeledes varianter derav (som har minst 90% identitet med SEQ ID NO: 6) og den komplementære tråd derav.

25 Oppfinnelsen omfatter også et polypeptid kodet for slike sekvenser (for eksempel SEQ ID NO: 7).

30 Termen "variant" som anvendt ovenfor i relasjon til en nukleinsyre angir mer spesifikt en nukleotidsekvens som produserer til referansesekvens under stringente betingelser og/eller koder for et polypeptid som har den samme type aktivitet som polypeptidet som kodes for av referansesekvensen. Mest foretrukne varianter oppviser minst mellom 92 og 99% (for eksempel 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99%) identitet med referansesekvensen.

Et ytterligere spesifikt objekt av oppfinnelsen er en nukleinsyre omfattende sekvensen av:

CTG AAT AAC GAA ACT AAC SEQ ID NO: 8

5 AAC TTC ACT AAG SEQ ID NO: 9

GCC AAC GGT ACC SEQ ID NO: 10

CTG AAC GAC AGC TGT SEQ ID NO: 11, or

ATC TTG AAC GGG SEQ ID NO: 12, eller en kombinasjon derav.

10 Spesifikke eksempler på nukleinsyrer omfatter nukleotidsekvensene som angitt i en av SEQ ID NO: 8 til 12.

Det beskrives en kloning- og/eller ekspresjonsvektor omfattende et nukleinsyremolekyl som definert over. Vektoren kan være enhver av prokaryote eller eukaryote vektorer, typisk en eukaryot vektor og kan velges fra et plasmid, kosmid, viral vektor, artifielt kromosom, *etc.* Vektoren kan omfatte enhver regulatorisk sekvens som muliggjør egnet ekspresjon av den kodende nukleinsyre i en utvalgt vertscelle, *for eksempel* en promotor, terminator, polyA, replikasjonsorigo, integreringsregion (*for eksempel* homolog region), intron, UTR-sekvenser, markørgen, *etc.*

20

Det beskrives en ekspresjonsvektor omfattende et nukleinsyremolekyl som definert over, inkluderende et signalpeptid, funksjonelt koblet til regulatoriske elementer som muliggjør ekspresjon av nevnte nukleinsyre i en mammalsk vert eller vertscelle.

25

Foretrukne regulatoriske elementer inkluderer en promotor, som kan utvelges, uten begrensning, fra virale, cellulære og syntetiske promotorer, inkluderende konstitutive, vevsspesifikke eller regulerte promotorer, spesielt fra gruppen omfattende CMV-promoter, E1Fa-promotor og metallotionein promotor. Ytterligere regulatoriske elementer kan være inneholdt i vektorene ifølge oppfinnelsen og inkluderer, uten begrensning, et Bcl-2 gen, UTR-sekvenser og MAR-sekvenser.

30

I en foretrukket utførelse er vektoren en episomisk ekspresjonsvektor.

De ovennevnte nukleinsyrer og vektorer kan anvendes for eksempel for å produsere rekombinante mammalske IL-7 polypeptider i forskjellige kompetente verter eller  
5 vertsceller og likeledes for genterapiformål.

Det beskrives en rekombinant vertscelle omfattende en nukleinsyre eller en vektor som beskrevet over. En slik rekombinant celle kan være prokaryot eller, mer fortrinnsvis eukaryot, så som en gjær, insekt, plante eller mammalsk celle, for  
10 eksempel.

I én foretrukket utførelse er vertscellen en mammalsk celle, fortrinnsvis valgt blant PERC6, NSO-celler og BHK-celler, fortrinnsvis CHO-celler; eller en human cellelinje. Vektorene, konstruktene og de rekombinante celler vil bli beskrevet i mer detalj, men  
15 er ikke begrenset til, et underavsnitt i denne søknad.

#### Medikamentsubstans og farmasøytiske sammensetninger

Det beskrives en medikamentsubstans omfattende som et ønsket produkt, et IL-7 polypeptid som beskrevet over, typisk et hyperglykosylert IL-7 polypeptid. Mer  
20 fortrinnsvis, medikamentsubstansen inneholder mindre enn ca. 10% ikke- eller mono-glykosylert IL-7 polypeptid og/eller er i hovedsak fri for produktrelaterte urenheter.

En medikamentsubstans som beskrevet over anvendes for framstilling av et  
25 medikament ("medikamentprodukt") eller farmasøytisk sammensetning.

En foretrukket medikamentsubstans er videre i hovedsak fri for prosessrelaterte urenheter.

30 Innen konteksten av foreliggende oppfinnelse refererer termen "medikament-substans" til et produkt egnet for anvendelse som et aktivt prinsipp i et medikament. "Medikamentsubstans" i samsvar med oppfinnelsen er, av natur, et komplekst

produkt, *det vil si* som et resultat av dets framstillingsmetode (*for eksempel* rekombinant DNA teknologi).

5 Foreliggende oppfinnelse beskriver nå at, for å produsere effektive terapeutiske og vaksineforbedringseffekter, bør en IL-7 medikamentsubstans eller farmasøytisk sammensetning inneholde, som en hovedmolekylform, en hyperglykosylert IL-7 polypeptidsammensetning.

10 Termen "i hovedsak fri" som anvendt heri, indikerer at medikamentsubstansen inneholder ingen signifikant eller skadelig mengde av produktrelaterte urenheter og prosessrelaterte urenheter. Nærmere bestemt, medikamentsubstansen bør inneholde mindre enn 5%, mer fortrinnsvis mindre enn 3%, enda mer foretrukket mindre enn 2% av produktrelaterte urenheter og prosessrelaterte urenheter. De fleste foretrukne medikamentsubstanser inneholder mindre enn 1% produktrelaterte urenheter og kun spormengder av prosessrelaterte urenheter.

IL-7 produktrelaterte substanser angir IL-7 molekylvarianter, som inkluderer for eksempel, aktive eller ikke-aktive peptid- eller polypeptidfragmenter av IL-7.

20 IL-7 relaterte urenheter inkluderer for eksempel humane IL-7 polypeptider omfattende mono- eller disulfid broer, trunkert IL-7, deamidert rekombinant IL-7, dimerisk eller multimerisk protein omfattende IL-7, oksidert metionin form eller en kombinasjon derav.

25 Uansett deres biologiske aktivitet, disse IL-7 molekylvarianter og IL-7 relaterte urenheter bør strengt begrenses, eller kastes fra medikamentsubstansen.

Prosessrelaterte urenheter inkluderer for eksempel DNA, endotoksiner, celledbris, virus *etc.*

30

En foretrukket medikamentsubstans er således en medikamentsubstans hvor den totale mengde, basert på vekt, av en hyperglykosylert IL-7 sammensetning omfatter

minst 95% basert på vekt, fortrinnsvis minst 98% basert på vekt, mer fortrinnsvis minst 99,5% basert på vekt av hyperglykosylert IL-7 sammensetning i samsvar med oppfinnelsen.

- 5 Oppfinnelsen vedrører også en farmasøytisk sammensetning omfattende en effektiv mengde av en medikamentsubstans eller hyperglykosylert IL-7 sammensetning som beskrevet over og én eller flere farmasøytisk kompatible eller akseptable bærere, eksipienter eller fortynningsmidler.
- 10 Oppfinnelsen viser at farmasøytiske sammensetninger omfattende en hyperglykosylert IL-7 sammensetning som beskrevet over klart øker vaksineegenskapene til IL-7 og dets kapasitet til å stimulere antigenspesifikke immunresponser.

Det farmasøytisk kompatible eller fysiologisk akseptable bærer, eksipient eller  
15 fortynningsmiddel kan velges fra nøytrale til svakt sure, isotoniske, bufret saltløsning, løsninger eller suspensjoner og mer foretrukket fra sukrose, trehalose og aminosyre. Den farmasøytisk akseptable bærer er fortrinnsvis inneholdt i en egnet buffer for å danne isotonløsning. En egnet buffer har fortrinnsvis et pH-område mellom 4,5 og 7,5, fortrinnsvis 5,0 til 7,0, enda mer foretrukket ca. 5,5 og er fortrinnsvis  
20 et organisk salt valgt blant en natriumcitratbuffer eller en ammoniumacetatbuffer. Den farmasøytiske sammensetning kan være i form av en suspensjon, løsning, gel, pulver, faststoff, *etc.* Sammensetningen er fortrinnsvis en væskeform.

Sammensetningen kan omfatte stabiliserende midler, så som sukker, aminosyrer,  
25 proteiner, surfaktanter, *etc.* Sammensetningen kan omfatte enhver saltløsning, inkluderende fosfater, klorid, *etc.*

En foretrukket farmasøytisk sammensetning i samsvar med oppfinnelsen omfatter, i tillegg til den aktive medikamentsubstans, et protein og/eller en surfaktant. Nærvær  
30 av et protein, eller ethvert annet høymolekylvektmolekyl av naturlig opprinnelse, reduserer eksponering av IL-7 til vertimmunsystemet og unngår dermed sekundære effekter. Mer foretrukket, proteinet er ikke-immunogenisk i individet, så som ethvert

protein av human opprinnelse. Et mest foretrukket eksempel av protein er human serumalbumin. Surfaktanten kan utvelges fra kjente surfaktanter så som polysorbatproduktene, fortrinnsvis Tween20<sup>TM</sup> eller Tween80<sup>TM</sup>. En spesifikk sammensetning av denne oppfinnelse omfatter humant serumalbumin (fortrinnsvis 2 til 5 mg/ml) eller polysorbat (Tween20 eller 80 (typisk 0,005%)) eller enhver annen substans så som en tensioaktiv substans eller aminosyre (*for eksempel* arginin, glutamat eller en blanding av arginin og glutamat) eller sukker (*for eksempel* sukrose, terhalose, sorbitol), i stand til å hindre IL-7 immunogenisitet på grunn av proteinaggregering og/eller lokal utholdenhet av medikamentproduktet ved injeksjonsstedet etter administrering av sammensetningen.

I denne sammenheng, foretrukne objekter av foreliggende oppfinnelse vedrører farmasøytiske sammensetninger inneholdende en hyperglykosylert interleukin-7 sammensetning i en konsentrasjon av ca. 1 mg/ml til 50 mg/ml, fortrinnsvis ca. 3 mg/ml til 20 mg/ml. Foretrukket, den effektive mengde av glykosylert interleukin-7 som administreres omfatter mellom ca. 10 til 200 µg/kg/uke, fortrinnsvis mellom ca. 10 til 60 µg/kg/uke, for behandling eller hindring av infeksjøs sykdommer.

I lys av de forbedrede egenskaper av polypeptidene og sammensetningene ifølge oppfinnelsen, trenger de farmasøytiske sammensetninger å administreres mindre hyppig enn sammensetninger ifølge teknikkens stilling eller produkter i en ekvivalent mengde for å oppnå sammenliknbare terapeutiske effekter. Nærmere bestemt, i en typisk utførelse, sammensetningene administreres 3 ganger per uke, 2 ganger per uke, én gang per uke, én gang annenhver uke, én gang i måneden, én eller to før vaksinerings eller før og etter vaksinerings. Et foretrukket doseringsregime omfatter administrering av det farmasøytiske sammensetning en gang hver 7, 10 eller 14 dager.

Foretrukne administrasjonsruter er parenterale ruter. Den parenterale rute er fortrinnsvis intra-tumoral, mer fortrinnsvis intravenøs eller en subkutanøs administrering. Det inkluderer også intraartiell, intraperitoneal eller intramuskulære

injeksjoner. Det skal forstås, imidlertid, at enhver annen egnet administreringsrute kan vurderes avhengig av helsestatus og reaktiviteten til pasienten.

I en foretrukket utførelse er administrasjonsruten den orale rute. Sammenliknet med andre polypeptidhormoner er den orale rute faktisk akseptabel for hyperglykosylert IL-7 på grunn av den eksepsjonelle stabilitet av dette protein. Sammensetninger ifølge oppfinnelsen er derfor fortrinnsvis i en faststofform, så som en tablett eller et pulver eller en kapsel, eller i form av en væske som en sirup eller en emulsjon, framstilt i en egnet farmasøytisk akseptabel bærer. Fortrinnsvis er bæreren selv stabil i den gastrointestinale trakt og i sirkulasjonssystemet og oppviser en akseptabel plasma halveringstid.

Gastriske syrer resistente kapsler, så som gastriske syrer resistente kapsler inneholdende en mikroemulsjon eller liposomformulering av hyperglykosylert IL-7 polypeptid er foretrukket.

Den farmasøytiske sammensetning kan omfatte ytterligere aktive ingredienser så som immunstimulerende midler, fortrinnsvis valgt blant hematopoietiske cellevekstfaktorer, et cytokin, et antigenisk molekyl (eller antigen) og en adjuvant, for kombinert, separat eller sekvensvis anvendelse.

Slike ytterligere aktive ingredienser kan formuleres i kombinasjon med IL-7, eller separat, for kombinert, separat eller sekvensvis anvendelse. I en første variant formuleres de aktive ingredienser sammen, i det samme resipient eller kar. I en annen, foretrukket utførelse, kondisjoneres de separat, *det vil si* i forskjellige kar eller resipienter. I samsvar med denne utførelse, ingrediensene kan administreres separat, *for eksempel* samtidig eller sekvensvis (*for eksempel* ved forskjellige injeksjonssteder eller ved forskjellige tidspunkt), for å produsere den mest effektive biologiske effekt. Videre, som nevnt over, repeterte administreringer av én eller to aktive ingredienser kan utføres.

I denne sammenheng, oppfinnelsen vedrører en farmasøytisk sammensetning omfattende en hyperglykosylert IL-7 sammensetning som beskrevet over og en aktiv ingrediens som er valgt blant immunstimulant og et antigenisk molekyl, for kombinert, separat eller sekvensvis anvendelse. Adjuvanter formuleres fortrinnsvis separat.

Den hematopoietiske cellevekstfaktor er fortrinnsvis valgt blant stamcellefaktor (SCF), fortrinnsvis den løselige form eller SCF, G-CSF, GM-CSF, Flt-3-ligand, IL-15 og IL-2. Typiske eksempler på cytokiner eller kemokiner for vaksineforsterkning inkluderer cytokiner som induserer og/eller stimulerer en Th1-type immunrespons. Cytokinet er fortrinnsvis valgt blant  $\alpha$ - eller  $\gamma$ -interferon, IL-2, IL-12, RANTES, B7-1, MIP-2 og MIP-1 $\alpha$ . Det skal forstås at andre faktorer så som NK-celleaktivatorer og/eller NKT-celleaktivatorer, FGF7 eller FGF10, interleukiner og/eller hormoner kan anvendes i kombinasjon med IL-7 for å tilveiebringe ytterligere terapeutiske fordeler.

En spesifikk sammensetning ifølge oppfinnelsen omfatter en hyperglykosylert IL-7 sammensetning som beskrevet over og stamcellefaktor, fortrinnsvis den løselige formen derav, IL-15 og/eller Flt3-ligand og/eller FGF10.

En ytterligere spesifikk sammensetning ifølge oppfinnelsen omfatter en hyperglykosylert IL-7 sammensetning som beskrevet over og et cytokin valgt blant  $\alpha$ - eller  $\gamma$ -interferon, IL-2, IL-12, RANTES og MIP-1 $\alpha$ .

Et ytterligere spesifikk sammensetning ifølge oppfinnelsen omfatter en hyperglykosylert IL-7 sammensetning som beskrevet over, en stamcellefaktor og et cytokin.

Som angitt over, den farmasøytiske sammensetning kan ytterligere omfatte én eller flere antigener (eller antigeniske molekyler), for kombinert, separat eller sekvensvis anvendelse. Antigenet kan være ethvert syntetisk eller naturlig peptid, et rekombinant protein, et drept, inaktivert eller attenuert patogen produkt, en mikroorganisme, en parasitt, et lipid, *etc.*, en porsjon derav og en kombinasjon derav. Antigenet kan være et helt protein, eller ethvert epitop-inneholdende fragment eller porsjon derav,

fortrinnsvis peptider som presenteres til immunsystemet gjennom MHC klasse I eller MHC klasse II molekyler. Antigenet kan være ethvert viralt antigen, bakterielt antigen, parasitt antigen, tumorantigen, *etc.* Spesifikke eksempler på antigener inkluderer antigener avledet fra HIV, Varicella Zoster virus, influensa virus, Epstein Barr virus, type I eller II Herpes Simplex virus, human cytomegalovirus, Dengue virus, Hepatitis A, B, C, D eller E virus, Syncytium respirasjonsvirus, human papillomavirus, mycobacterium tuberculosis, toksoplasma og klamydia.

10 Et foretrukket objekt med foreliggende oppfinnelse vedrører en sammensetning omfattende en hyperglykosylert IL-7 sammensetning som beskrevet over og et antigenisk molekyl, for kombinert, separat eller sekvensvis anvendelse. Sammensetningen kan ytterligere omfatte ett eller flere immunstimulerende midler som beskrevet over, for kombinert, separat eller sekvensvis bruk.

15 Et ytterligere objekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører en farmasøytisk sammensetning omfattende hyperglykosylert IL-7 sammensetning som beskrevet over, hvor nevnte farmasøytiske sammensetning administreres samtidig, noen få dager før eller sekvensvis med én eller flere antigeniske molekyler for å oppnå og/eller stimulere en antigenspesifikk immunrespons i et individ.

20 Det beskrives også en framgangsmåte for å forårsake eller forsterke en antigenspesifikk immunrespons i et individ, omfattende å administrere til et individ nevnte antigen (eller et epitop-inneholdende fragment derav) og en hyperglykosylert IL-7 sammensetning som beskrevet over. Sammensetningen kan administreres samtidig, noen få dager før eller sekvensvis med, og mer fortrinnsvis før nevnte antigen for å oppnå og/eller stimulere en antigenspesifikk immunrespons i et individ.

I en ytterligere foretrukket utførelse omfatter sammensetningen ifølge oppfinnelsen en adjuvant. Adjuvanten kan utvelges fra enhver substans, blanding, løsning eller sammensetning som fremmer eller øker immunogenisiteten av et antigen og som er i stand til å indusere en Th1-type immunrespons, så som CpG, QS21, ISCOM og monofosforyl lipid A. Slike adjuvanter er spesielt egnet for å produsere og/eller

forsterke en spesifikk immunrespons mot antigen(er) i mammalske individer, spesielt i mennesker. Adjuvanten kondisjoneres fortrinnsvis og administreres separat fra den IL-7 inneholdende sammensetning og/eller ved et distinkt injeksjonssted, fortrinnsvis med de(t) antigen(er).

5

Foreliggende oppfinnelse vedrører også en farmasøytisk sammensetning omfattende en effektiv mengde av en human glykosylert IL-7 sammensetning i samsvar med oppfinnelsen i samblanding med et egnet fortynningsmiddel, eksipient eller bærer, for parenteral administrering til et menneske for profylaktisk eller terapeutisk stimulering av B- eller T-lymfocytutvikling og proliferasjon, eller for forsterking av en immunrespons. De farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen induserer en forlenget lymfopoiesestimulering og/eller forsterkede immunresponser.

10

En farmasøytisk sammensetning i samsvar med oppfinnelsen kan også anvendes i et menneske for profylaktisk eller terapeutisk stimulering av B- eller T-lymfocytutvikling og proliferasjon, for forsterking av global og/eller spesifikk immunrekonstitusjon, eller for forsterking av humoral og/eller cellulære immunresponser.

15

En foretrukket farmasøytisk sammensetning i samsvar med oppfinnelsen er for anvendelse for å hindre eller redusere opportunistiske infeksjoner i immunreduserte pasienter.

20

En ytterligere foretrukket farmasøytisk sammensetning i samsvar med oppfinnelsen er for anvendelser for å forlenge lymfopoiese stimulering og/eller for å produsere spesifikk immunrespons ikke kun mot dominante epitoper, men også mot subdominante eller mindre immunogeniske epitoper, epitoper som har en lavere affinitet for T-cellereseptoren, som vil muliggjøre å øke repertoaret av en spesifikk immunrespons i humane pasienter.

25

Oppfinnelsen er spesielt egnet for å produsere en preventiv eller lindrende immunrespons i individer, så som immunsviktpasienter, cancerpasienter, pasienter som

30

undergår innpodinger, pasienter infisert med et virus eller en parasitt, eldre pasienter eller alle pasienter som har lave CD4-tall *etc.*

Spesifikke og foretrukne anvendelser av IL-7 polypeptidene og sammensetningene

5 ifølge oppfinnelsen inkluderer anvendelsen:

- som en vaksineforsterker (administrering av nevnte sammensetning før, under eller i hovedsak samtidig med administrering av antigen) i en mengde effektiv til å indusere forsterkning av spesifikk immunrespons mot maligne celler eller infeksiose midler; og
- å indusere immunrekonstituering for pasienter av enhver opprinnelse; infeksiose, bestrålinger, transplantasjoner (BMT, SCT) eller medikamenter:

10

IL-7 polypeptidene og sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan anvendes enten alene eller i kombinasjon med andre aktive ingredienser, så som lymfopoietiske faktorer inkluderende, uten begrensning, SCF, Flt3-L,  $\alpha$ -IFN,  $\gamma$ -IFN, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-15, IL-18 og/eller IL-21. Idet kombinert terapi anvendes kan forskjellige ingredienser administreres samtidig, separat eller sekvensvis, og kan være kondisjonert sammen eller separat.

20

IL-7 polypeptidene og sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan anvendes i forskjellige områder, inkluderende for å forsterke vaksinerings innen feltet animalsk helse og for å minimere antallet aktive administreringer av substans.

25

Det beskrives en framgangsmåte for å behandle en virusinfeksjon, så som HIV-infeksjon, viral hepatitt, West Nile feber, Dengue, hvor framgangsmåten omfatter å administrere til en infisert pasient, en hyperglykosylert IL-7 polypeptidsammensetning.

30

I én foretrukket utførelse administreres det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid i forbindelse med et interferonmolekyl. Interferonmolekylet kan for eksempel være alfa

IFN (leukocyt IFN), beta IFN (fibroblast IFN), gamma IFN (immun IFN), omega IFN eller tau IFN (tropoblastisk faktor).

5 Det beskrives videre framgangsmåter for å forbedre en tymopoietisk rekonvalesens i immunutsatte individer, hvor framgangsmåten omfatter å administrere til et immunkompromittert individ, en hyperglykosylert IL-7 polypeptidsammensetning.

10 Fortrinnsvis administreres deretter den hyperglykosylerte IL-7 polypeptid i forbindelse med en keratinocyt vekstfaktor, en stamcellefaktor, en gonadostimulin antagonist eller et veksthormon.

15 Det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid kan også anvendes i en framgangsmåte for å tilveiebringe en terapeutisk immunisering mot maligne celler, virus eller bakterier, hvor det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid administreres i forbindelse med et antigen eller en blanding av antigen, for eksempel de som er beskrevet over. I denne situasjon kan det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid ytterligere administreres i forbindelse med GM-CSF.

20 Det beskrives videre en framgangsmåte for *ex vivo* forsterket ekspansjon av T-celler, hvor framgangsmåten omfatter å sette T-cellene i forbindelse med et hyperglykosylert IL-7 polypeptid eller sammensetning, for dermed å forbedre ekspansjon av T-cellene. Denne framgangsmåte er spesielt nyttig for å framstille T-celler egnet for å behandle pasienter med cancer eller virusinfeksjon ved adoptiv immunterapi. Adoptiv immunterapi er en *ex vivo* metode for selektiv ekspansjon av spesifikke T-celler målrettet for spesifikke antigen (maligne eller virale). Denne immun-  
25 terapeutiske teknikk inkluderer generelt isolering av Ag-spesifikke T-lymfocytter fra helblod fra en pasient, *ex vivo* ekspansjon av disse T-celler ved anvendelse av IL-7 polypeptid, valgfritt *ex vivo* aktivering av disse T-celler med andre cytokiner og administrering til pasienten. Andre teknikker er også mulig. IL-7 polypeptider  
30 forbedrer overlevelse av disse T-cellepopulasjoner som ytterligere viser en forbedret cytotoxisk aktivitet.

### Produksjonsmetoder og midler

Et ytterligere aspekt med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe egnete konstrukter og framgangsmåter for å produsere ovennevnte sammensetninger, spesielt ovennevnte hyperglykosylerte IL-7 polypeptider, sammensetninger og medikamentsubstanser, i tilstrekkelige mengder og kvalitet for farmasøytisk anvendelse derav.

Spesielt, som diskutert ovenfor, tilveiebringer foreliggende oppfinnelse vektorer og likeledes rekombinante vertsceller som kan anvendes for å produsere rekombinante humane IL-7 polypeptider ifølge oppfinnelsen i forskjellige kompetente vertsceller, og likeledes for genterapiformål.

Vektoren kan være et plasmid, virus, fag, kosmid, episom, *etc.* Foretrukne vektorer er virale vektorer (*for eksempel* rekombinante adenovirus) og plasmider, som kan produseres basert på kommersielle tilgjengelige strukturer så som pBR, pcDNA, pUC, pET, pVITRO *etc.* Vektoren omfatter typisk regulatoriske elementer eller sekvenser for å regulere eller mediere ekspresjon av et IL-7 polypeptid. De regulatoriske sekvenser kan velges blant promotorer, forsterkere, silencere, vevspesifikke signaler, peptidsignaler, intron, terminatorer, polyA-sekvenser, GC-regioner, *etc.*, eller en kombinasjon derav. Slike regulatoriske elementer eller sekvenser kan være avledet fra mammalske, fungale, plante, bakterielle, gjær, bakteriofag eller virale gener, eller fra artifisielle kilder. Nyttige promoterer for prokaryot ekspresjon (så som *E. coli*) inkluderer T7 RNA polymerase promotor (pT7), TAC promotor (pTAC), Trp-promotor, Lac-promotor, Tre-promotor, PhoA-promotor for eksempel. Egnete promotorer for ekspresjon i mammalske celler inkluderer virale promotorer (*for eksempel* CMV, LTR, RSV, SV40, TK, pCAG, *etc.*), husdyrgenpromotorer (*for eksempel* E1 $\alpha$ ,  $\beta$ actin fra høns, ubiquitine, INSM1, *etc.*), hybridpromotorer (*for eksempel* aktin/-globin, *etc.*), *etc.* En vektor kan omfatte mer enn én promotor. Promotorene kan være induserbare eller regulert. For eksempel, anvendelse av induserbare eller regulerte promotorer muliggjør for en bedre kontroll av produksjon ved å dissosiere kulturen fra produksjonsfasene. Induserbare eller regulerbare promotorer kan finnes i litteraturen, så som Tetracycline systemet, Geneswitch systemet, Ecdysone

systemet, Oestradiol systemet, RU486 systemet, Cumate systemet, metallotionein promotoren *etc.* Andre systemer er basert på elektriske strømmer eller mikrobølger, så som fokalisert ultralydssystem, AIR-induserte ekspresjonssystem og lignende.

Disse systemer kan anvendes for å regulere ekspresjon av et IL-7 polypeptid i samsvar med oppfinnelsen.

IL-7 kan co-uttrykkes med en anti-apoptotisk faktor (*for eksempel* iex, Bcl2, BclXL, *etc.*) eller syklin (*det vil si* p21, p27, *etc.*). cDNAene som koder for nevnte IL-7 og for nevnte anti-apoptotiske faktor kan begge plasseres nedstrøms for den samme promotor, men separeres med en IRES-sekvens, eller hver av dem nedstrøms for sine egne promotorer.

Vektoren kan ytterligere omfatte et replikasjonsorigo og/eller et markørgen, som kan utvelges blant konvensjonelle sekvenser. En mangfoldiggjøringsseleksjonsmarkør så som et DHFR-gen kan innsettes i vektorstrukturen.

Vektoren kan ytterligere omfatte forskjellige kombinasjoner av disse forskjellige elementer som kan organiseres på forskjellige måter.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også rekombinante vertsceller omfattende en nukleinsyre eller en vektor som beskrevet over. Vertscellen kan utvelges fra enhver eukaryot og prokaryotcelle, typisk fra en mammalsk celle (fortrinnsvis et menneske, gnager, caninecelle), en bakteriell celle (fortrinnsvis *E. coli*, *Bacillus Brevis*, *Bacillus Subtillis*), en gjærcele, en plantecelle og en insektcelle. Disse vertsceller kan tilpasses til serumfrie medium. Produksjon kan også utføres i et transgent dyr eller plante.

Foretrukne rekombinante vertsceller utvelges fra mammalske celler, fortrinnsvis humane celler, og likeledes derivater eller mutanter derav.

Spesifikke eksempler på egnete vertsceller inkluderer kinesisk hamster eggstokk-celler (CHO), babyhamster nyreceller (BHK), humane embryoniske nyreceller (HEK-

293), humane epidermale keratinocytter (HEK), humane stromale eller epitelceller, PERC6, *etc.* I slike mammalske celler kan IL-7 produseres som et utskilt protein ved anvendelse av funksjonelle signalpeptidsekvenser.

- 5 Et spesifikt objekt med foreliggende oppfinnelse er en eukaryot vertscelle omfattende et nukleinsyremolekyl omfattende SEQ ID NO: 2, 4 eller 6.

Det beskrives også antistoff som er immunreaktive med en IL-7 sammensetning eller polypeptid som beskrevet over. Slikt antistoff kan produseres i samsvar med konvensjonelle metoder, inkluderende immunisering av dyr og samling av serum (polyklonal) eller framstilling av hybridomaer fra miltceller (monoklonale). Fragmenter (*for eksempel Fab'*) eller konstruerte derivater av antistoff (*for eksempel ScFv eller diabodies eller minibodies*) kan produseres med kjente biologiske og kjemiske metoder. Foretrukne antistoff er spesifikt immunreaktive med et hyperglykosylert IL-7

10 polypeptid som beskrevet over, *det vil si* kan binde til det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid uten vesentlig binding til ikke- eller mono-glykosylerte polypeptider. Selv om ikke-spesifikke eller mindre effektiv binding til slike andre antigen kan observeres, kan ikke-spesifikk binding skilles fra spesifikk binding til det bestemte hyperglykosylerte IL-7 polypeptid ifølge oppfinnelsen.

20

Antistoffet er fortrinnsvis av simian, murin eller human opprinnelse eller har blitt humanisert.

Det beskrives også en hybridomacellelinje som produserer et monoklonalt antistoff

25 som beskrevet over.

Slike antistoff er nyttige i å detektere hyperglykosylerte IL-7 polypeptid eller i å nøytralisere IL-7 biologisk aktivitet i analyser eller eksperimenter som involverer multiple lymfokiner. En sammensetning egnet for diagnose, analyse eller terapi

30 omfattende slike monoklonale antistoff er også beskrevet.

Et annet objekt av foreliggende oppfinnelse vedrører framgangsmåter som anvendes, i industrielle skala, for produksjon av farmasøytisk kvalitet, i hovedsak rent hyperglykosylert IL-7 polypeptid som beskrevet over. Prosessen fører til høyt utbytte av rekombinant IL-7 konformer egnet for terapeutisk bruk. Oppfinnelsen  
5 tilveiebringer også nye framgangsmåter for å regulere IL-7 inneholdende sammensetninger, for å bestemme nærvær av mengde av hyperglykosylert IL-7 polypeptid som beskrevet over.

I et bestemt aspekt omfatter framgangsmåten for å produsere hyperglykosylert IL-7  
10 polypeptider eller sammensetninger som beskrevet over:

- a) dyrke en rekombinant vertscelle som beskrevet over, og
- b) samle et IL-7 polypeptid produsert fra nevnte celler.

Prøven kan underlegges forskjellige behandlinger eller tilstander for å øke renhet av  
15 IL-7, for å fjerne celledetritus eller virale partikler, *etc.* Typiske eksempler på slike behandlinger inkluderer sentrifugering, klarifisering og/eller dia-, ultra- eller nano-filtrering. Prøven kan således anrikes for IL-7 polypeptid.

For å øke utbyttene eller effektiviteten av framgangsmåten er det sterkt ønskelig å  
20 produsere en prøve som inneholder eller er anrikt i korrekt foldet og glykosylert IL-7 polypeptider.

Det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid kan renses med forskjellige teknikker kjent *per se*, men som til nå ikke har vært anvendt i foreliggende kombinasjon for å produsere  
25 et hyperglykosylert IL-7 polypeptid. Disse teknikker er mer fortrinnsvis valgt blant hydrofobisk interaksjonskromatografi, ionebyttekromatografi, affinitetskromatografi og gelfiltreringskromatografi, enten alene eller i forskjellige kombinasjoner. Slike metoder muliggjør fjerning av vertscelle DNA og andre urenheter som vil redusere gjenvinning. I en foretrukket utførelse, trinn ii) omfatter et hydrofobisk interaksjons-  
30 kromatografitrinn. Slik kromatografi kan utføres ved anvendelse av forskjellige støtte-media og formater, fortrinnsvis ved anvendelse av HIC butyl. Trinn ii) kan

utføres uten støttemedium, fortrinnsvis på batch eller i kolonne ved anvendelse av en egnet gel.

5 I en foretrukket utførelse omfatter rensetrinnene applisering av prøven gjennom en kolonne pakket med en spesifikk gel (for eksempel Sephadex).

10 I en annen foretrukket utførelse omfatter rensetrinnene et forbedringstrinn involverende å applisere prøven gjennom en kolonne pakket med en spesifikk gel (Source 15S) for å konsentrere gjenvunnet protein av interesse og eliminere mulige restproteinkontaminanter.

15 I en ytterligere foretrukket utførelse omfatter rensetrinnene å applisere prøven gjennom en kolonne pakket med en spesifikk gel omfattende et monoklonalt anti IL-7 antistoff immobilisert på et resin (for eksempel dekstransulfat eller heparin).

20 Disse metoder muliggjør reproducerbar og effektiv produksjon av i hovedsak ren hyperglykosylert IL-7 polypeptid som beskrevet over. Metodene er spesielt fordelaktige siden rekombinant IL-7 kan oppnås med en renhet på minst 95 vekt%, fortrinnsvis minst 98 vekt%, og enda mer foretrukket minst 99 eller også 99,5 vekt% med hensyn til den totale mengde av IL-7.

25 Hvert trinn av ovenfor beskrevne prosesser kan kontrolleres med analytiske metoder, inkluderende SDS-PAGE analyse. Primærstrukturen av det optimaliserte IL-7 kan kontrolleres og karakteriseres ved å bestemme genet og/eller aminosyresekvensen, ved peptid mapping analyse, etter trypsin oppkutting, med å bestemme molekylvekt med SDS PAGE, størrelsessekskluderende HPLC, massespektrometri så som MALDI TOF eller elektropray eller lignende, ved å bestemme hydrofobisitet med revers fase HPLC for eksempel, og/eller ved å bestemme den elektriske ladning med cation utbyttekromatografi HPLC eller isoelektrisk fokaliseringsanalyse for  
30 eksempel.

En ytterligere utførelse av oppfinnelsen vedrører IL-7 produksjonsmetoder som beskrevet over, hvor IL-7 ekspresjon av de rekombinante vertsceller er induserbare, regulert eller transient, slik at cellekulturen og IL-7 ekspresjonsfasene kan dissosieres. Nærmere bestemt, i en bestemt utførelse, IL-7 ekspresjon kan undertrykkes eller minimeres under rekombinant cellevekst, ekspansjon og/eller dyrking, for å muliggjøre produksjon av store mengder av rekombinante vertsceller uten noen IL-7 mediert potensiell toksisk effekt. Deretter kan IL-7 ekspresjon induseres i cellekulturen (eller på en prøve derav), som muliggjør effektiv syntese og frigivelse av rekombinant IL-7.

10

Et objekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører også en framgangsmåte for å produsere et rekombinant IL-7 polypeptid, omfattende å dyrke en rekombinant vertscelle som beskrevet over omfattende et nukleinsyremolekyl som koder for nevnte IL-7 polypeptid og gjenvinne det rekombinante IL-7 polypeptid som ble produsert, hvor nevnte nukleinsyremolekyl tilveiebringer for en regulert eller induserbar ekspresjon av nevnte IL-7 polypeptid, slik at ekspresjon av nevnte IL-7 polypeptid kan undertrykkes eller minimeres under rekombinant cellevekst og induseres under produksjonsfase. Nukleinsyren omfatter typisk en induserbar promotor som kan undertrykkes eller aktiveres i nærvær eller fravær av et spesifikt middel inneholdt i eller tilsatt til dyrkingsmedium. Framgangsmåten er spesielt egnet for å produsere en IL-7 hyperglykosylert konformer som beskrevet over.

15

Forskjellige regulerte eller induserbare ekspresjonssystemer har blitt beskrevet innen fagfeltet, som er funksjonelle i mammalske vertsceller og kan anvendes i foreliggende oppfinnelse. Disse inkluderer Tetracycline TetOn/Off system, Geneswitch system (Invitrogen) med Mifepristone som induserbart middel og GAL4-E1b promotor, Ecdysone system (induksjon med ponasterone A eller muristerone A, analoger av insektsteroidhormoner) (Invitrogen) metallotioneine promotor (induserbar av zink), Oestradiol system, RU486 system, fokalisert ultralydssystem, AIR (Acetaldehyde induserbar regulering) indusert ekspresjonssystem, Cumate system (Q-mate ; Qbiogen), Cre-Lox system, *etc.* Disse regulerte eller induserbare ekspresjonssystemer kan anvendes i forskjellige celler så som for eksempel HEK293, HEK293

25

30

EBNA, HEK, T-REX<sup>TM</sup>-293, T-REX<sup>TM</sup>-HeLa, T-REX<sup>TM</sup>-CHO eller T-REX<sup>TM</sup>-Jurkat cellelinjer, transformert med en rekombinant vektor konstruert for å uttrykke rekombinant IL-7 etter induksjon.

- 5 Alternativt, transient transfeksjon kan anvendes for å dissosiere celleekspresjon fra IL-7 produksjon. I denne forbindelse, effektiv genavgivelsesvektorer anvendes for å introdusere en IL-7 kodesekvens i cellene ved ekspansjon derav. Mer fortrinnsvis, vektorsystemet for transient transfeksjon er en virusvektor, så som en rekombinant adenovirus eller en episomal vektor [*for eksempel* pCEPH (Invitrogene), pTT (IRB: Durocher Y. *et al.* Nucl. Acids. Res., 2002, 30(2)) eller anvendelse av MAR-sekvensene]. Adenovirus (og andre virale vektorer så som AAVer, for eksempel) kan produseres i samsvar med teknikker kjent innen fagfeltet. Typisk, E1-defektive adenovirus produseres i en E1-komplementerende cellelinje, så som HEK293, PERC6 celler, *etc.* Slike transiente transfeksjonsprosesser kan implementeres i
- 10 forskjellige mammalske celler i kultur, så som A549-, HeLa-, VERO-, BHK- eller CHO-transformerte celler for eksempel (som beskrevet i eksempel A4). En alternativ transient ekspresjonsmetode egnet for anvendelse i foreliggende oppfinnelse er for eksempel beskrevet i den neste artikkel: Durocher Y. *et al.* Nucl. Acids. Res., 2002, 30(2) i HEK293 EBNA eller HEK293 celler.

20

- I en foretrukket utførelse omfatter produksjonsmetoden ifølge oppfinnelsen et ytterligere trinn c) ved å karakterisere formålet eller kvantifisere det bestemte hyperglykosylerte IL-7 polypeptid som beskrevet over inneholdt i det resulterende produkt. Den fysikalske og biologiske karakterisering av det ønskete hyperglykosylerte IL-7 polypeptid kan oppnås med massespektrometri (MALDI-TOF eller elektrospay), infrarødt spektroskopi, nukleær magnetisk resonans (NMR), ved å bestemme sirkulær dikroisme, ved undersøkelse av biologisk aktivitet av IL-7 i en spesifikt bioanalyse, ved å måle affiniteten mot et spesifikt monoklonalt antistoff rettet mot nevnte hyperglykosylerte IL-7 polypeptid, eller heparin affinitet HPLC. Straks
- 25 karakterisert kan kvantifisering av nevnte konformer utføres med ELISA, bioanalyse, affinitet av nevnte hyperglykosylert IL-7 polypeptid for IL-7 reseptor og enhver
- 30

framgangsmåte for proteinkvantifisering dersom den anvendes mot den isolerte konformer.

I denne forbindelse tilveiebringer foreliggende oppfinnelse også en framgangsmåte for å identifisere og/eller måle mengden av hyperglykosylert IL-7 polypeptid og/eller relaterte urenheter i en prøve, fortrinnsvis i et farmasøytisk preparat. Slike karakteriseringsmetoder kan anvendes for innledningsvis å karakterisere og kvalifisere proteinet for terapeutisk bruk, i kvalitetskontroll av farmasøytiske batcher. Oppfinnelsen foreslår, for første gang, framgangsmåter for å karakterisere og kontrollere IL-7 inneholdende preparater, for å bestemme nærvær og/eller relativ mengde av hyperglykosylert IL-7 polypeptid ifølge oppfinnelsen. Foretrukne framgangsmåter anvender bikinkoninisk syre (BCA) proteinanalyse, SDS-PAGE, Western blot, størrelsesekklusjon HPLC, revers fase HPLC, ioneutbytte HPLC, hydrofob interaksjon HPLC, aminosyreanalyse (AAA), isoelektrofokalisering (IEF), ELISA, UV-absorpsjon og/eller en bioanalyse. Disse metoder kan utføres alene eller i forskjellige kombinasjoner.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en framgangsmåte for å produsere en IL-7 medikamentsubstans eller farmasøytisk sammensetning, hvor nevnte framgangsmåte omfatter (i) dyrke en rekombinant vertcelle som koder for et IL-7 polypeptid, (ii) isolere nevnte rekombinante polypeptid for å produsere en IL-7 medikamentsubstans og (iii) kondisjonere nevnte IL-7 medikamentsubstans for å produsere en farmasøytisk sammensetning egnet for terapeutisk bruk eller for vaksinebruk, hvor nevnte framgangsmåte ytterligere omfatter et trinn å identifisere, karakterisere eller måle, i nevnte medikamentsubstans eller farmasøytiske sammensetning, kvantiteten og/eller kvaliteten av hyperglykosylert IL-7 polypeptid som definert over, og mer fortrinnsvis et trinn for å utvelge medikamentsubstansen eller farmasøytisk sammensetning som omfatter som en aktiv ingrediens mer enn ca. 90%, fortrinnsvis 95%, mer fortrinnsvis 98% av nevnte hyperglykosylerte IL-7 polypeptid.

30

Det karakteriserende trinn kan utføres innen en rekke teknikker, fortrinnsvis med massespektrometribeslektede metoder, med eller uten tryptisk oppkutting, lektin-

affinitetskromatografi, aminosyreanalyse (AAA), endo- og ekso-N og O-glykanase oppkuttinger (PNGase, A/F, O-glykosidase, neuraminidase), fluorfor assistert karbohydrat elektroforese, MALDI TOF eller elektrospray massespektrometri, spesifikke monoklonale antistoffanalyser for disulfidbroer og/eller konfirmasjonskarakterisering.

5 Identifiseringen av molekylvarianter og produktrelaterte urenheter utføres fortrinnsvis ved anvendelse av én eller flere metoder valgt blant bi-dimensjonal elektroforese, isoelektrisk fokusering og ioneutbyttingskromatografi for deaminerte former, størrelseseksklusjonskromatografi og SDS-PAGE for multimeriske former, og HPLC revers fase med eller uten enzymatisk preoppkutting for trunkerte former.

10

Dette trinn er spesielt egnet for kvalitetskontroll av kliniske eller farmasøytiske sammensetninger, hvor kun sammensetninger omfattende mer enn ca. 95% av ovennevnte hyperglykosylerte IL-7 polypeptid beholdes, fortrinnsvis mer enn ca. 96%, 98% eller 99,5%. Alle disse hyperglykosylerte IL-7 polypeptid viser en midlet  
15 isoelektrisk punkt under 6,5.

15

Et ytterligere objekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av et rekombinant hyperglykosylert IL-7 polypeptid oppnådd med prosessene som beskrevet over for framstilling av en farmasøytisk sammensetning for å hindre eller  
20 behandle en sykdom assosiert med en immunsvikt, spesielt for å indusere en forlenget lymfopoiesestimulering, for å bevirke og/eller forsterke en immunrespons, spesielt en antigenspesifikk immunrespons.

20

Et ytterligere formål med foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av et hyperglykosylert IL-7 polypeptid som et redskap for eksperimentell og farmakologisk  
25 anvendelse i pattedyr for veterinære applikasjoner.

25

Andre aspekter og fordeler med foreliggende oppfinnelse vil bli beskrevet i de påfølgende eksempler, som skal vurderes som illustrerende, og ikke begrensede for  
30 rammen av foreliggende oppfinnelse.

30

EKSEMPLEREksempel A. Konstruksjon og ekspresjon av optimalisert human (h) og simian (s) IL-7-kodende nukleotidsekvenser i mammalske celler

5

A1. Konstruksjon av en optimalisert human IL-7-kodende nukleotidsekvens:1.1 Peptidsignaloptymalisering

- 10 Idet ekspresjon av IL-7 cDNA fragmenter koblet ved 5'-enden til det naturlige IL-7 peptidsignal var svært lav, testet vi flere signalpeptidsekvenser. De nye humane IL-7 kodende cDNA sekvenser ble kjemisk oppnådd fra å sammenstilte syntetiske oligonukleotider. Flere signalpeptidsekvenser ble testet: signalpeptid (SP) av høyt utskilte proteiner
- 15 (Barash *et al.*; 2002; Biochemical and Biophysical Research Communications 294:835-842):

IL-7 SP

MFHVSFRYIF GLPPLILVLL PVASS (SEQ ID NO: 13)

20 EPO SP

MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLG (SEQ ID NO: 14)

SEAP SP

MLLLLLLLGL RLQLSLG (SEQ ID NO: 15)

IgGkappa SP

25 METDTLLLWV LLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 16)

Lactotransferin/vitronectin SP

MKLVFLVLLF LGALGVALA (SEQ ID NO: 17)

Cystatin bis SP

MARPLCTLLL LMATLAVALA (SEQ ID NO: 18)

30 EPO/IL-7 a new hybrid SP

MGVHECPAWL WLLLSLLSLV LLPVAS (SEQ ID NO: 19)

De oppnådde cDNA sekvenser ble innsatt i pTT5 vektoren (Durocher *et al.*; 2002; Nucl. Ac.Res.; 30) for transient ekspresjon i mammalske celler så som HEK293-celler eller CHO-celler.

- 5 For å kontrollere for god spalting av signalpeptidet, ble N terminal aminosyresekvens bestemt for hvert oppnådd protein; hIL-7 integritet ble opprettholdt. Cystatin, IgG, EPO og hybride EP/7 framkom som de beste signalpeptidsekvenser. Faktisk, hIL-7 ekspresjon er forbedret med minst en faktor på 10.

10 1.2. Human IL-7-kodende nukleotidsekvensoptimalisering:

Ved opprettholdelse av EP/7hIL-7 aminosyresekvensen, ble nukleinsyresekvensen optimalisert med:

- 15 - eliminering av humane sjeldne kodon (ved anvendelse av Graphical Codon Usage Analyser programvare)
- forbedre mRNA stabilitet ved å forsterke "GC"-innholdet av sekvensen, med unntak av for signalpeptidsekvensen (Kim *et al.*; 1997; Gene; 199), og minimere suksesjon av "CA"-dinukleotider.

- 20 Sekvensen er avbildet i SEQ ID NO: 2.

A2. Konstruksjon av en optimalisert simian IL-7-kodende nukleotidsekvens

- 25 Som beskrevet for human IL-7-kodende sekvens, ble en EP/7-sIL-7 optimalisert sekvens syntetisert (SEQ ID NO: 3).

A3. Konstruksjon av canine IL-7-kodende nukleotidsekvens:

- 30 Canine IL-7 cDNA ble mangfoldiggjort med PCR fra en hundenyre cDNA bibliotek (Biochain), klonet og sekvensert som avbildet over for human IL-7-kodende sekvens, en IL-7-7SP eller EP/7SP-clIL-7 sekvens ble syntetisert (SEQ ID NO: 6).

A4. Mammalsk ekspresjon (BHK celleekspresjon eller CHO celleekspresjon eller HEK-293 celleekspresjon):

De IL-7-kodende cDNA sekvenser ble mangfoldiggjort med polymerase kjede-  
 5 reaksjon (PCR) (Mullis *et al.*; 1987; Methods in Enzymology; 155:335-350) for å etablere restriksjonssetene (*NotI/SwaI*) for kloning inn i ekspresjonsvektoren.

Ekspresjonssystemet ph-pgk.EP7-hIL-7 (fig. 1) eller pBh-pgk.EP7-hIL-7 (fig. 2) ble  
 10 konstruert for å uttrykke en IL-7 protein predikert fra translasjon av den naturlige humane IL-7 gensekvens. Seleksjon for rekombinante vektorinneholdende celler ble utført på basis av antibiotikum (ampicilin for kloning i *E. coli* og hygromycin for ekspresjon i mammalske celler) resistensmarkørgener som bæres på vektoren.

Denne ekspresjonsvektor har blitt fullstendig konstruert ved CYTHERIS, startende  
 15 fra pIC20H-plasmid (ATCC) som bevirker ampicillinresistens til systemet. Den inneholder 2 mammalske produksjonsenheter:

1/ en for ekspresjon av IL-7-kodende sekvenser, under kontroll av pgk-promotoren, og en syntetisk polyA-sekvens som unngår transkripsjon gjennom pgk-promotoren.  
 2/ en for ekspresjon av hygromycinresistens, under kontroll av "sv40 forsterker-tk-promotor".  
 20

Følgende sekvenser ble innsatt i denne preliminnære vektor:

- "hph-ef1a pA" : *HindIII/SbfI* fragment fra pViro2.mcs (Invitrogen);
- tk promotor : *EcoRI/HindIII* PCR fragment fra pMEP4 (Invitrogen);
- 25 - sv40 enhancer : *BssHII/EcoRI* PCR fragment fra pViro2.mcs (Invitrogen);
- MAR kanin Bglobin : en putativ "Matrix Attachment Region" for en bedre integrering i sterkt transkribert region av kromatin, *EcoRV/Agel* kanin  $\beta$ globin intron2 PCR fragment fra pSG5 (Stratagene);
- SpA : *StuI/BspEI* fragment fra pCAT3 kontroll (Promega)
- 30 - P<sub>gk</sub> promoter : *KpnI/BssHII* PCR fragment fra pQBI.pgk (Q-biogen);
- 5'UTRint1 : *HindIII* kimerisk intronfragment fra pCAT3-kontroll (Promega);
- *NotI/SwaI* eller *NotI/PmlI* IL-7-kodende cDNA og mutanter;

- hgHPA : *Nrul/Swal* syntetisk syntese fra human veksthormon cDNA sekvens beskrevet av M. Goodman (DeNoto *et al.*; 1981; Nucl. Acid. Res.; 9 (51):3719-3730).

5 Noen varianter av vektoren ble framstilt med andre IL-7 promotorer enn pgk-promotoren: Ef1 alfa, snRNA U1, aktin, Ubiquitin, CMV-promotorer, etc., eller andre seleksjonsmarkører: neomycin, *etc.*

Den mammalske (HEK-293, CHO eller BHK) ekspresjonsvektor omfattende SEQ ID  
10 NO: 2 benevnes ph-pgk.EP7-hIL-7 eller pBh-pgk.EP7-hIL-7. Stabil ekspresjon av human IL-7 i HEK-293 eller CHO transfekterte celler ble oppnådd ved anvendelse av ekspresjonsvektorene ph-pgk.EP7-hIL-7 eller pBh-pgk.EP7-hIL-7. Etter linearisering med *NdeI*, ble ekspresjonsvektorene ph-pgk.EP7-hIL-7 eller pBh-pgk.EP7-hIL-7  
15 transfektert i de mammalske vertsceller ved anvendelse av framgangmåter kjent for fagkyndige innen feltet. Den selekterbare markør anvendt for å etablere stabile transformanter var hygromycin (Invitrogen).

#### A5. Induserbar mammalsk ekspresjon (metalotionein promotor "MT1"):

20 I den samme ekspresjonsvektor har pgk-promotoren også blitt erstattet med en kjemisk syntetisert *BspEI/BssHII* "Mus musculus MT1" sekvens, som referert i PubMed (N° X53530) (Carter *et al.*; 1984; Proc.Natl. Acad. Sci. USA; 81:7392-7396). MT1 er en metallavhengig transkripsjonsfaktor promotor. Ekspresjon av stabile kloner blir deretter zinkavhengig.

25

#### A6. Mammalsk coekspresjon av IL-7 og Bcl2 eller BclXL (BHK celleekspresjon, eller CHO celleekspresjon eller HEK-293 celleekspresjon):

For å forsterke cellelevedyktighet i mammalske vertscellekulturer og derfor å  
30 optimalisere mengden av IL-7 produksjon, ble en variant av ekspresjonsplasmid framstilt ved å innsette Bcl2 cDNA sekvens mellom tk-promotoren og hph cDNA slik at antiapoptotisk virkning av Bcl2 kunne testes i en bioreaktorproduksjon (Zhong *et*

*al.*; 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 90:4533-4537 - Lee *et al.*; 2000; Journal of cell Science; 114(4):677-684). (Se fig 2).

5 Eksempel B. Konstruksjon og ekspresjon av hyperglykosylerte analoger av IL-7-kodende nukleotidsekvenser i mammalske celler:

B1. Konstruksjon av cDNA-sekvenser av hyperglykosylerte IL-7-analoger

De hyperglykosylerte IL-7-analoger ble oppnådd ved anvendelse av flere teknikker  
10 inkluderende mutagenesemetoder. Hyperglykosylerte IL-7 analoger (alternativt HG37 -40 -104 -126 og -147) ble kjemisk konstruert fra sammensatte syntetiske oligonukleotider. Flere analoger ble oppnådd ved å introdusere én eller flere ønskelige mutasjoner for å gi IL-7 analoger som har ett eller flere ytterligere glykosylerings-  
15 ønskete ytterligere glykosylerings seter. Således inneholder de resulterende fullengde cDNA sekvenser én eller flere ønskete ytterligere glykosylerings seter innsatt, etter oppkutting med *NotI* og *PmlI* restriksjonsenzymmer, mellom *NotI/PmlI* restriksjonssetene for direkte kloning inn i ekspresjonsvektor (tilsvarende til fig. 1 eller 2 men inneholdende egnet IL-7  
sekvens).

20 B2. Ekspresjon av cDNA-sekvenser av hyperglykosylerte IL-7-analoger

Ekspresjon av hyperglykosylerte IL-7-analoger ble utført som beskrevet ovenfor i avsnittene A4 til A6.

25 Eksempel C. Produksjon av rekombinante hIL-7 i bioreaktor dyrkningsbetingelser

Den best stabile positive klon, som i eksempel A4 ble tilpasset til serumfri suspensjonskultur med flere medium og komponentscreening for å produsere en klon som var optimalisert for produktivitet og vekst i høy celletetthetkultur. Før utsåing til 100 til  
30 2000 L bioreaktor dannes prekulturer i "wave bag"-systemet. Celledyrking utføres i en 100 til 2000 liter bioreaktor med et perfusjonssystem eller et fed-batch system i

løpet av 10 til 15 dager. Cellene ble mangfoldiggjort til en konsentrasjon av 10 millioner celler/ml i et lav-glutamininnholdmedium tilsatt plantepeptoner.

5 I et første ekspansjonstrinn reguleres dyrkingstemperaturen ved 37°C for å øke celledtetthet. Etter noen få dager blir temperaturen senket til rundt 28/32°C for å inhibere cellevekst og muliggjøre et bedre ekspresjonsnivå. Videre, å redusere temperaturen reduserer hastigheten av sekresjonsreaksjonsveien, som fremmer bedre glykosylering av uttrykt IL-7 med økt setetilegnelse.

10 Noen få dager før slutten av kulturen ble IL-7 ekspresjonen boostet ved tilsetting av 0,5-10 mM natriumbutytrat i medium.

Under betingelsene beskrevet over ble IL-7 ekspresjon monitorert både inn i cellene og dyrkingsmedium (fig. 3).

15 For å produsere høye MW IL7 glykoformer, opprettholdes 3g/L glukose og 3 mM glutamin i medium under dyrkingen, og likeledes en god oksygenering. Man monitorer også aminosyreforbruket og mater kulturen med de manglende aminosyrer. Cellekulturen høstes så snart cellelevedyktigheten reduseres til under 90%.

20 Eksempel D. Rensing av rekombinant human IL-7-produkt uttrykt i HEK-293 og CHO-celler

25 Ubehandlet cellekulturmedium ble samlet og sentrifugert for å pelletere hele celler og celledbris. Alternativt kan dette oppnås med en dyp filtrering på klarifiseringskapsler eller moduler så som Mustang XT kapsel (Pall), Sartoclear P (Sartorius), Millistak+ Opticap (Millipore) eller hule fiberkassetter (AXH krysstrømming 10 (GE) eller ekvivalent. Sentrifugert dyrkingsmedium ble konsentrert ca. 10 ganger med 30 Centrasette kassetapparat, membran cut off 10 kDA (Pall Life Sciences) for å redusere volumet av supernatanten. Ethvert annet filtrering/konsentreringssystem med tilsvarende porøsitet kan også anvendes.

Den konsentrerte supernatant ble sentrifugert, justert til pH 7,5 og applisert til en Q Sepharose Fast Flow (General Electric Healthcare) kolonne ekvilibrert med 50 mM natriumfosfat pH 7,5. Proteinet ble deretter gjenvunnet i gjennomstrømmingen.

5 Under dette negative kromatografitrinn ble forskjellige kontaminanter, der i blant DNA eliminert. Et alternativ til dette trinn var å anvende validert Mustang Q membran-kassetter (Pall) under tilsvarende betingelser, forbedre utbytte og/eller en noe hurtigere prosess. Et alternativ til denne prosess er å oppta proteinet på en sterk Anion utbytteresin (Q Ceramic Hyper DE (Bioseptra), Capto Q (GE)) eller membran (Sartobind Q, Sartorius).

10

Etter dette pre-rensetrinn ble et opptakstrinn utført på en sterk kation utbytteresin. Det som strømmet gjennom og ble oppsamlet ved slutten av forrige trinn ble applisert på en Fractogel EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Merck) kolonne ekvilibrert med appliseringsbuffer (50 mM natriumfosfat pH 7,5), og vasket med 50 mM natriumfosfat pH 7,5. Eluering

15 ble utført ved anvendelse av en lineær NaCl-gradient (15 kolonnevolum) i 50 mM natriumfosfat pH 7,5.

20

Aktive fraksjoner ble samlet og inaktivert i løpet av 30 minutter ved pH 3,5 ved romtemperatur for å eliminere virus. Et alternativ til denne prosess er å erstatte dette virale inaktiveringstrinn med et multisjikt nanofiltrering ved slutten av prosessen.

25

Etter viral inaktivering ble samlede proteinfraksjoner fortynnet 2 ganger i buffer (200 mM natriumfosfat pH 7, 3M ammoniumsulfat) og pH ble justert til 7. Deretter ble proteinløsningen applisert på en hydrofobisk interaksjonskromatografi (HIC) Butyl Toyopearl 650-M (Tosoh) kolonne ekvilibrert med appliseringsbuffer (50 mM natriumfosfat pH 7 + 1,5M ammoniumsulfat). Etter vasking med appliseringsbuffer ble IL-7 eluert med 25 kolonnevolumer av en saltgradient i området fra 1,5 M til 0 M ammoniumsulfat i 50 mM natriumfosfat pH 7.

30

Alternativ HIC resin så som heksyl Toyopearl 650-M (Tosoh), butyl/oktyl Sepharose™ 4 Fast Flow (General Electric Healthcare), kan anvendes for dette trinn,

og et alternativ til HIC for oppskaleringsformål var anvendelse av en annen matrix så som MEP HyperCel (Pall Biosepra) for tilsvarende resultater.

Kombinasjonen av ovennevnte opptakstrinn og hydrofob interaksjonskromatografi muliggjør optimal separasjon av de forskjellige glykosylerte IL-7 isoformer (fra B1 til B10 som angitt i fig. 4), i samsvar med deres iboende fysikalskkjemiske egenskaper. Adekvat seleksjon av eluerte fraksjoner (fraksjoner fra B1 til B4) førte til en anriking av den 3N-assosierte eller ikke til 1O-glykosylert hIL-7 enhet. Et eksempel på en slik glykoformseparasjon er vist i fig. 4.

10

De sterkt glykosylerte IL-7 fraksjoner ble samlet og applisert på en G25 Sephadex (General Electric Healthcare) kolonne ekvilibrert med lav saltbuffer (20 mM natriumacetat pH 6). Et alternativ til dette trinn er å diafiltrere høy saltprotein pool ved anvendelse av 5 eller 10 KDa molekylvekt cut off TFF membraner (Qvick start membranes, (GE), Centramate TFF (Pall)).

15

Proteinfraksjonene som ble oppnådd fra G25-trinnet ble applisert på en Source 15S (General Electric Healthcare) kolonne ekvilibrert med lastebuffer (20 mM acetatnatrium pH 6). Dette forbedringstrinn resulterte i proteinkonsentrasjon og eliminering av restkontaminanter.

20

Kolonnen ble vasket med natriumacetat lastebuffer og IL-7 proteinet ble eluert med 15 kolonnevolumer av en saltgradient i området fra 0 til 1M NaCl i 20 mM natriumacetat pH 6. Eluerte fraksjoner ble separert med SDS-PAGE og farget med enten Coomassie blue eller sølvnitrat. Kun fraksjonene inneholdende IL-7 ble samlet for å gi den finalt rensede IL-7 proteinbatch.

25

Dersom viral inaktivering ikke har blitt utført tidligere kan renseprosessen også inkludere en ytterligere kombinasjon av to filtreringer for å garantere optimal virusklaring. Fjerning av virus kan oppnås ved filtrering ved anvendelse av en prefiltreringsanordning (Planova 75, Asahi Kasei Medical) etterfulgt av en nanoporøs

30

cellulosemembran (Planova 20N, Asahi Kasei Medical) eller ved andre virale fjerningsmembraner (Virosart, Sartorius ; DV20, Millipore).

SDS PAGE av det rensede *E. coli*, glykosylert og hyperglykosylert hIL-7 er vist i fig.

5 5.

Skifte i gelen illustrerer nivået av glykosylering av proteinet. Faktisk, de hyperglykosylerte former som ble testet her (HG-37-147 og HG-40-104) har en høyere molekylvekt enn det fullstendig glykosylerte hIL-7.

10

#### Eksempel E. Analyser av glykoprotein karbohydrater

Produksjon av rekombinant human IL-7 ble utført i en CHO cellebasert ekspresjonssystem for, men ikke begrenset til, følgende grunner. CHO-celler er de for tiden mest validerte og mest vanlige verter anvendt for produksjon av rekombinant human terapeutisk glykoprotein. Videre, et stort sett av detaljert arbeid rapporterte at CHO-celler, inkluderende genetisk modifiserte CHO-cellelinjer uttrykker sialyl- $\alpha$ -1-6 transferase, var i stand til å glykosylere rekombinante proteiner på en måte kvalitativt tilsvarende til det som observeres i humane celler. Denne bestemte egenskap var av stor viktighet for å redusere den potensielle immunogenisitet av det rekombinante glykoprotein idet det injiseres i humane pasienter.

15

20

Renset rekombinant humant IL-7 produkt eller fraksjoner anriket for bestemte glykoformer (3N eller 3N+2N, assosiert eller ikke til 1 O-glykanenhet) oppnådd fra transfekterte CHO-celler ble analysert med Western blot for å bekrefte glykosyleringsstatus sammenliknet med *E. coli*-avledet rekombinant human IL-7.

25

De forskjellige glykoformer av CHO-produsert og rensed IL-7 ble differensielt karakterisert ved anvendelse av polyAkrilamid gelelektroforese. Tilsynelatende molekylvekt glykoprotein enheter var i området mellom 20 KDa og 35 KDa med et hovedbånd rundt ca. 28 KDa (observert i SDS-PAGE, se fig. 5 og fig. 6), mest sannsynlig korresponderende til en tre N-glykosylert form omfattende eller ikke en O-glukan-

30

enhet. Dette aspekt ble spesifikt undersøkt med en enzymatisk deglykosylering av det rensete produkt (fig. 7).

Disse glykoformer (3N eller 3N+2N), assosiert eller ikke til 1 O-glukanenhet) av CHO-produsert og renset IL-7 ble differensielt karakterisert ved anvendelse av massespektrometri, som gir masser over 25 KDa for 3N-glukoformen assosiert eller ikke til 1 O-glukanenheten og over 34 KDa for 2N-glukoformen assosiert eller ikke til 1 O-glukanenheten (se fig. 8).

Videre, de ovennevnte glykosylerte former presenterer et midlet isoelektrisk punkt på 5,8 som reflekterer en høy sialyleringsprofil (se fig. 9).

Som en sammenlikning ble tilsvarende analyser med ikke-glykosylert *E. coli*-avledet hIL-7 og dette viste et protein med en tilsynelatende molekylvekt på ca. 18 KDa, og mammalske celler avledet hyperglykosylert hIL-7 oppviste tilsynelatende en molekylvekt i området mellom 27 og 37 KDa.

Generell glykosyleringskompleksitet og total N-glukan heterogenisitet av det rensete CHO-avledete hIL-7 ble undersøkt med total enzymatisk deglykosylering etterfulgt av kromatografisk separasjon og massespektrometrianalyse av de genererte oligosakkarider.

Rensete glykosylerte h-IL-7 prøver ble enzymatisk oppkuttet med en endoglykosidase så som peptid-N-glykosidase F (PNGaseF, Roche). Frigjorte N-koblede oligosakkarider ble separert fra peptidstrukturen og sortert ved anvendelse av grafitt Carbograph 200-300 µl kolonne (Alltech), etterfulgt av MALDI-TOF massespektrometri (Voyager Spec, Applied Biosystems). M/z-verdiene korresponderer til hver topp i MS-spektrum muliggjorde identifikasjon av N-glukan generelle struktur av hele hIL-7 molekylet.

For spesifikk deteksjon av sialisk syreinnholdende glukaner, ble en karboksy-metylering av PNGase-genererte oligosakkarider (som rapportert i Powell AK & Harvey DJ, Rap. Com. Mass Spec. 1996) utført før massespektrometrianalysen.

- 5 Analyse av spektrum generert fra rensset CHO-avledet hIL-7 viste N-glukanmasser i området 1340 Da opp til 3516 Da (se fig. 10).

Fra spektrum kunne følgende glukonstruktur bestemmes (se tabell 3):

10

Tabell 3

<b>m/z signal</b>	<b>Tilordning av observerte molekyllioner</b>
1338	Hex <sub>3</sub> HexNAC <sub>4</sub> + Na <sup>+</sup>
1448	Hex <sub>4</sub> (dHex)HexNAC <sub>4</sub> + Na <sup>+</sup>
1485	Hex <sub>3</sub> (dHex)HexNAC <sub>4</sub> + Na <sup>+</sup>
1647	Hex <sub>4</sub> (dHex)HexNAC <sub>4</sub> + Na <sup>+</sup>
1809	Hex <sub>5</sub> (dHex)HexNAC <sub>4</sub> + Na <sup>+</sup>
1824	Hex <sub>3</sub> (dHex <sub>2</sub> )HexNAC <sub>5</sub> + Na <sup>+</sup>
1970	Hex <sub>5</sub> (dHex)HexNAC <sub>4</sub> (Sulph) <sub>2</sub> +2Na <sup>+</sup>
2012	Hex <sub>5</sub> (dHex)HexNAC <sub>5</sub> + Na <sup>+</sup>
2157	NeuAcCarboxyHex <sub>4</sub> (dHex)HexNAC <sub>5</sub> + Na <sup>+</sup>
2182	NeuAcHex <sub>5</sub> (dHex)HexNAC <sub>4</sub> Sulph + Na <sup>+</sup>
2318	NeuAcCarboxyHex <sub>5</sub> (dHex)HexNAC <sub>5</sub> + Na <sup>+</sup>
2421	Hex <sub>3</sub> (dHex)HexNAC <sub>8</sub> (Sulph)+ Na <sup>+</sup>
2536	NeuAcCarboxyHex <sub>6</sub> HexNAC <sub>6</sub> + Na <sup>+</sup>
2624	NeuAc2CarboxyHex <sub>5</sub> (dHex)HexNAC <sub>5</sub> + Na <sup>+</sup>
2786	NeuAc2CarboxyHex <sub>6</sub> (dHex)HexNAC <sub>5</sub> + Na <sup>+</sup>
2843	NeuAc2CarboxyHex <sub>6</sub> HexNAC <sub>6</sub> + Na <sup>+</sup>
3092	NeuAc3CarboxyHex <sub>6</sub> (dHex)HexNAC <sub>5</sub> + Na <sup>+</sup>
3153	NeuAc3CarboxyHex <sub>6</sub> HexNAC <sub>6</sub> + Na <sup>+</sup>

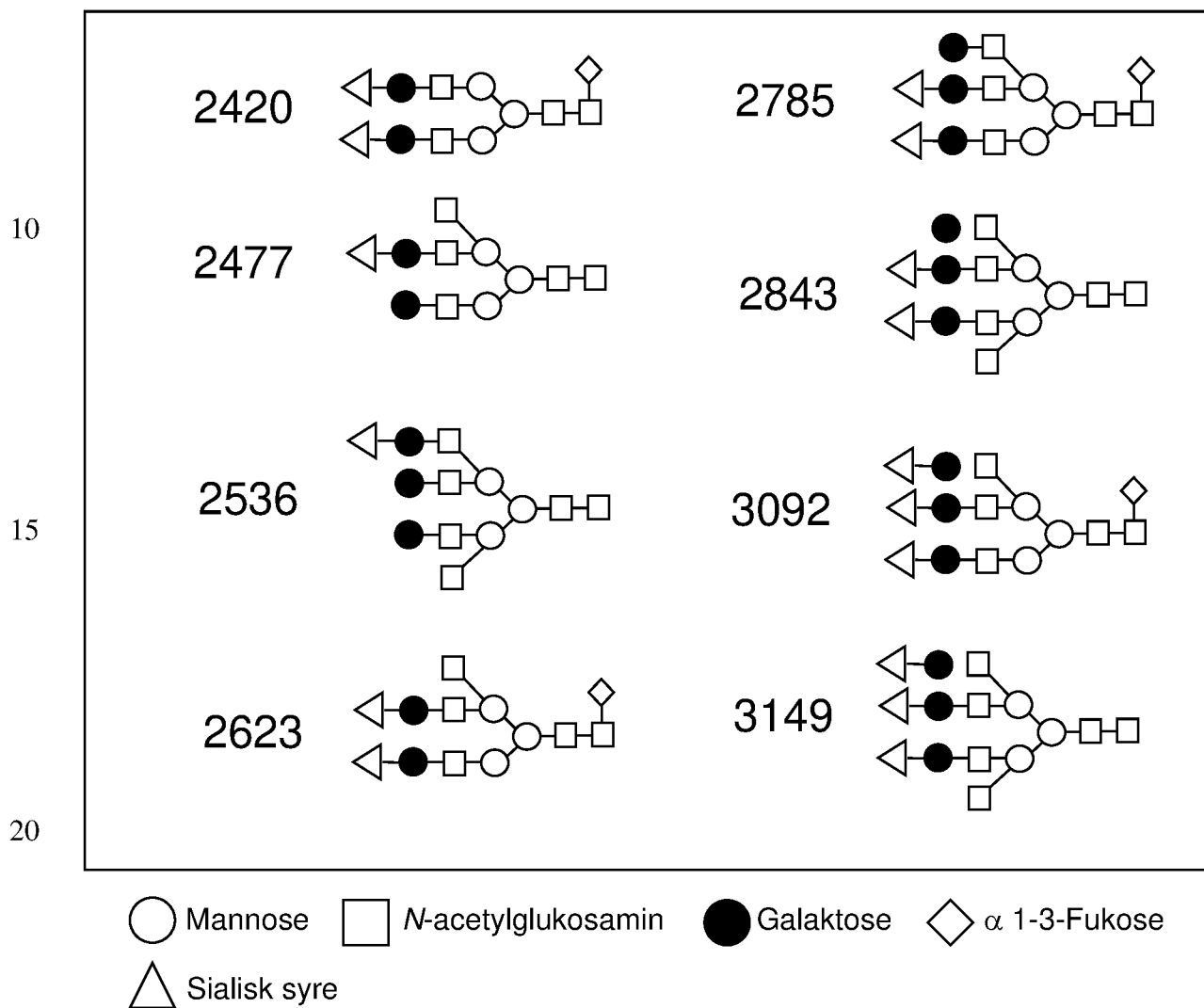
Hex : heksose (galaktose eller mannose), HexNAC : N-acetylheksosamin (N-acetyl glukosamin eller N-acetyl galaktosamin), dHex : deoksyheksose (Fukose), Sulph : Sulfategruppe, NeuAc : N-acetyl neuraminisk syre.

15

Ved å ta hensyn til i) ble de respektive masser av de observerte oligosakkarid-enheter, ii) massen av hvert monosakkarid og iii) lovene i glukambiosyntese-

reaksjonsveiene slik de er kjent i dag, kan følgende sterkt komplekse N-glukan strukturer antas med god sannsynlighet.

Tabell 4: Kompleks bi- og triantenariske mammalske N-glukaner karakterisert på CHO-avledet hIL-7 (men ikke begrenset til):



Glykosyleringskompleksitet ble også undersøkt via bestemmelse av molart forhold av de forskjellige monosakkarider som finnes på alle glukaner (N- og O-glukan anvendelig) av rensset CHO-avledet hIL-7.

Alle glukaner av renssete glykosylerte h-IL-7 prøver ble kjemisk behandlet med metanolysereaksjon for å hydrolysere alle glykosidiske koblinger mellom sukere.

Frigjorte monosakkarider ble separert fra peptidstrukturen og sortert ved anvendelse av et koblet gasskromatografi-massespektrometri automass apparatur (Finnigan). Molart forhold ble bestemt med referanse til en kjent indre standard og til et 3 mannoseinnhold på et klassisk mammalt N-glykan.

5

En slik analyse ga følgende molare forhold for CHO-avledet hIL-7

Tabell 5

Monosakkarid	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc
Molekylær masse	164	180	180	221	221	309
Topp overflate	43382	179120	310124	33650	344476	423587
Ant. nanomol	5,41	24,76	22,15	5,26	27,29	20,94
<b>Molart forhold</b>	<b>0,73</b>	<b>3,35</b>	<b>3</b>	<b>0,71</b>	<b>3,69</b>	<b>2,83</b>

10 Setespesifikk N-glukan mønster heterogenisitet av CHO-avledet hIL-7 ble analysert med endoprotease oppkutting, etterfulgt av fraksjonering og massespektrometri-analyser av de dannede peptider.

15 Rensete prøver ble oppkuttet med Tripsin eller andre endo-proteaser for å generere glukopeptider korresponderende til hvert N-glykosyleringssete av det uttrykte IL-7. Hvert glukopeptid ble identifisert med N-terminal mikrosekvensering og med dets spesifikke retensjonstid idet de ble analysert med revers fase HPLC. Hvert glyko-protein ble derfor renset fra de andre. Heterogenisiteten av N-glukanene som bæres for glukoproteiner ble analysert med MALDI-TOF MS (Q Star, Applied Biosystems).

20 M/z-verdiene korresponderende til hver topp av MS-spektrumet muliggjorde identifikasjon av N-glukanmønstre ved et angitt sete i hIL-7.

O-glykosylering ble undersøkt *via* anvendelse av O-glukanspesifikke lektiner (Lectin Blot, se fig. 11).

25

Renset CHO-avledet hIL-7 prøver ble separert med SDS-PAGE analyser og blottet til PVDF-membraner. Immobiliserte proteiner ble probet med (men ikke begrenset til) peroksidasemerket PNA (peanøtt agglutinin) og/eller MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) og farget for visualisering.

5

Glukan heterogenisitet og sammensetning ble også bestemt *via* anvendelse av lektinaffinitet til det rensete CHO-avledete hIL-7.

Et arrangement av lektiner som har affinitet for N- og O-glukanstrukturer ble selektert og anvendt for å coate 96-brønns mikroplater. Identiske mengder av rekombinant renset IL-7 preparater ble inkubert i lektin-belagte mikroplatebrønner. Under dette trinn, i samsvar med affiniteten av en gitt lektin til glukनावfarging av IL-7, ble forskjellige mengder av IL-7 bundet til lektinet. Bestemmelse ble utført ved inkubering av et IL-7-spesifikt antistoff koblet til biotin. Lektin-IL-7-Ab sandwich ble bestemt med en streptavidin-peroksidase konjugat.

15

Åtte forskjellige lektiner ble anvendt for å karakterisere de IL-7 rensete prøver. Enhver lektin gjenkjenner spesifikt sukkerenheter. Glukanmotiv og strukturspesifisitet er presentert i tabell 6.

20

Tabell 6: Sammendrag av mønstre av sukkerenheter gjenkjent av lektiner og fortegnelse av deres glukanmotiv og strukturspesifisitet.

LEA er lektiner fra *Lycopersicon esculentum*,

WGA fra *Triticum vulgare*,

25 UEA.I fra *Ulex europeus*,

MAA fra *Maackia amurensis*,

ACA fra *Amaranthus caudatus*,

AIA fra *Artocarpus intergrifolia*,

ABA fra *Agaricus bisporus*,

30 PHA.L fra *Phaseolus vulgaris*.

Tabell 6

Navn	Glc	GlcN Ac	Man	Fuc	Neu Ac	Gal NAc	Gal	Glukanstruktur spesifisitet
LEA		+						GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc og N-acetyllaktosamin oligomerer
WGA		+			+			GlcNAc, kjerne av N- koblete Glukaner, Neu5ac
UEA I				+				Fukose
MAA					+			Neu5Ac $\alpha$ -3Gal $\beta$ 4GlcNAc-
ACA						+		Gal $\beta$ 3GalNAc $\alpha$ -O-R (T-antigen)
AIA							+	Gala6 eller Gal $\beta$ 3GalNAc (T-antigen), laktose
ABA							+	Gal-GalNAc $\alpha$ -O-R, O-koblete glukaner
PHA L								Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 6Man, forgrenet kompleks N-glukaner

5 Resultatene er presentert i fig. 12.

Lektiner klart viser forskjellig affinitet, som tilveiebringer informasjon om den generelle struktur av de aksessbare glukanavfarginger av det rensede IL-7 protein i løsnings-  
 10 responderer positivt noe som antyder nærvær av N- og O-glukanstrukturer som bærer disse monosakkarider. De spesifikke signal oppnådd med ABA viser nærvær av O-glukanstrukturer. ACA har et svakt signal sammenliknet med AIA og i mindre grad ABA. Dette viser at O-glukanene er forlenget med lite GalNAc som terminal  
 15 enhet.

15

LEA har affinitet for GalNAc noe som indikerer nærvær av N-glykanstrukturer. Blant GlcNAc-spesifikke lektiner som ble testet (data ikke vist), er kun de med affinitet for N-acetyllaktosamin viser et positivt signal

WGA presenterer et svakt signal på grunn av en lav bindingsaffinitet til kjerne-strukturer av N-koblede glukaner. Sterkt komplekse N-glukaner maskerer kjerne-strukturen og gjør at lektinaffiniteten er vanskelig å operere.

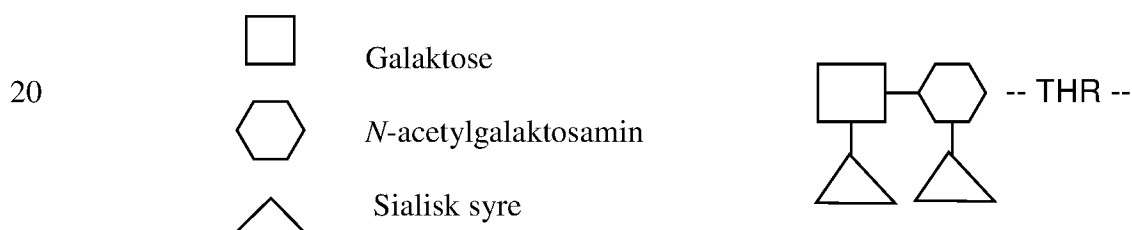
- 5 UEA.I har spesifikk aktivitet for nærvær av forgrenet fukose. Binding er ganske svak noe som indikerer en ukomplett men effektiv fukosylering av N-glukanene.

MAA har affinitet til terminale sialiske syrer. MAA-signalene er sterk, noe som indikerer en effektiv sialylering på både N- og O-glukaner.

10

PHA.L har affinitet til komplekse forgrenete strukturer av N-glukan og viste et sterkt signal, noe som bekrefter resultatene for MAA. PHA-L signaler antyder nærvær av store tri- eller tetra-antennariske N-glukaner.

- 15 Mest typiske mammalske O-glukaner karakterisert på CHO-avledet hIL-7 (dersom appliserbar):



- 25 Summert indikerer disse analyser at CHO cellebaserte ekspresjonssystem som ble anvendt genererer human IL-7 kompleks (triantennarisk) N-koblede oligosakkarid, som avbildet i følgende figur, forgrenet til deres ASN-enhet ved posisjon 70, 91 og 116 med høy partiell til fullstendig sialilering, opp til 10 sialiske syreenheter. Videre, CHO-avledet IL-7 inneholder et O-glukan ved posisjon T110.

Derfor, selv om de bærer komplekse sialilerte N-glukaner og O-glukaner, så inneholder IL-7 rensede batch framdeles en blanding av fullstendig og partielt glykosylerte proteiner.

5 Eksempel F. Medikamentsubstans til medikamentprodukt: Formulering, lagring og langtidsstabilitet av rekombinant CHO celleuttrykt hIL-7

10 Søken for optimal formulering av medikamentsubstans ble utført gjennom en kombinatorisk matrix studium for å evaluere effekten av forskjellige stressbetingelser (temperatur, buffer, pH, tonisitet, modifisert konsentrasjon, agitering, intens bestråling) på langtidsstabilitet av det rensede protein.

15 Sterkt komplekst rensede rekombinant humant IL-7 ble vist å være stabil i acetat og likeledes i sukkinatbuffer, ved en konsentrasjon i området mellom 5 til 50 mM. Adekvate pH-verdier ble valgt fra pH = 5,0 til 7,0, og ideelle lagringstemperaturer fra mellom -20°C til +4°C.

20 Sukkere og lav konsentrasjon av surfaktanter (polysorbat polymerer) ble tilsatt til preparatene for å hindre ikke-kovalent løselig aggregering.

Under slike betingelser kunne IL-7 lagres ved +4°C (i væskeform) med en konsentrasjon i området fra 0,5 til 8,0 mg/ml, fortrinnsvis fra 2,0 til 4,0 mg/ml, i mer enn 12 måneder. Den farmasøytiske sammensetning i væskeform har en forbedret stabilitetsprofil.

25 Eksempel G. Proliferative aktivitetsanalyser av mammalsk celleavledet rekombinant human IL-7 i en spesifikk bioanalyse

30 Den biologiske aktivitet av mammalsk celleavledet rekombinant human IL-7 ble evaluert i en spesifikk bioanalyse på en murin pre-B cellelinje avledet fra benmarg-celle fra CBA/C57BL-mus, PB-1 (German Cell Bank DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), sterkt avhengig av IL-7 forvekst (Mire-Sluis *et*

*al.*; 2000; J. Immunol. Methods; 236:71-76). Disse celler ble opprettholdt i kultur i kommersiell IL-7 inneholdende medium og sultet for IL-7 før utføring av bioanalysen.

5 Bioanalysene ble kjørt med IL-7-prøver som skulle testes, parallell til en kjent *E. coli*-avledet IL-7 positiv kontroll og en negativ kontroll som manglet IL-7.

10 IL-7, fra kontroll eller prøver, tilsatt til sultet cellekultur, induerte doseavhengig re-initiering av celleproliferasjon idet radiomerket tymidin (3H-Tdr, Amersham) ble inkorporert av delende celler. Mengden av merking ble pulset og målt i tellinger per minutt (cpm) ved væskescintillasjon Beta-teller (Wallack).

15 Alternativt kan denne bioanalyse utføres ved anvendelse av en fargemarkør som reflekterer den generelle metabolisme i cellen, så som MTT-farge ((3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium, redusert med mitokondriell RedOx aktivitet) eller MTS-farge (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium).

20 Serielle fortyninger av både positiv kontroll og prøvene som skulle testes muliggjør plotting av antallet cpm i relasjon til mengden av prøve/kontroll analysert.

25 Figur 13 presenterer doserespons kinetiske data og kurver oppnådd rutinemessig i en typisk bioanalyse: PB-1 cellevekst ble induert med ikke-glykosylert r-hIL-7 (uttrykt i *E. coli*) eller sterkt glykosylert r-hIL-7 (produsert i mammalske celler). (Datapunktene representerer gjennomsnitt  $\pm$  SD av triplikate bestemmelser).

30 Figur 14 presenterer doserespons kinetiske data og kurver oppnådd rutinemessig en typisk bioanalyse: PB-1 cellevekst ble induert med ikke-glykosylert r-hIL-7 (uttrykt i *E. coli*), sterkt glykosylert eller hyperglykosylert r-hIL-7 (produsert i mammalske celler). (Datapunkter representerer gjennomsnitt  $\pm$  SD av triplikat bestemmelse).

Den viktige parameter som vurderes for hver prøve var ED50 = konsentrasjon (ng/ml) som gir halv-maksimal aktivitet. En høyere ED50 betyr en lavere aktivitet.

Aktivitetssammenlikning mellom IL-7 prøver undersøkes med analyse av dose-responskurveparameteren, så som stigningskoeffisient, maksimal aktivitet. Fra alle kurveparametre slår ED50-konsentrasjonen (i ng/ml) sammen parameter variasjonen.

- 5 ED50 korresponderer til IL-7 doseringer som er nødvendige for å indusere en halvpart av maksimal mulig induksjonsaktivitet *in vitro*. I denne forbindelse korresponderer sterkt bioaktive molekyler til lave ED50-verdier mens høyere ED50-konsentrasjoner vil være typisk for mindre bioaktive IL-7-preparater *in vitro*.
- 10 Uansett, *in vitro* bioaktivitetsforskjellene er ikke nødvendigvis representative for tilsvarende *in vivo* bioaktivitetsforskjeller i foreliggende oppfinnelse.

Eksempel H. *In vivo* evaluering av immunogenisitet av hyperglykosylert IL-7 polypeptid i primater

- 15 Simian hyperglykosylert IL-7 (sIL-7) uttrykt i CHO cellelinje (eksempel A2, A6 og B) og renset i samsvar med eksempel D, ble evaluert *in vivo* for forekomst av potensiell immunogenisitet, etterfulgt av sIL-7 repeterte administreringer i normale primater.
- 20 Naive unge voksne cynomolgusaper (*Macaca fascicularis*) (n=4) ble innført i studiet og mottok hyperglykosylert sIL-7 i et doseringsnivå på 100 µg/kg/injeksjon. Behandlete dyr mottok et total på 6 subkutanøse administreringer av IL-7 over en periode på fem påfølgende uker. Dyrene ble klinisk observert i løpet av en to måneders periode. Blodprøver ble samlet, ved forskjellige tidspunkt, gjennom
- 25 forsøket: Ved dag 1 før sIL-7 administrering, ved dag 37 og ved slutten av forsøket.
- Alle dyrene overlevde studiet og hadde ingen skadelig reaksjon til sIL-7 terapi. Administrering av sIL-7 ble lokalt godt tolerert. Ved testing av interferens i en spesi-
- 30 detektert i serum til alle behandlede dyr. Til sammenlikning, *E. coli* avledet rekombinant IL-7, selv om det ble produsert som et sterkt renset medikamentprodukt,

induserte, i tilsvarende protokoll, produksjon av høye titer av IL-7-bindingsantistoff i sera i området fra 1:400 opp til 1:5000.

Eksempel I. *In vivo* biologisk aktivitet av hyperglykosylert IL-7 polypeptid i primater

5

Human hyperglykosylert IL-7 (hIL-7) uttrykt i CHO cellelinje (eksempler A1, A6 og B) og rensert som i eksempel D, ble undersøkt *in vivo* for bestemmelse av farmakokinetiske og farmacodynamiske profiler av hIL-7 i normale primater.

10 Naive unge voksne cynomolgus aper (*Macaca fascicularis*) ble innført i studiet og delt i to grupper: ubehandlet n = 2 og hIL-7 100 µg/kg/injeksjon n = 2. De behandlede dyr mottok enkel subkutanøs administrering av hIL-7. Dyrene ble klinisk observert i løpet av 45 dager. Blodprøver ble samlet, ved forskjellige tidspunkt, gjennom forsøket: på dager 1 (0, 3, 6, 9 og 12 timer post injeksjon), 2, 3, 4, 7, 21 og 45.

15

Administrering av hIL-7 ble godt tolerert uten lokal reaksjon ved injeksjonsstedet. Etter enkel subkutanøs administrering av hIL-7 i makaker, ble det farmakokinetiske mønster og parametre for hIL-7 etablert fra de første 72 timer:

- plasmaprofilen viste en bi-eksponert nedgang etter peak absorpsjon
- 20 • det observerte produkts halveringstid i plasma var i området 30/40 timer. Denne halveringstid er signifikant økt sammenliknet med halveringstid observert med *E. coli* avledet rekombinant IL-7 (5 til 8 timer) administrert under samme betingelser. Dette reflekterer en forbedret *in vivo* stabilitet av det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid i blod.
- 25 • Gjennomsnittlig oppholdstid (MRT) var 40 timer versus ca. 10 timer med *E. coli* produktet.
- Tiden for å nå maksimum konsentrasjon var 180 minutter.

30 I konklusjon, det farmakokinetiske forsøk viser at det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid ifølge oppfinnelsen oppviser en forbedret og forlenget farmakokinetisk profil, som vil gi en forbedret farmakodynamisk effekt.

Enkelinjeksjon av hIL-7 ved 100 µg/kg induserer en signifikant økning i perifere CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> og CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-celletall, respektivt 200% og 170% forandringer fra baselinje pre-behandlingsverdier. Antallet lymfocyt T-celler (CD4 og CD8) som uttrykker spesifikk IL-7 reseptor alfakjede (CD127) reduseres transient i perifert blod så tidlig som 6 timer etter injeksjon. Lymfocyt T-celler som uttrykker CD127 kommer til syne igjen, i perifert blod, 48 timer etter injeksjon, og returnerte til baselinjeverdier kun 7 dager post injeksjon. Ved å følge enkel subkutanøs administrering av *E. coli*-avledet rekombinant IL-7, forekom retur til baselinjeverdier av lymfocyt T-celler som uttrykker CD127 4 dager post injeksjon. Kinetikken av reseptorokkupasjon av hyperglykosylert IL-7 polypeptid er lenger sammenliknet med *E. coli* avledet rekombinant IL-7, noe som reflekterer den lengre halveringstid for hyperglykosylert IL-7 polypeptid i primater som vist nedenfor. Disse resultater er i samsvar med tidligere resultater som viser at selv om IV administrering av IL-7 resulterer i en bedre biotilgjengelighet, så overføres dette ikke til forbedret farmakokinetiske effekter, faktisk er den forlengete avgivelsesprofil oppnådd med subkutanøs injeksjon mer effektiv enn akutt avgivelsesprofil oppnådd etter IV injeksjon. Hyperglykosylering av proteinet inducerer her en forlenget kinetisk profil, som deretter overføres til en forbedret farmakodynamisk aktivitet. I lys av denne forlengete profil er det også forventet en forbedret klinisk toleranse, på grunn av at medikament bieffekter vanligvis er koblet til peak konsentrasjoner.

P A T E N T K R A V

- 5 1. Hyperglykosylert IL-7 sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte sammensetning omfatter minst 80% mammalske IL-7 polypeptider som er glyko-  
sylert ved fra tre og opp til åtte distinkte aminosyreenheter, inkluderende én O- og  
opp til syv N-glykosylerings seter, som har et midlet isoelektrisk punkt under 6,5 og  
en midlet molekylvekt over 27 kDa som bestemt med SDS gel elektroforese.
- 10 2. Sammensetning i samsvar med krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at sammensetningen omfatter mellom 80% og 95% mammalske IL-7 polypeptider som er glykosylert ved fra tre til opp til åtte distinkte aminosyreenheter, inkluderende én O- og opp til syv N-glykosylerings seter.
- 15 3. Sammensetning i samsvar med ethvert av kravene 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte mammalske IL-7 polypeptid er et humant IL-7 polypeptid.
- 20 4. Sammensetning i samsvar med ethvert av kravene 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte mammalske IL-7 polypeptid er et canine IL-7 polypeptid.
- 25 5. Sammensetning i samsvar med ethvert av kravene 1-4, k a r a k t e r i s e r t v e d at glykosyleringssetene er naturlig foreliggende og/eller artifielt etablert i IL-7 polypeptidsekvensen.
- 30 6. Sammensetning i samsvar med ethvert av kravene 1-5, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte mammalske IL-7 polypeptid er et humant IL-7 polypeptid og hvor glykosyleringssetene er valgt blant Asn-enheter ved posisjoner 70, 91 og 116; Thr ved posisjon 110, og likeledes ethvert artifielt etablert glykosyleringssete som angitt i Tabell nedenfor

Lys28Asn ; Ile30Ser
Lys28Asn ; Ile30Thr
Ile30Asn ; Ser32Thr
Leu35Ser
Leu35Thr

Glu38Ser
Glu38Thr
Phe39Ser
Phe39Thr
Phe42Ser
Phe42Thr
Glu52Ser
Glu52Thr
Val82Asn ; Glu84Ser
Val82Asn ; Glu84Thr
Lys97Asn ; Arg99Ser
Lys97Asn ; Arg99Thr
Ala102Asn ; Leu104Ser
Ala102Asn ; Leu104Thr
Leu104Asn ; Glu106Ser
Leu104Asn ; Glu106Thr
Leu128Ser
Leu128Thr
Ile145Asn ; Met147Ser
Ile145Asn ; Met147Thr
Met147Asn ; Thr149Ser

og fortrinnsvis som angitt i tabell nedenfor

Phe39Ser
Phe39Thr
Phe42Ser
Phe42Thr
Leu104Asn ; Glu106Ser
Leu104Asn ; Glu106Thr
Leu128Ser

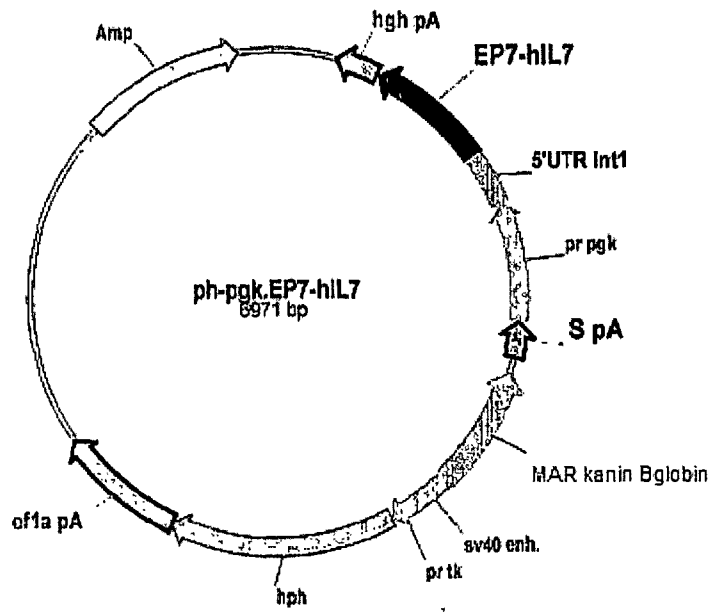
Leu128Thr
Met147Asn ; Thr149Ser

eller en kombinasjon derav.

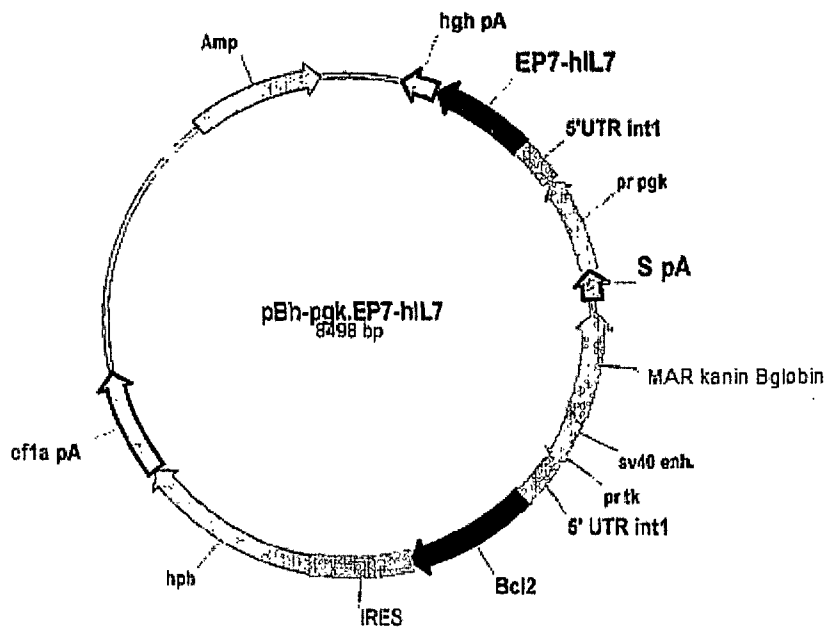
7. Sammensetning i samsvar med ethvert av kravene 1-6, k a r a k t e r i s e r t  
5 v e d at nevnte IL-7 polypeptider omfatter eller er anriktet i N-koblet karbohydrat  
valgt blant:
- a) en mammalsk type sukkerkjede, fortrinnsvis av typen uttrykt av CHO-celler;
  - b) en sukkerkjede omfattende en kompleks N-karbohydratkjede (*for eksempel*  
10 en triantenærisk eller biantenærisk struktur), mer fortrinnsvis inneholdende  
høyt mannose- og acetylglukoseaminmolekyler og høyt terminale sialisk  
syreenheter;
  - c) en sukkerkjede sialylert med alfa2,6-sialyltransferase eller alfa2,3-sialyltrans-  
ferase; og/eller
  - d) en sialylert sukkerkjede som oppviser mellom 3 til 30 sialyl-N-acetylgalaktose-  
15 amin, fortrinnsvis 7 til 23.
8. Sammensetning i samsvar med ethvert av kravene 1-7, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at nevnte IL-7 polypeptider omfatter eller er anriktet i O-koblete karbohydrat-  
kjede(r) med en terminal sialisk syreenhet.  
20
9. Sammensetning i samsvar med et av kravene 1-7, k a r a k t e r i s e r t v e  
d at karbohydratkjeden(e) omfatter fra tetra-antenæriske til bi-antenæriske  
strukturer med partiell eller komplett terminal sialylering, mer fortrinnsvis en tri-  
antenærisk struktur og tri- eller bi-sialylering og/eller en di-antenærisk struktur med  
25 di-syalilering.
10. Sammensetning i samsvar med ethvert av kravene 1-9, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at nevnte IL-7 hyperglykosylerte polypeptider oppviser en *in vivo* forlenget  
halveringstid og gjennomsnittlig oppholdstid i mammalsk vert.  
30

11. Fremgangsmåte for å produsere et IL-7 polypeptid som definert i et av kravene 1-10, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter å:
- d) dyrke, i en mate-batch eller perfusjonsmodus, en rekombinant vertcelle  
5 omfattende et rekombinant nukleinsyremolekyl som koder for et IL-7 polypeptid,
  - e) samle IL-7-polypeptidet produsert fra nevnte celle, og
  - f) rense nevnte IL-7 polypeptid med en fremgangsmåte omfattende minst ett  
10 trinn med hydrofob interaksjonskromatografi, ionutbytterkromatografi, affinitetskromatografi eller gelfiltreringskromatografi, enten alene eller i forskjellige kombinasjoner.
12. Sammensetning i samsvar med ethvert av kravene 1-10, , k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter én eller flere farmasøytiske kompatible bærere  
15 eller eksipienter.
13. Anvendelse av en sammensetning ifølge ethvert av kravene 1-10 for fremstilling av et medikament for å bevirke eller modulere en immunrespons i et  
20 individ.
14. Anvendelse ifølge krav 13, hvor medikamentet er for induksjon av forlenget lymfopoiesestimulering og/eller forsterkning av en immunrespons.
15. Anvendelse i samsvar med krav 14, hvor medikamentet er for å behandle en  
25 virusinfeksjon, så som HIV-infeksjon, viral hepatitt, West Nile feber, og Dengue.
16. Anvendelse i samsvar med krav 15, hvor det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid administreres sammen med et interferonmolekyl.
- 30 17. Anvendelse i samsvar med krav 13, hvor medikamentet er for å forbedre en tymopoietisk gjenvinning i et immunkomprimert individ.

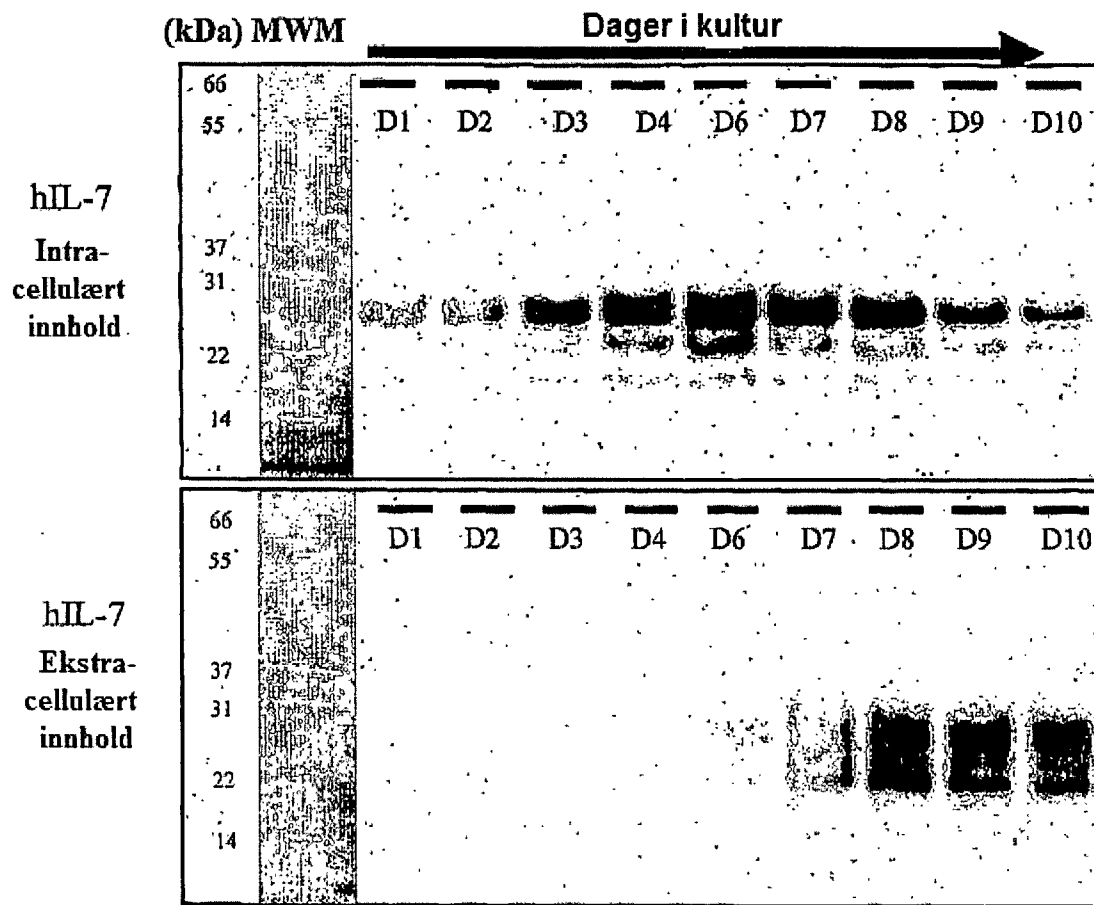
18. Anvendelse i samsvar med krav 17, hvor det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid administreres i forbindelse med en keratinocyt vekstfaktor, en stamcellefaktor, en gonadostimulin antagonist eller et veksthormon.
- 5 19. Anvendelse i samsvar med krav 14, hvor det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid administreres i forbindelse med et antigen eller en blanding av antigener, for å tilveiebringe en terapeutisk immunisering mot maligne celler, virus eller bakterier.
20. Anvendelse i samsvar med krav 19, hvor det hyperglykosylerte IL-7 polypeptid  
10 ytterligere administreres i forbindelse med GM-CSF.



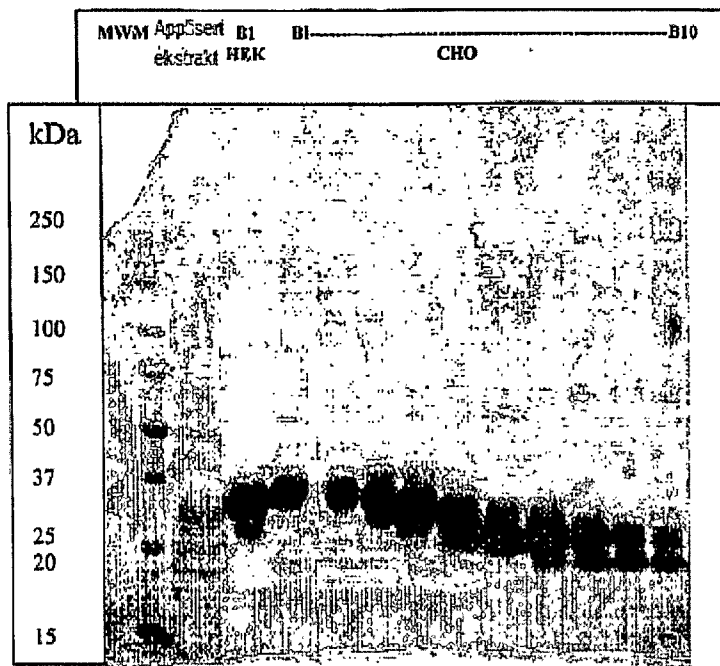
Figur 1



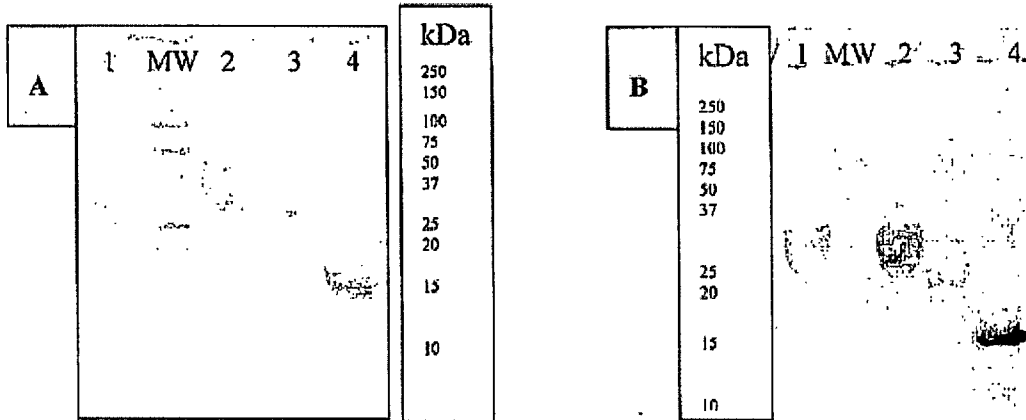
Figur 2



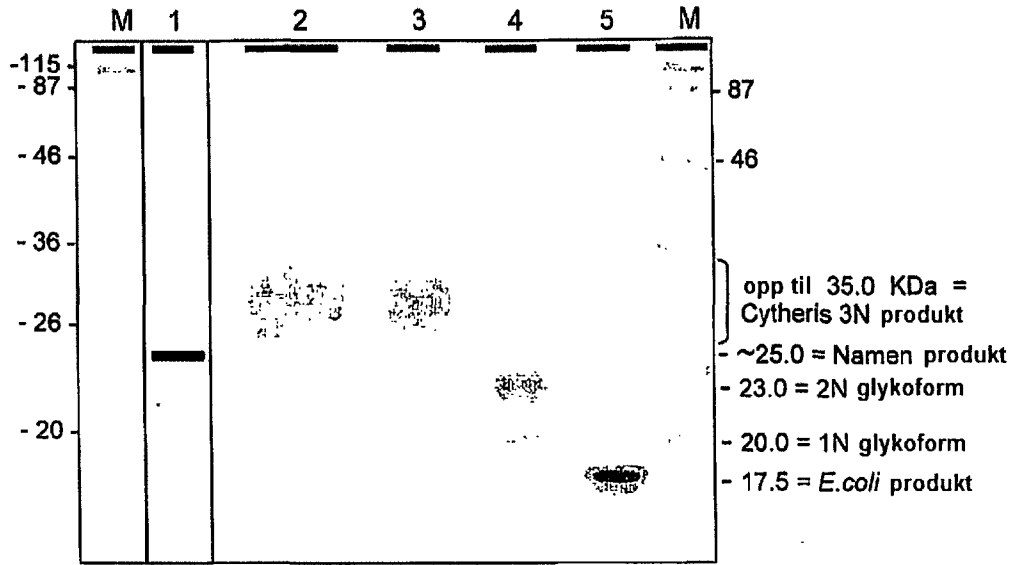
Figur 3



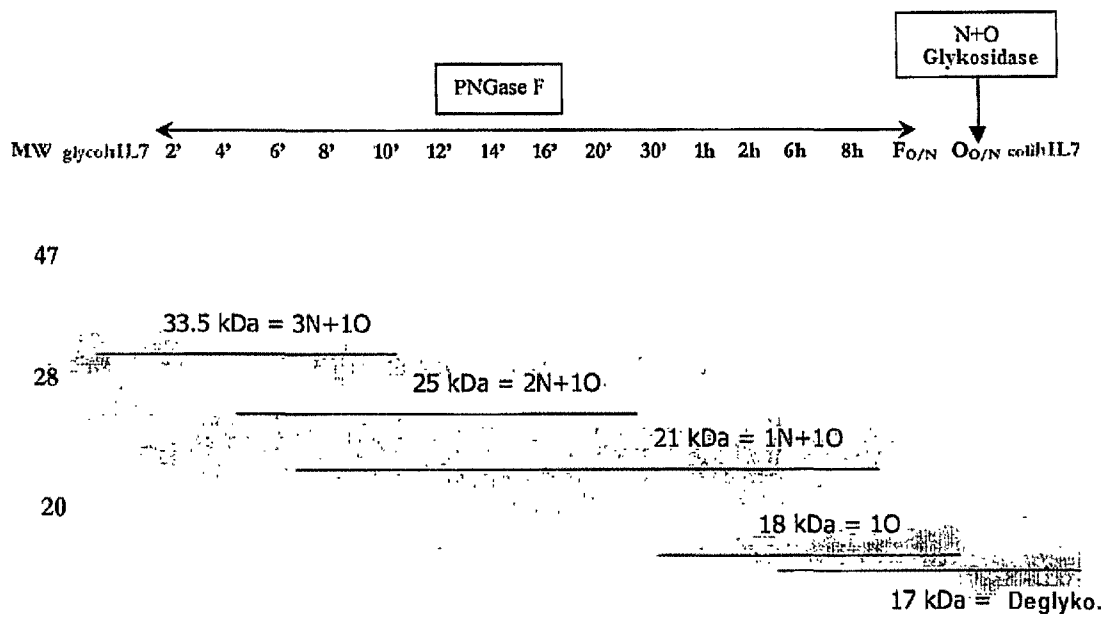
Figur 4



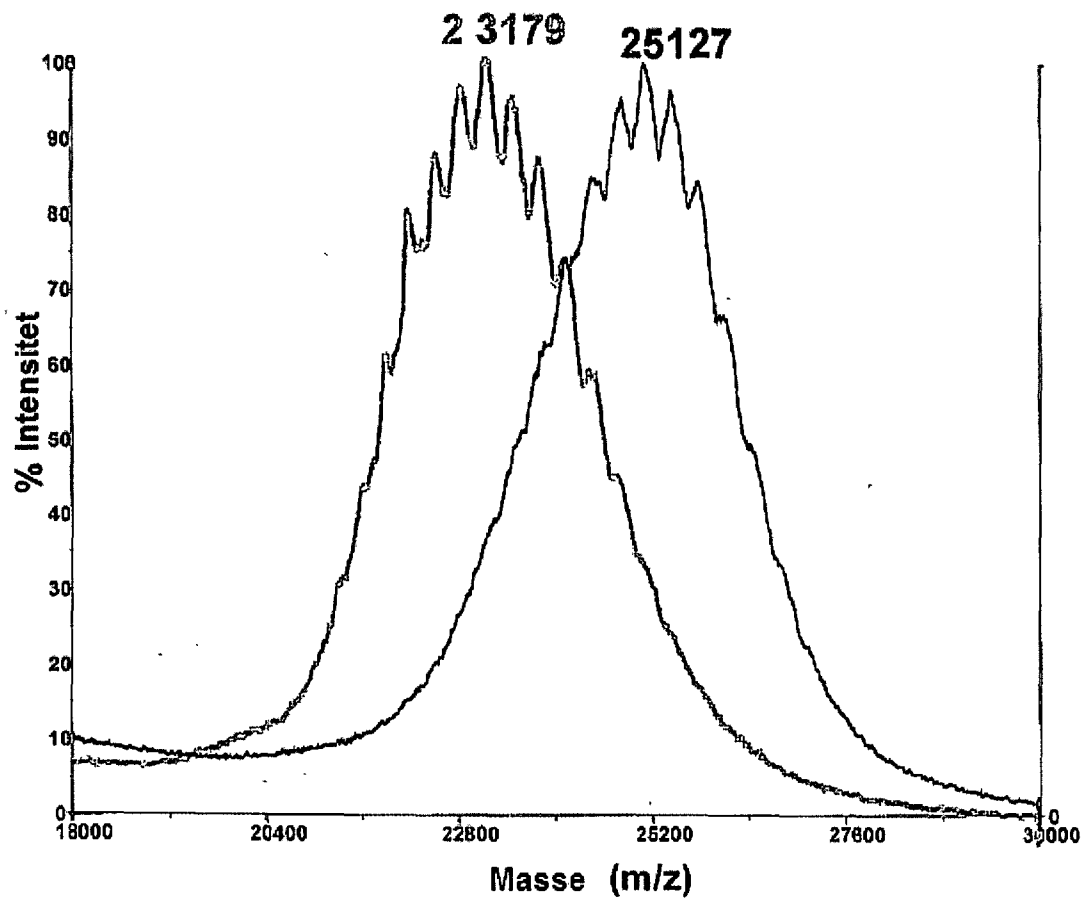
Figur 5



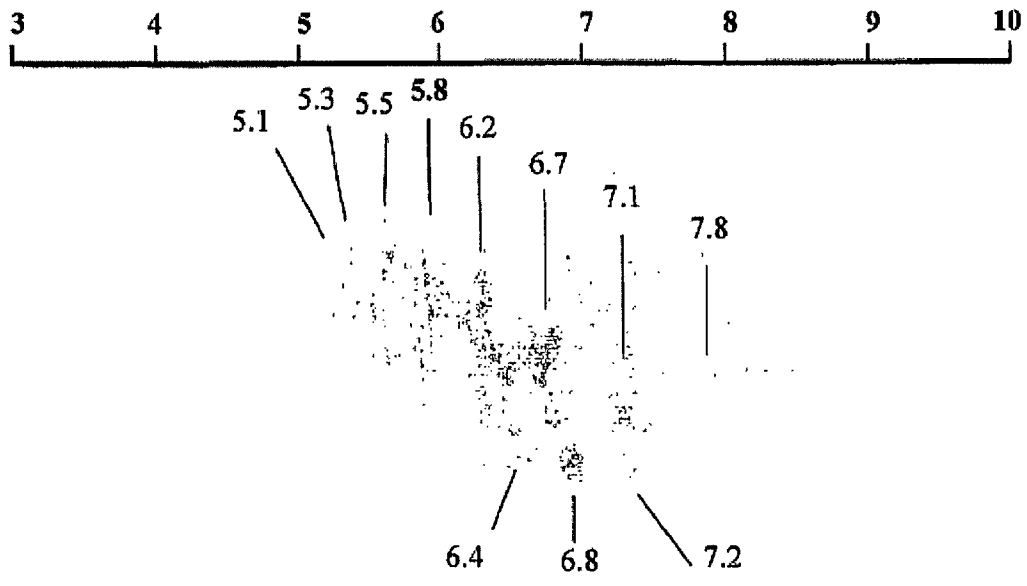
Figur 6



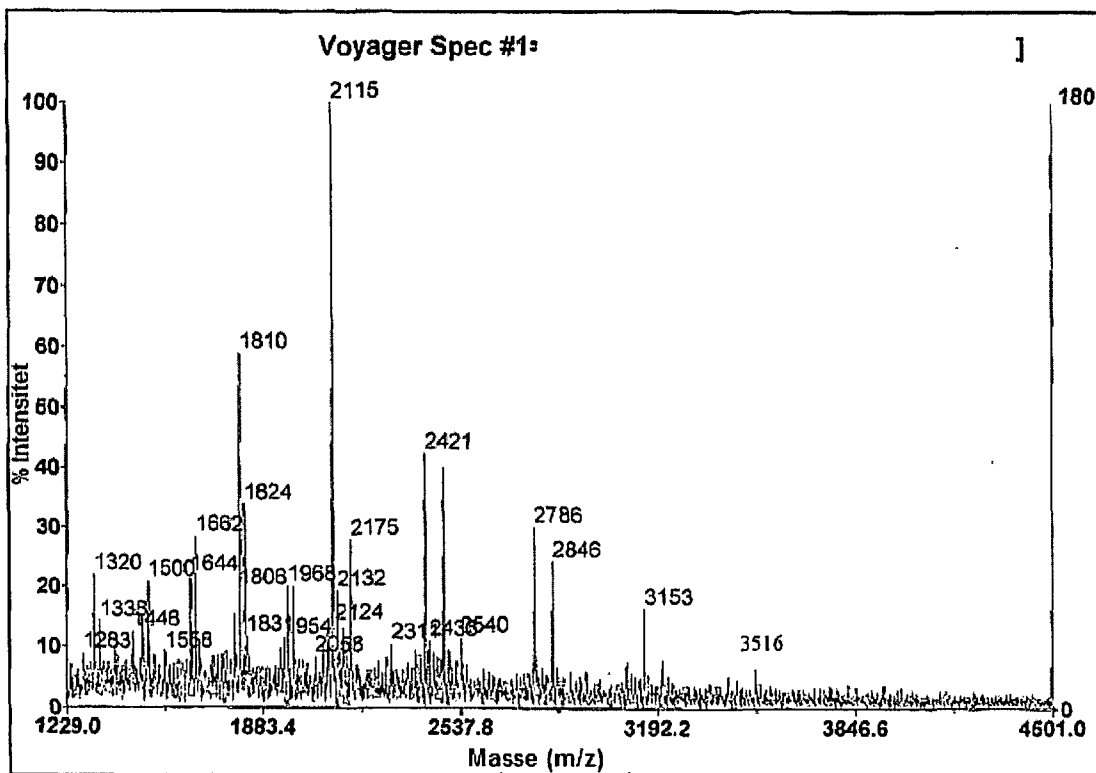
Figur 7



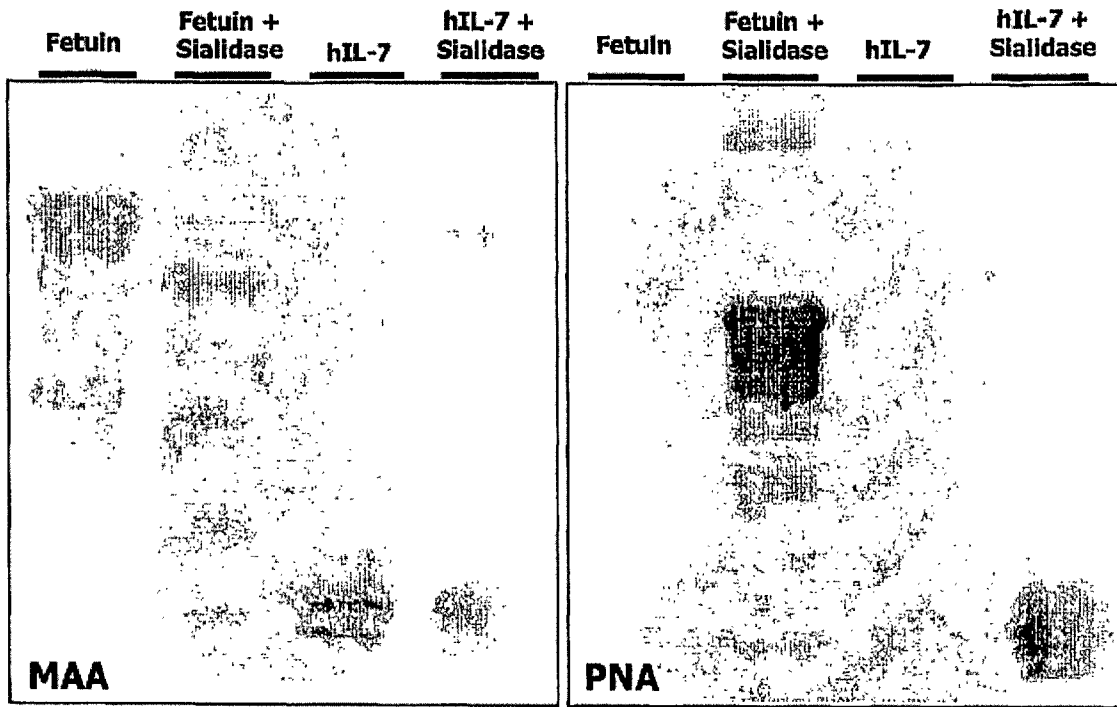
Figur 8



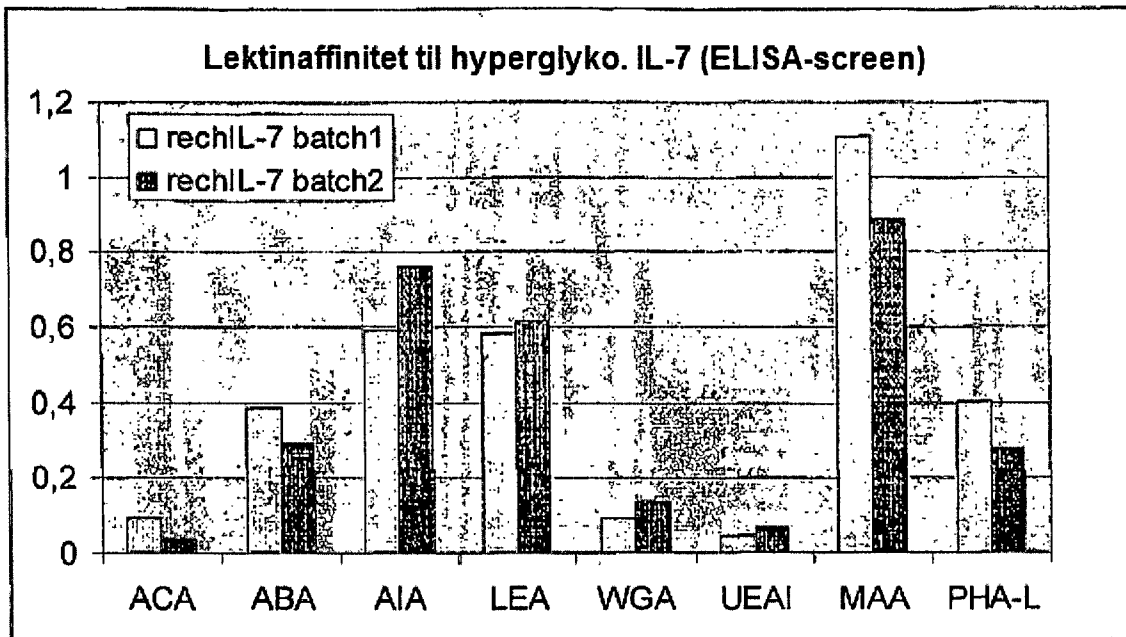
Figur 9



Figur 10

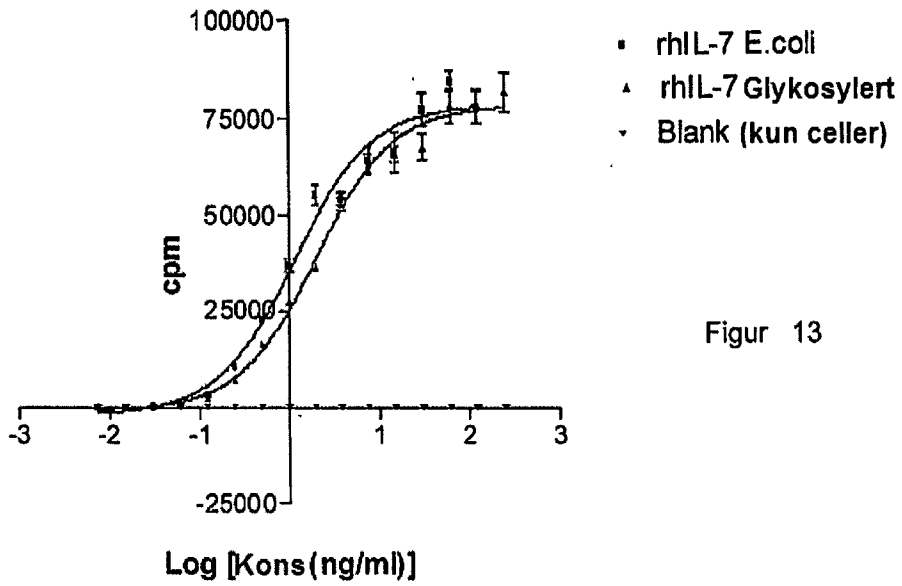


Figur 11

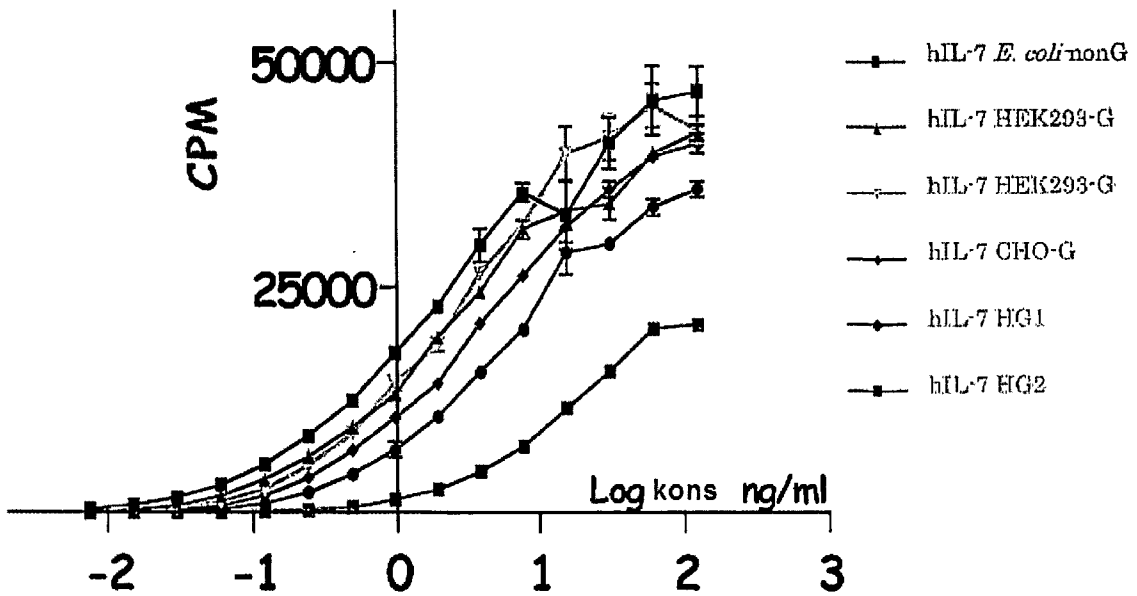


Figur 12

**IL-7 E.coli & Glykosylert  
BIOASSAY ANALYSIS**



Figur 13



Figur 14