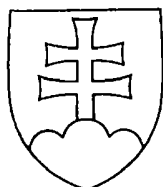


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

(11), (21) Číslo dokumentu:

294-2002

- (22) Dátum podania prihlášky: 25. 8. 2000
(31) Číslo prioritnej prihlášky: PA 1999 01197
60/160 782, PA 1999 01691, PA 2000 00194
PA 2000 00363, PA 2000 00642
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 27. 8. 1999
21. 10. 1999, 26. 11. 1999, 7. 2. 2000
7. 3. 2000, 14. 4. 2000
(33) Krajina alebo regionálna
organizácia priority: DK, US, DK, DK, DK, DK
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 6. 8. 2002
Vestník ÚPV SR č.: 8/2002
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: PCT/DK00/00471
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: WO01/15736

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

A61K 47/48

- (71) Prihlasovateľ: MAXYGEN APS, Horsholm, DK;
(72) Pôvodca: Pedersen Anders Hjelholt, Horsholm, DK;
Schambye Hans Thalsgaard, Horsholm, DK;
Andersen Kim Vilbour, Horsholm, DK;
Bornaes Claus, Horsholm, DK;
Rasmussen Poul Baad, Horsholm, DK;
(74) Zástupca: Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov: Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β , nukleotidová sekvencia, expresný vektor, hostiteľská bunka s jej obsahom, spôsob jeho prípravy, farmaceutický prostriedok s jeho obsahom a jeho použitie

(57) Anotácia:
Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β a obsahujúci aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť kovalentne pripojenú na interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným a aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre uvedenie prvej nepolypeptidovej časti. Prvou nepolypeptidovou časťou je napr. polymérna molekula alebo sacharidová molekula. Konjugát nachádza uplatnenie najmä v terapii.

SK 294-2002 A3

Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β , nukleotidová sekvencia, expresný vektor, hostiteľská bunka s jeho obsahom, spôsob jeho prípravy, farmaceutický prostriedok s jeho obsahom a jeho použitie

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka nových konjugátov interferónu β , spôsobov prípravy takýchto konjugátov a použitia takýchto konjugátov na liečbu, konkrétne na liečbu sklerózy multiplex.

Doterajší stav techniky

Interferóny sú dôležité cytokíny vyznačujúce sa protivírusovými, protiproliferatívnymi a imunomodulačnými aktivitami. Tieto aktivity tvoria základ klinicky užitočných vlastností, ktoré boli pozorované pri množstve ochorení, vrátane žltacky, rôznych druhov rakoviny a sklerózy multiplex. Interferóny sa delia na dve triedy, interferóny typu I a typu II. Interferón β patrí do triedy interferónov typu I, ktorá zahŕňa aj interferóny α , τ a ω , zatiaľ čo interferón γ je jediným známym členom odlišnej triedy typu II.

Ľudský interferón β je regulačný polypeptid s molekulovou hmotnosťou 22 kDa, ktorý pozostáva zo 166 aminokyselinových zvyškov. Môže ho produkovať väčšina buniek v tele, najmä fibroblasty, ako odpoveď na vírusovú infekciu alebo na vystavenie iným biologickým činidlám. Viaže sa na multimerný bunkový povrchový receptor a výsledkom produktívneho viazania receptora je kaskáda vnútrobunkových dejov vedúcich k expresii génov indukovateľných interferónom β , ktoré na druhej strane spôsobujú účinky, ktoré je možné klasifikovať ako protivírusové, protiproliferatívne a imunomodulačné.

Aminokyselinová sekvencia ľudského interferónu β bola publikovaná Taniguchim v Gene 10:11-15, 1980 a v EP 83069, EP 41313 a US 4686191.

Kryštalická štruktúra ľudského interferónu β bola publikovaná v Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11813-11818 a kryštalická štruktúra hlodavčieho interferónu β

bola publikovaná v J. Mol. Biol. 253:187-207, 1995. Zhrnuté boli v Cell Mol. Life Sci. 54:1203-1206, 1998.

Publikovaných bolo relatívne málo variantov interferónu β skonštruovaných proteínovým inžinierstvom (WO 9525170, WO 9848018, US 5545723, US 4914033, EP 260350, US 4588585, US 4769233, Stewart a ďalší, DNA zv. 6 č. 2 1987, str. 119-128, Runkel a ďalší, 1998, Jour. Biol. Chem. 273, č. 14, str. 8003-8008).

Bola zverejnená expresia interferónu β v CHO bunkách (US 4966843, US 5376567 a US 5795779).

Redlich a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, zv. 88, str. 4040-4044, 1991, opisujú imunoreaktivitu protilátok proti syntetickým peptidom zodpovedajúcim peptidovým reťazcom rekombinantného ľudského interferónu β s mutáciou C17S.

Zverejnené boli molekuly interferónu β s konkrétnym glykozylačným vzorom a spôsoby ich prípravy (EP 287075 a EP 539300).

Rôzne publikácie opisujú modifikáciu polypeptidov polymérovou konjugáciou alebo glykozyláciou. Zverejnené boli modifikácie prirodzeného interferónu β alebo jeho C17S variantu (EP 229108, US5382657, US 4917888 a WO99/55377). US 4904584 opisuje PEGylované polypeptidy so zníženým obsahom lyzínu, v ktorých bol najmenej jeden lyzínový zvyšok deletovaný alebo nahradený iným aminokyselinovým zvyškom. WO99/67291 opisuje spôsob konjugácie proteínu s PEG, pričom aspoň jeden aminokyselinový zvyšok proteínu je deletovaný a proteín sa uvádza do kontaktu s PEG v podmienkach postačujúcich na dosiahnutie konjugácie proteínu. WO 99/03887 opisuje PEGylované varianty polypeptidov patriacich do superrodiny rastových hormónov, v ktorých bol cysteínový zvyšok substituovaný neesenciálnym aminokyselinovým zvyškom nachádzajúcim sa v špecifickej oblasti polypeptidu. Interferón β je uvádzaný ako príklad polypeptidu patriaceho do superrodiny rastových hormónov. WO 00/23114 opisuje glykozylovaný a pegylovaný interferón β . WO 00/23472 opisuje interferón β fúzované proteíny. WO 00/26345 opisuje spôsob produkcie glykozylovaného peptidového variantu so zníženou alergénnosťou, ktorý v porovnaní so zodpovedajúcim rodičovským polypeptidom obsahuje aspoň jedno ďalšie glykozylačné miesto. US 5218092 opisuje modifikáciu faktora stimulujúceho granulocytové kolónie (G-CSF) a iných polypeptidov

zavedením aspoň jedného ďalšieho uhľovodíkového reťazca v porovnaní s prirodzeným polypeptidom. Interferón β je spomenutý ako jeden príklad spomedzi mnohých polypeptidov, ktoré môžu byť údajne modifikované technológiou opísanou v US 5218092.

Komerčné prípravky interferónu β sú predávané pod označením Betaseron[®] (označovaný aj ako interferón β 1b, ktorý nie je glykozylovaný, je produkováný použitím rekombinantných bakteriálnych buniek, má deléciu N-koncového metionínového zvyšku a C17S mutáciu) a Avonex[®] a Rebif[®] (označovaný aj ako interferón β 1a, ktoré je glykozylovaný, produkováný použitím rekombinantných cicavčích buniek) na liečbu pacientov so sklerózou multiplex a ukázalo sa, že sú účinné aj na znižovanie rýchlosti aktivácie bolesti a viac pacientov ostáva bez aktivácie bolesti dlhší čas v porovnaní s pacientmi ošetrovanými s placebom. Okrem toho sa znižuje akumulčný pomer nevládnosti (Neurol. 51: 682-689, 1998).

Porovnanie interferónu β 1a a β 1b vzhľadom na ich štruktúru a funkciu bolo prezentované vo Pharmaceut. Res. 15:641-649, 1998.

Interferón β je prvou terapeutickou intervenciou, o ktorej sa ukázalo, že odsúva progresiu sklerózy multiplex vedúcu potom k recidívam progresívneho zápalového degeneratívneho ochorenia centrálného nervového systému. Avšak mechanizmus jeho pôsobenia ostáva do veľkej miery nejasný. Ukázalo sa, že interferón β má inhibičné účinky na proliferáciu leukocytov a na prezentáciu antigénu. Okrem toho môže interferón β modulovať profil produkcie cytokínov smerom k protizápalovému fenotypu. Nakoniec, interferón β môže redukovať migráciu T buniek prostredníctvom inhibovania aktivity T-bunkových matricových metaloproteáz. Tieto aktivity pravdepodobne fungujú zosúladene a zodpovedajú za mechanizmus interferónu β v MS (Neurol. 51:682-689, 1998).

Okrem toho sa interferón β môže používať na liečbu osteosarkómu, karcinómu bazálnych buniek, cervikálnej dysplázie, gliómu, akútnej myeloidnej leukémie, multiplicitného myelómu, Hodgkinovej choroby, karcinómu prsníka, melanómu a vírusových infekcií, ako napríklad infekcie papiloma vírusom, vírusovej hepatitídy, herpes genitalis, herpes zoster, herpetickej keratitídy, herpes simplex, vírusovej encefalitídy, cytomegalovírusovej pneumónie a infekcie rinovírusom.

S používaním súčasných prípravkov interferónu β sú spojené rôzne vedľajšie účinky, vrátane injekčných vedľajších reakcií, horúčky, triašky, bolestí svalov, neuralgických bolestí kĺbov a iných symptómov podobných chrípke (Clin. Therapeutics, 19:883-893, 1997).

Okrem toho 6 až 40 % pacientov vyvíja neutralizačné protilátky proti interferónu β (Int. arch. Allergy Immunol. 118:368-371, 1999). Ukázalo sa, že vývoj neutralizačných protilátok proti interferónu β znižuje biologickú odpoveď na interferón β a spôsobuje trend poklesu liečebného účinku (Neurol. 50:1266-1272, 1998). Neutralizačné protilátky budú pravdepodobne prekážať aj terapeutickému využitiu interferónu β v spojitosti s liečbou iných ochorení (Immunol. Immuther. 39:236-268, 1994).

Vzhľadom na veľké množstvo vedľajších účinkov súčasných interferónových β produktov, ich spojenie s častým podávaním injekcií, rizikom vývoja neutralizačných protilátok brániacich požadovanému terapeutickému účinku interferónu β a vzhľadom na potenciál získania optimálnejších terapeutických hladín interferónu β spolu so sprievodným posilnením terapeutického účinku, existuje zreteľná potreba zlepšených molekúl podobných interferónu β .

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje zlepšené interferónové β molekuly poskytujúce jednu alebo viacero z vyššie uvedených požadovaných užitočných vlastností. Konkrétne poskytuje konjugáty, ktoré vykazujú aktivitu interferónu β a obsahujú najmenej jednu nepolypeptidovú časť kovalentne spojenú s interferónovým β polypeptidom, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu líšiacu sa od aminokyselinovej sekvencie divého typu ľudského interferónu β , majúceho aminokyselinovú sekvenciu uvedenú ako sekv. č.: 2, aspoň jedným aminokyselinovým zvyškom vybraným zo začleneného alebo odstráneného aminokyselinového zvyšku obsahujúceho pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť. Konjugáty podľa predloženého vynálezu majú množstvo zlepšených vlastností v porovnaní s ľudským interferónom β , vrátane redukovanej imunogénnosti, predĺženého

funkčného polčasu rozpadu *in vivo*, predĺženého sérového polčasu rozpadu a/alebo zvýšenej biologickej dostupnosti. Z toho vyplýva, že konjugát podľa vynálezu ponúka množstvo výhod oproti v súčasnosti dostupným interferónovým β zlúčeninám, vrátane predĺženia času medzi injekciami, menšieho počtu vedľajších účinkov a/alebo zvýšenej účinnosti v dôsledku redukcie protilátok. Okrem toho je možné použitím konjugátu podľa vynálezu získať vyššie dávky účinného proteínu a tým účinnejšiu terapeutickú odpoveď. Navyše pre konjugáty podľa vynálezu bola demonštrovaná významne znížená krížová reaktivita so sérami z pacientov ošetrovaných v súčasnosti dostupnými interferónovými β produktami, ako je definované nižšie.

Podstatou vynálezu je konjugát, ktorý vykazuje aktivitu interferónu β a obsahuje aspoň prvú nepolypeptidovú časť kovalentne pripojenú na interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným a aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre uvedenie prvej nepolypeptidovej časti.

V inom uskutočnení sa vynález týka konjugátu vykazujúceho aktivitu interferónu β a obsahujúceho aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť konjugovanú s aspoň jedným lyzínovým zvyškom interferónového β polypeptidu, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným lyzínovým zvyškom.

V ešte inom uskutočnení sa vynález týka konjugátu vykazujúceho aktivitu interferónu β a obsahujúceho aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť konjugovanú s aspoň jedným cysteínovým zvyškom interferónového β polypeptidu, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši aspoň jedným cysteínovým zvyškom začleneným na pozíciu, ktorú v divom type ľudského interferónu β zaujíma aminokyselinový zvyšok exponovaný na povrchu.

V ešte inom uskutočnení sa vynález týka konjugátu vykazujúceho aktivitu interferónu β a obsahujúceho aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť majúcu ako pripájaciu skupinu kyselinovú skupinu, pričom táto časť je konjugovaná aspoň s jedným zvyškom kyseliny asparágovej alebo kyseliny glutámovej interferónového β

polypeptidu, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným zvyškom kyseliny asparágovej alebo kyseliny glutámovej.

V ešte inom uskutočnení sa vynález týka konjugátu vykazujúceho aktivitu interferónu β a obsahujúceho aspoň jednu polymérnu molekulu a aspoň jednu sacharidovú časť kovalentne pripojené na interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β :

- a) aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre polymérovú molekulu a
- b) aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre sacharidovú časť,

s podmienkou, že keď je pripájacou skupinou pre polymérnu molekulu cysteínový zvyšok a sacharidovou časťou je N-spojená sacharidová časť, cysteínový zvyšok nie je začlenený takým spôsobom, aby zrušil N-glykozylačné miesto.

V ešte inom uskutočnení sa vynález týka konjugátu vykazujúceho aktivitu interferónu β a obsahujúceho interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným glykozylačným miestom a ďalej konjugát obsahuje aspoň jednu nePEGylovanú sacharidovú časť pripojenú na začlenené glykozylačné miesto.

V ešte inom uskutočnení sa vynález týka konjugátu vykazujúceho aktivitu interferónu β a obsahujúceho interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β v tom, že glykozylačné miesto sa začlenilo alebo odstránilo zavedením alebo odstránením aminokyselinového zvyšku (zvyškov) tvoriaceho časť glykozylačného miesta v polohe, ktorú v divom type ľudského interferónu β zaujíma povrchovo exponovaný aminokyselinový zvyšok.

V ešte ďalšom uskutočnení sa vynález týka konjugátu vykazujúceho aktivitu interferónu β a obsahujúceho sacharidovú časť kovalentne pripojenú na interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným odstráneným glykozylačným miestom.

V ešte ďalších uskutočneniach sa vynález týka prostriedkov a spôsobov prípravy konjugátu alebo interferónového β polypeptidu na použitie podľa vynálezu, vrátane prípravy nukleotidových sekvencií a expresných vektorov kódujúcich polypeptid, ako aj spôsobov prípravy polypeptidu alebo konjugátu.

Vo finálnych uskutočneniach sa vynález týka terapeutického prostriedku obsahujúceho konjugát podľa vynálezu, ďalej sa týka konjugátu alebo prostriedku podľa vynálezu na použitie na liečenie, použitia konjugátu alebo prostriedku na liečenie alebo na výrobu lieku na liečenie ochorení.

Predložená prihláška sa odvoláva na množstvo publikácií. Všetky sú mienené ako začlenené do tohto opisu prostredníctvom ich citácie.

Definície

V kontexte predloženej prihlášky a vynálezu sú aplikované nasledujúce definície:

Výraz "konjugát" (alebo zameniteľne "konjugovaný polypeptid") je mienený ako označenie heterogénnej (v zmysle zložený alebo chimérny) molekuly tvorenej kovalentným pripojením jedného alebo viacerých polypeptidov na jednu alebo viacero nepolypeptidových častí. Výraz kovalentné pripojenie znamená, že polypeptid a nepolypeptidová časť sú spojené buď priamo navzájom kovalentne, alebo sú spojené kovalentne nepriamo prostredníctvom intervenujúcej časti alebo častí, ako napríklad mostíkovej, oddeľovacej alebo spojovníkovej častí (častí) použitím pripájacej skupiny nachádzajúcej sa v polypeptide. Výhodne je konjugát rozpustný v relevantných koncentráciách a podmienkach, tzn. rozpustný vo fyziologických tekutinách, ako napríklad v krvi. Príklady konjugovaných polypeptidov podľa vynálezu zahŕňajú glykozylované a/alebo PEGylované polypeptidy. Výraz "nekonjugovaný polypeptid" môže byť použitý na označenie polypeptidovej časti konjugátu.

Výraz "nepolypeptidová časť" je mienený ako označenie molekuly, ktorá je schopná konjugovať s pripájacou skupinou polypeptidu podľa vynálezu. Výhodné príklady takejto molekuly zahŕňajú polymérové molekuly, sacharidové časti, lipofilné zlúčeniny alebo organické derivatizačné činidlá. Keď sa bude používať v kontexte

konjugátu podľa vynálezu, bude zrejmé, že nepolypeptidová časť je spojená s polypeptidovou časťou konjugátu prostredníctvom pripájacej skupiny polypeptidu.

Výraz "polymérna molekula" je definovaný ako molekula tvorená kovalentnou väzbou dvoch alebo viacerých monomérov, pričom žiadny z monomérov nie je aminokyselinovým zvyškom, s výnimkou keď je polymérom ľudský albumín alebo iný vo veľkom množstve sa vyskytujúci plazmatický proteín. Výraz "polymér" môže byť používaný zameniteľne s výrazom "polymérna molekula". Výraz je mienený tak, že pokrýva uhľovodíkové molekuly pripojené prostredníctvom *in vitro* glykozylácie, tzn. uskutočňovaním syntetickej *in vitro* glykozylácie normálne zahŕňajúcej kovalentné pripájanie uhľovodíkovej molekuly na pripájaciu skupinu polypeptidu, voliteľne použitím zosieťovacieho činidla. Uhľovodíkové molekuly pripájané *in vivo* glykozyláciou, ako napríklad N- alebo O-glykozyláciou (ako je podrobnejšie opísané nižšie) sú tu označované ako "sacharidové časti". S výnimkou prípadov, kedy je počet nepolypeptidových častí, ako napríklad polymérnych molekúl alebo sacharidových častí, v konjugáte konkrétne uvedený, každé odvolanie sa na "nepolypeptidovú časť" nachádzajúcu sa v konjugáte alebo inak použitú v predložnom vynáleze, má byť označením jednej alebo viacerých nepolypeptidových častí, ako napríklad polymérnej molekuly (molekúl) alebo sacharidových častí, v konjugáte.

Výraz "pripájací skupina" je mienený ako označenie aminokyselinovej zvyškovej skupiny polypeptidu, ktorá je schopná pripojiť relevantnú nepolypeptidovú časť. Napríklad na konjugáciu polyméru, najmä PEG, je často používanou pripájacou skupinou ϵ -aminokyselinová skupina lyzínu alebo N-koncová aminoskupina. Iné skupiny na pripájanie polymérov zahŕňajú voľnú karboxykyselinovú skupinu (napr. C-koncový aminokyselinový zvyšok alebo zvyšok kyseliny asparágovej alebo kyseliny glutámovej), vhodne aktivované karbonylové skupiny, oxidizované uhľovodíkové časti a merkapto skupiny.

Pre *in vivo* N-glykozyláciu sa výraz "pripájací skupina" používa nekonvenčným spôsobom na označenie aminokyselinových zvyškov tvoriacich N-glykozylačné miesto (so sekvenciou N-X'-S/T/C-X'', kde X' znamená aminokyselinový zvyšok s výnimkou prolínu, X'' znamená aminokyselinový zvyšok, ktorý môže, ale nemusí byť identický s X' a výhodne nie je prolín, N znamená asparagín

a S/T/C znamená buď serín, alebo treonín, alebo cisteín, výhodne serín alebo treonín a najvýhodnejšie treonín). Hoci je asparagínový zvyšok N-glykozylačného miesta zvyškom, na ktorý sa v priebehu glykozylácie pripája sacharidová časť, takéto pripojenie nie je možné dosiahnuť, ak nie sú prítomné iné aminokyselinové zvyšky N-glykozylačného miesta. Z toho vyplýva, že ak je nepolypeptidovou časťou N-pripojená sacharidová časť, výraz "aminokyselinový zvyšok obsahujúci pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť", ako je používaný v spojitosti so zmenami aminokyselinovej sekvencie rodičovského polypeptidu, sa má chápať tak, že aminokyselinové zvyšky tvoriace N-glykozylačné miesto sa musia zmeniť takým spôsobom, aby sa do aminokyselinovej sekvencie buď zaviedlo N-glykozylačné miesto, alebo aby sa z tejto sekvencie odstránilo. Pre "O-glykozylačné miesto" je pripájacou skupinou OH-skupina serínového alebo treonínového zvyšku.

Výraz "jeden rozdiel" alebo "líši sa od", ako je používaný v spojitosti so špecifickými mutáciami, je formulovaný tak, aby umožnil uvedenie ďalších rozdielov vyskytujúcich sa okrem špecifikovanej aminokyselinovej rozdielnosti. Napríklad, okrem odstránenia a/alebo začlenenia aminokyselinových zvyškov obsahujúcich pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť, môže interferónový β polypeptid obsahovať iné substitúcie, ktoré nemajú vzťah k začleneniu a/alebo odstráneniu uvedených aminokyselinových zvyškov. Výraz "aspoň jeden", ako je používaný v súvislosti s nepolypeptidovou časťou, aminokyselinovým zvyškom, substitúciou, atď., je mienené ako označujúci jeden alebo viac. Výrazy "mutácia" a "substitúcia" sú tu používané zameniteľne.

V predloženej prihláške sú názvy aminokyselín a atómov (napr. CA, CB, CD, CG, SG, NZ, N, O, C, atď.) používané v súlade s definovaním v Protein DataBank (PDB) (www.pdb.org), ktoré je založené na IUPAC nomenklatúre (IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (residue names, atom names e.t.c.), Eur. J. Biochem, 138, 9-37 (1984) spolu s ich opravami v Eur. J. Biochem., 152, 1 (1985)). CA je niekedy uvádzané ako C α , CB ako C β . Výraz "aminokyselinový zvyšok" je mienený ako označenie aminokyselinového zvyšku nachádzajúceho sa v skupine, ktorá zahŕňa alanínový (Ala alebo A), cisteínový (Cys alebo C) zvyšok, zvyšok kyseliny asparágovej (Asp alebo D), kyseliny glutámovej (Glu alebo E), fenylalanínový (Phe alebo F), glycínový (Gly alebo G),

histidínový (His alebo H), izoleucínový (Ile alebo I), lyzínový (Lys alebo K), leucínový (Leu alebo L), metionínový (Met alebo M), asparagínový (Asn alebo N), prolínový (Pro alebo P), glutamínový (Gln alebo Q), arginínový (Arg alebo R), serínový (Ser alebo S), treonínový (Thr alebo T), valínový (Val alebo V), tryptofánový (Trp alebo W) a tyrozínový (Tyr alebo Y) zvyšok. Nasleduje ilustrácia terminológie používanej na identifikáciu aminokyselinových polôh/substitúcií: C17 (označuje polohu č. 17, v ktorej sa nachádza cysteínový zvyšok, v aminokyselinovej sekvencii znázornenej ako sekv. č. 2). C17S (označuje, že cysteínový zvyšok v polohe 17 bol nahradený serínom). Tu používané číslovanie aminokyselinových zvyškov je relatívne k aminokyselinovej sekvencii uvedenej ako sekv. č. 2. "M1del" je používané na označenie delécie metionínového zvyšku nachádzajúceho sa v polohe 1. Viacnásobné substitúcie sú označované znamienkom "+", napr. R17N+D73T/S znamená aminokyselinovú sekvenciu, ktorá obsahuje substitúciu arginínového zvyšku v polohe 71 asparagínom a substitúciu zvyšku kyseliny asparágovej v polohe 73 treonínovým alebo serínovým zvyškom, výhodne treonínovým zvyškom. T/S používané tu vo vzťahu k určitej substitúcii znamená buď T, alebo S zvyšok, výhodne T zvyšok.

Výraz "nukleotidová sekvencia" je mienený ako označenie neprerušovaného reťazca dvoch alebo viacerých nukleotidových molekúl. Nukleotidová sekvencia môže byť genomického, cDNA, RNA, semisyntetického, syntetického pôvodu alebo kombinovaného pôvodu.

Výraz "interferónová β proteínová sekvenčná rodina" je používaný v jeho bežnom význame, tzn. na označenie skupiny polypeptidov s dostatočne homologickými aminokyselinovými sekvenciami, aby bolo možné priradenie sekvencií, napr. použitím CLUSTALW programu. Interferónová β sekvenčná rodina je dostupná napr. z PFAM families, verzia 4.0, alebo môže byť pripravená použitím vhodného počítačového programu, ako napríklad CLUSTALW verzia 1.74 použitím parametrov odlišností (Thompson a ďalší, 1994, CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Research, 22:4673-4680).

Výraz "polymerázová reťazová reakcia" alebo "PCR" vo všeobecnosti označuje spôsob amplifikácie požadovanej nukleotidovej sekvencie *in vitro*, ako je

to opísané napríklad v US 4683195. Vo všeobecnosti zahŕňa PCR metóda opakované cykly syntéz predĺžovaním primerov použitím oligonukleotidových primerov schopných preferenčne hybridizovať s templátovou nukleovou kyselinou.

"Bunka", "hostiteľská bunka", "bunková línia" a "bunková kultúra" sú tu používané zameniteľne a všetky tieto výrazy by mali byť chápané tak, že zahŕňajú potomstvo vzniknuté pestovaním alebo kultivovaním bunky. "Transformácia" a "transfekcia" sú používané zameniteľne na označenie procesu zavádzania DNA do bunky.

"Operatívne spojený" označuje kovalentné spojenie dvoch alebo viacerých nukleotidových sekvencií prostredníctvom enzymatickej ligácie alebo iným spôsobom v takej vzájomnej konfigurácii, že sa môže uskutočňovať normálna funkcia sekvencií. Napríklad nukleotidová sekvencia kódujúca pre-sekvenciu alebo sekrečnú vedúcu sekvenciu je operatívne spojená s nukleotidovou sekvenciou pre polypeptid, ak sa exprimuje ako pre-proteín, ktorý sa podieľa na vylučovaní polypeptidu; promótor alebo zosilovač je operatívne spojený s kódujúcou sekvenciou, ak ovplyvňuje transkripciu sekvencie; ribozóm viažuce miesto je operatívne spojené s kódujúcou sekvenciou, ak je umiestnené tak, aby uľahčovalo transláciu. Vo všeobecnosti znamená "operatívne spojený" to, že nukleotidové sekvencie, ktoré sú spojené, sú kontinuálne, a v prípade sekrečnej vedúcej sekvencie kontinuálne a v čítacom rámci. Spojenie sa uskutočňuje ligáciou v bežných restričných miestach. Ak takéto miesta neexistujú, používajú sa syntetické oligonukleotidové adaptory alebo spojovníky v spojení so štandardnými metódami rekombinantnej DNA.

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

Výraz "imunogénnosť", ako je používaný v súvislosti s určitou látkou, je mienený ako označenie schopnosti látky indukovať odpoveď imunitného systému. Imunitnou odpoveďou môže byť bunkovo sprostredkovaná alebo protilátkovo

sprostredkovaná odpoveď (podrobnejšiu definíciu imunogénnosti pozri napr. v Roitt: Essential Immunology (8. vydanie, Blackwell)). Imunogénnosť môže byť stanovená použitím akéhokoľvek vhodného spôsobu známeho v oblasti, napr. *in vivo* alebo *in vitro*, napr. použitím *in vitro* testu imunogénnosti opísaného nižšie v časti Materiály a metódy. Výraz "znížená imunogénnosť" je mienený ako označenie toho, že konjugát alebo polypeptid podľa predloženého vynálezu spôsobuje merateľne nižšiu imunitnú odpoveď ako referenčná molekula, ako napríklad divý typ ľudského interferónu β , napr. Rebif alebo Avonex, alebo variant divého typu ľudského interferónu β , ako napríklad Betaseron, keď sa meria v porovnateľných podmienkach. Keď sa tu odvolávame na komerčne dostupné produkty interferónu β (tzn. Betaseron, Avonex a Rebif), treba tomu rozumieť tak, že to znamená buď formulovaný produkt, alebo interferónovú β polypeptidovú časť produktu (podľa toho ako je to vhodné). Normálne indikuje znížená protilátková reaktivita (napr. reaktivita s protilátkami nachádzajúcimi sa v sére pacientov ošetrovaných komerčnými produktami interferónu β) zníženú imunogénnosť.

Výraz "funkčný *in vivo* polčas rozpadu" je používaný vo svojom normálnom význame, tzn. čas, v priebehu ktorého sa zachováva 50 % danej funkčnosti polypeptidu alebo konjugátu (ako napríklad čas, v priebehu ktorého je v tele/cieľovom orgáne detegovateľných ešte 50 % biologickej aktivity polypeptidu alebo konjugátu, alebo čas, v priebehu ktorého aktivita polypeptidu alebo konjugátu predstavuje 50 % počiatočnej hodnoty). Ako alternatívu k stanovovaniu funkčného *in vivo* polčasu rozpadu je možné stanovovať "sérový polčas rozpadu", tzn. čas, v priebehu ktorého cirkuluje v plazme alebo krvnom riečišti 50 % polypeptidových alebo konjugátových molekúl, pred tým, ako sa odstránia. Stanovovanie sérového polčasu rozpadu je často jednoduchšie ako stanovovanie funkčného *in vivo* polčasu rozpadu a hodnota sérového polčasu rozpadu je zvyčajne dobrou indikáciou hodnoty funkčného *in vivo* polčasu rozpadu. Alternatívne výrazy sérového polčasu rozpadu zahŕňajú "plazmatický polčas rozpadu", "obehový polčas rozpadu", "odstránenie zo séra", "odstránenie z plazmy" a "polčas odstránenia". Funkčnosť, ktorá sa má zachovávať, je normálne vybraná z protivírusovej, protiproliferatívnej, imunomodulačnej alebo receptor viažucej aktivity. Funkčný *in vivo* polčas rozpadu a sérový polčas rozpadu

sa môžu stanovovať akýmkoľvek vhodným spôsobom známym v oblasti, ako je podrobne diskutované v nižšie uvedenej časti Materiály a metódy.

Polypeptid alebo konjugát sa normálne odstraňujú pôsobením jedného alebo viacerých retikuloendoteliálnych systémov (RES), obličiek, sleziny alebo pečene alebo špecifickou alebo nešpecifickou proteolýzou. Odstraňovanie uskutočňujúce sa obličkami môže byť označované aj ako "obličkové odstraňovanie" a uskutočňuje sa napr. glomerulárnou filtráciou, tubulárnym vylučovaním alebo tubulárnou elimináciou. Normálne odstraňovanie závisí na fyzikálnych vlastnostiach konjugátu zahŕňajúc molekulovú hmotnosť, veľkosť (priemer) (vo vzťahu k hranici glomerulárnej filtrácie), náboj, symetriu, tvar/stálosť, pripojené uhľovodíkové reťazce a prítomnosť bunkových receptorov pre proteín. Molekulová hmotnosť 67 kDa je považovaná za dôležitú hraničnú hodnotu obličkového odstraňovania.

Zníženie odstraňovania obličkami sa môže stanovovať akýmkoľvek vhodným testom, napr. zavedeným *in vivo* testom. Typicky sa odstraňovanie obličkami determinuje podávaním značeného (napr. rádioaktívne značeného alebo fluorescenčne značeného) polypeptidového konjugátu pacientovi a meraním aktivity značky v moči odobranom pacientovi. Zníženie odstraňovania obličkami sa stanovuje vo vzťahu ku zodpovedajúcemu nekonjugovanému polypeptidu alebo nekonjugovanému zodpovedajúcemu divému typu polypeptidu alebo komerčnému interferónovému β produktu v porovnateľných podmienkach.

Výraz "predĺžený", ako sa používa vo vzťahu k funkčnému *in vivo* polčasu rozpadu alebo sérovému polčasu rozpadu, sa používa na označenie toho, že relevantný polčas rozpadu konjugátu alebo polypeptidu je štatisticky významne dlhší v porovnaní s referenčnou molekulou, ako napríklad nekonjugovaným divým typom ľudského interferónu β (napr. Avonex alebo Rebif) alebo nekonjugovaným variantom ľudského interferónu β (napr. Beraseron), pri stanovovaní v porovnateľných podmienkach.

Výraz "znížená imunogénnosť a/alebo predĺžený funkčný *in vivo* polčas rozpadu a/alebo predĺžený sérový polčas rozpadu" má byť chápaný ako pokrývajúci jednu, dve alebo všetky tieto vlastnosti. Výhodne má konjugát alebo polypeptid podľa vynálezu aspoň dve z týchto vlastností, tzn. zníženú imunogénnosť a predĺžený funkčný *in vivo* polčas rozpadu, zníženú imunogénnosť a predĺžený

sérový polčas rozpadu alebo predĺžený funkčný *in vivo* polčas rozpadu a predĺžený sérový polčas rozpadu. Najvýhodnejšie má konjugát alebo polypeptid podľa vynálezu všetky tieto vlastnosti.

Výraz "vykazujúci aktivitu interferónu β " je mienený ako označenie toho, že polypeptid alebo konjugát má jednu alebo viacero funkcií prirodzeného interferónu β , najmä ľudského divého typu interferónu β s aminokyselinovou sekvenciou uvedenou ako sekv. č.:2 (ktorá je zreloou sekvenciou), ktorý sa voliteľne exprimuje v glykozylujúcej hostiteľskej bunke, alebo komerčne dostupných produktov interferónu β . Takéto funkcie zahŕňajú schopnosť viazať sa na interferónový receptor, ktorý je schopný viazať interferón β a iniciovať vnútrobunkovú signalizáciu z receptora, najmä na interferónový receptor typu I pozostávajúci z receptorových podjednotiek IFNAR-2 a IFNAR-1 (Domanski a ďalší, *The Journal of Biological Chemistry*, zv. 273, č. 6, str. 3144-3147, 1998, Mogensen a ďalší, *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 19: 1069-1098, 1999), a protivírusovú, protiproliferatívnu alebo imunomodulačnú aktivitu (ktoré môžu byť stanovované použitím testov známych v oblasti (napr. testov citovaných v nasledujúcom opise)). Aktivita interferónu β sa môže testovať spôsobmi známymi v oblasti, ktoré sú ilustrované v nižšie uvedenej časti Materiály a metódy.

Polypeptid alebo konjugát "vykazujúci" alebo "majúci" aktivitu interferónu β je považovaný za majúci takúto aktivitu, keď vykazuje merateľnú funkciu, napr. merateľnú receptor viažucu a stimulujúcu aktivitu (napr. pri stanovovaní primárnym alebo sekundárnym testom opísanými v časti Materiály a metódy). Polypeptid vykazujúci aktivitu interferónu β tu môže byť označený aj ako "interferónová β molekula" alebo "interferónový β polypeptid". Výraz "interferónový β polypeptid" je tu primárne používaný vo vzťahu k modifikovaným polypeptidom podľa vynálezu (majúcim začlenené alebo odstránené pripájacie skupiny pre relevantné nepolypeptidové časti).

Výraz "rodičovský interferón β " je mienený ako označenie východiskovej molekuly, ktorá sa má vylepšovať v súlade s predloženým vynálezom. Hoci rodičovský interferón β môže byť akéhokoľvek pôvodu, ako napríklad pôvodom zo stavovcov alebo cicavcov (napr. akéhokoľvek pôvodu podľa definície vo WO

00/23472), výhodne je rodičovským interferónom β divý typ ľudského interferónu β so sekv. č. 2 alebo jeho variant. "Variant" je polypeptid, ktorý sa líši jedným alebo viacerými aminokyselinovými zvyškami od rodičovského polypeptidu, normálne 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 alebo 15 aminokyselinovými zvyškami. Príklady divého typu ľudského interferónu β zahŕňajú polypeptidovú časť Avonexu alebo Rebifu. Príkladom variantu rodičovského interferónu β je Betaseron. Alternatívne môže rodičovský interferónový β polypeptid obsahovať aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je hybridnou molekulou medzi interferónom β a iným homologickým polypeptidom, ako napríklad interferónom α , voliteľne obsahujúc jednu alebo viacero ďalších substitúcií zavedených do hybridnej molekuly. Takáto hybridná molekula môže obsahovať aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa od aminokyselinovej sekvencie označenej ako sekv. č. 2 líši viac ako 10 aminokyselinovými zvyškami. Aby bola hybridná molekula užitočná v predloženej vynáleze, vykazuje aktivitu interferónu β (napr. pri stanovovaní sekundárnym testom opísaným v časti Materiály a metódy).

Výraz "funkčné miesto", ako je používaný v súvislosti s polypeptidom alebo konjugátom podľa vynálezu, je mienený ako označenie jedného alebo viacerých aminokyselinových zvyškov, ktoré sú nevyhnutné alebo sa inak podieľajú na funkcii alebo výkone interferónu β , takže sú "lokalizované" vo funkčnom mieste. Funkčným miestom je napr. receptor viažuce miesto a je ho možné stanoviť spôsobmi známymi v oblasti, výhodne analýzou štruktúry polypeptidu v komplexe s relevantným receptorom, ako napríklad interferónovým receptorom typu I pozostávajúcim z IFNAR-1 a IFNAR-2.

Konjugát podľa vynálezu

Ako je uvedené vyššie, podstatou vynálezu je konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β a obsahujúci aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť kovalentne pripojenú na interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným a aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre uvedenú prvú nepolypeptidovú časť.

Odstránením a/alebo začlenením aminokyselinových zvyškov obsahujúcich pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť je možné špecificky adaptovať polypeptid tak, aby vznikla molekula náchylnejšia na konjugáciu s vybranou nepolypeptidovou časťou na optimalizáciu konjugačného vzoru (napr. na zaistenie optimálnej distribúcie nepolypeptidových častí na povrchu interferónovej β molekuly, a tým napr. účinne zatieniť epitopy a iné povrchové časti polypeptidu bez významného ovplyvnenia jej funkcie). Napríklad začlenením pripájacích skupín sa interferónový β polypeptid posilní alebo iným spôsobom zmení čo do obsahu špecifických aminokyselinových zvyškov, na ktoré sa viaže relevantná nepolypeptidová časť, čím sa dosiahne účinná, špecifická a/alebo extenzívna konjugácia. Odstránením jednej alebo viacerých pripájacích skupín je možné zabrániť konjugácii s nepolypeptidovou časťou v oblastiach polypeptidu, v ktorých by bola takáto konjugácia nevýhodná, napr. s aminokyselinovým zvyškom umiestneným vo funkčnom mieste polypeptidu (keďže výsledkom konjugácie v takomto mieste by mohla byť inaktivácia alebo zníženie interferónovej β aktivity výsledného konjugátu v dôsledku poškodenia rozoznávania receptora). Ďalej môže byť výhodné odstrániť pripájaciu skupinu umiestnenú v blízkosti inej pripájacej skupiny, aby sa zabránilo heterogénnej konjugácii takýchto skupín.

Bude zrejmé, že aminokyselinový zvyšok obsahujúci pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť, ktorý sa má buď odstrániť, alebo začleniť, je vybraný na základe povahy nepolypeptidovej časti a vo väčšine prípadov na základe použitého spôsobu konjugácie. Napríklad, keď je nepolypeptidovou časťou polymérová molekula, ako napríklad polyetylén glykol alebo molekula odvodená od polyalkylén-oxidu, aminokyselinové zvyšky schopné fungovať ako pripájacie skupiny môžu byť vybrané zo skupiny obsahujúcej lyzín, cysteín, kyselinu asparágovú, kyselinu glutámovú a arginín. Keď je nepolypeptidovou časťou sacharidová časť, pripájacou skupinou je *in vivo* glykozylačné miesto, výhodne N-glykozylačné miesto.

Kedykoľvek sa má pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť začleniť alebo odstrániť z interferónového β polypeptidu podľa predloženého vynálezu, je poloha interferónového β polypeptidu, ktorá sa má modifikovať, bežne selektovaná nasledovne:

Poloha je výhodne umiestnená na povrchu interferónového β polypeptidu a výhodnejšie sa v nej nachádza aminokyselinový zvyšok, ktorý má viac ako 25 % svojho bočného reťazca vystavených rozpúšťadlu, výhodne má viac ako 50 % svojho bočného reťazca vystavených rozpúšťadlu. Takéto polohy boli identifikované na základe trojrozmernej analýzy štruktúry ľudskej interferónovej β molekuly, ako je opísaná nižšie v časti Materiály a metódy.

Alternatívne alebo okrem toho sa poloha, ktorá sa má modifikovať, identifikuje na základe analýzy interferónovej β proteínovej sekvenčnej rodiny. Konkrétnejšie, polohou, ktorá sa má modifikovať, môže byť pozícia, ktorú v jednom alebo viacerých členoch rodiny líšiacich sa od rodičovského interferónu β zaujíma aminokyselinový zvyšok obsahujúci relevantnú pripájaciu skupinu (keď sa takýto aminokyselinový zvyšok má začleniť), alebo ktorú v rodičovskom interferóne β , ale nie v jednom alebo viacerých iných členoch rodiny, zaujíma aminokyselinový zvyšok obsahujúci relevantnú pripájaciu skupinu (keď sa takýto aminokyselinový zvyšok má odstrániť).

Aby sa stanovila optimálna distribúcia pripájacích skupín, vypočítava sa vzdialenosť medzi aminokyselinovými zvyškami lokalizovanými na povrchu interferónovej β molekuly na základe 3D štruktúry interferónového β polypeptidu. Konkrétnejšie, stanovuje sa vzdialenosť medzi CB's aminokyselinových zvyškov obsahujúcich takéto pripájacie skupiny alebo vzdialenosť medzi funkčnou skupinou (NZ pre lyzín, CG pre kyselinu asparágovú, CD pre kyselinu glutámovú, SG pre cysteín) jedného a CB druhého aminokyselinového zvyšku obsahujúceho pripájaciu skupinu. V prípade glycínu sa používa CA namiesto CB. V interferónovej β polypeptidovej časti konjugátu podľa vynálezu je akákoľvek z uvedených vzdialeností výhodne väčšia ako 8 Å, výhodnejšie väčšia ako 10 Å, aby sa zabránilo heterogénnej konjugácii, alebo aby sa táto redukoval.

Okrem toho sa v interferónovej β polypeptidovej časti konjugátu podľa vynálezu pripájacie skupiny lokalizované v receptor viažucom mieste interferónu β výhodne odstraňovali, výhodne substitúciou aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim takúto skupinu.

Ešte ďalším všeobecne aplikovateľným prístupom na modifikáciu interferónového β polypeptidu je zatienenie, a tým zničenie alebo iné inaktivovanie epitopu nachádzajúceho sa v rodičovskom interferóne β , konjugáciou s nepolypeptidovou časťou. Epitopy ľudského interferónu β je možné identifikovať použitím spôsobov známych v oblasti, známych aj ako epitopové mapovanie, pozri napr. Romagnoli a ďalší, *J. Biol. Chem.*, 1999, 380(5):553-9; DeLisser HM, *Methods Mol. Biol.*, 1999, 96:11-20; Van de Water a ďalší, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1997, 85(3):229-35, Saint-Remy JM, *Toxicology*, 1997, 119(1):77-81 a Lane DP a Stephen CW, *Curr. Opin. Immunol.*, 1993, 5(2):268-71. Jedným spôsobom je vytvorenie fágovej displejovej knižnice exprimujúcej náhodné oligopeptidy dlhé napr. 9 aminokyselinových zvyškov. IgG1 protilátky zo špecifických antisér proti ľudskému interferónu β sa purifikujú imunoprecipitáciou a reaktívne fágy sa identifikujú imunoblotingom. Sekvenovaním DNA purifikovaných reaktívnych fágov je možné stanoviť sekvenciu oligopeptidu a potom nasleduje lokalizácia tejto sekvencie v 3D štruktúre interferónu β . Alternatívne je možné identifikovať epitopy spôsobom opísaným v US 5041376. Takto identifikovaná oblasť štruktúry tvorí epitop, ktorý potom môže byť vybraný ako cieľová oblasť na začlenenie pripájacej skupiny pre nepolypeptidovú časť. Výhodne sa aspoň jeden epitop, ako napríklad dva, tri alebo štyri epitopy, ľudského rekombinantného interferónu (voliteľne obsahujúceho C17S mutáciu) zatieňujú nepolypeptidovou časťou podľa predloženého vynálezu. Z toho vyplýva, že v jednom uskutočnení má konjugát podľa vynálezu aspoň jeden zatienený epitop v porovnaní s divým typom ľudského interferónu β , voliteľne obsahujúceho C17S mutáciu, vrátane ktoréhokoľvek komerčne dostupného interferónu β . Výhodne obsahuje konjugát podľa vynálezu polypeptid, ktorý je modifikovaný tak, aby bol zatienený epitop lokalizovaný v blízkosti aminokyselinového zvyšku Q49 a/alebo F111. To je možné uskutočniť začlenením pripájacej skupiny pre nepolypeptidovú časť do polohy lokalizovanej v blízkosti (tzn. v rámci 4 aminokyselinových zvyškov v primárnej sekvencii alebo v rámci 10 Å v terciárnej sekvencii) Q49 a/alebo F111. Vzdialenosť 10 Å je meraná medzi CB's (CA's v prípade glycínu). Takéto špecifické začleňovania sú opísané v nasledujúcich častiach.

V prípade odstraňovania pripájacej skupiny sa relevantný aminokyselinový zvyšok, obsahujúci takúto skupinu a zaujímajúci vyššie definovanú polohu, výhodne substituuje odlišným aminokyselinovým zvyškom, ktorý neobsahuje pripájaciu skupinu pre danú nepolypeptidovú časť.

V prípade začleňovania pripájacej skupiny sa aminokyselinový zvyšok obsahujúci takúto skupinu zavádza do tejto polohy výhodne substitúciou aminokyselinového zvyšku zaujímajúceho uvedenú polohu.

Presný počet pripájacích skupín prístupných na konjugáciu a nachádzajúcich sa v interferónovom β polypeptide je závislý na požadovanom účinku, ktorý sa má dosiahnuť konjugáciou. Účinok, ktorý sa má dosiahnuť, závisí napr. na povahe a stupni konjugácie (napr. identita nepolypeptidovej časti, počet nepolypeptidových častí, ktoré je želateľné alebo možné konjugovať s polypeptidom, kde majú byť konjugované, alebo kde sa má zabrániť konjugácii, atď.). Napríklad, ak je želateľná znížená imunogénnosť, počet (a lokalizácia) pripájacích skupín by mal byť dostatočný na zatienenie väčšiny alebo všetkých epitopov. To sa normálne dosiahne, keď sa zatieni väčší podiel interferónového β polypeptidu. Účinné zatienenie epitopov sa normálne získa, keď je počet pripájacích skupín dostupných na konjugáciu v rozsahu 1 až 10 pripájacích skupín, najmä v rozsahu 2 až 8, ako napríklad 3 až 7.

Funkčný *in vivo* polčas rozpadu závisí i.a. na molekulovej hmotnosti konjugátu a počte pripájacích skupín potrebných na poskytnutie predĺženého polčasu rozpadu, takže závisí na molekulovej hmotnosti danej nepolypeptidovej časti. V jednom uskutočnení má konjugát podľa vynálezu molekulovú hmotnosť aspoň 67 kDa, výhodne aspoň 70 kDa, podľa merania SDS-PAGE v súlade s Laemmli, U.K., Nature zv. 227 (1970), str. 680-85. Molekulová hmotnosť interferónu β je približne 20 kDa, takže na získanie požadovaného účinku je potrebných ďalších približne 50 kDa. Tie je možné poskytnúť napr. piatimi 10kDa PEG molekulami alebo iným, tu opísaným, spôsobom.

Aby sa zabránilo prílišnému poškodeniu štruktúry a funkcie rodičovskej ľudskej interferónovej β molekuly, celkový počet aminokyselinových zvyškov, ktoré sa majú meniť v súlade s predloženým vynálezom (v porovnaní s aminokyselinovou sekvenciou označenou ako sekv. č. 2), typicky nepresahuje 15. Výhodne zahŕňa

interferónový β polypeptid aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši 1 až 15 aminokyselinovými zvyškami od aminokyselinovej sekvencie označenej ako sekv. č. 2, ako napríklad 1 až 8 alebo 2 až 8 aminokyselinovými zvyškami, napr. 1 až 5 alebo 2 až 5 aminokyselinovými zvyškami, od aminokyselinovej sekvencie označenej ako sekv. č. 2. Takže normálne obsahuje interferónový β polypeptid aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od aminokyselinovej sekvencie označenej ako sekv. č. 2 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 alebo 15 aminokyselinovými zvyškami. Výhodne vyššie uvedené čísla predstavujú buď celkový počet začlenených alebo celkový počet odstránených aminokyselinových zvyškov obsahujúcich pripájaciu skupinu pre relevantnú nepolypeptidovú časť, alebo celkový počet začlenených a odstránených aminokyselinových zvyškov obsahujúcich uvedenú skupinu.

V konjugáte podľa vynálezu je výhodné, ak je aspoň ku 50 % všetkých konjugovateľných skupín, ako napríklad ku aspoň 80 % a výhodne, ak sú ku všetkým takýmto skupinám pripojené relevantné nepolypeptidové časti. Z toho vyplýva, že vo výhodnom uskutočnení konjugát podľa vynálezu obsahuje napr. 1 až 10 nepolypeptidových častí, ako napríklad 2 až 8 alebo 3 až 6.

Konjugát podľa vynálezu má jednu alebo viacero z nasledujúcich zlepšených vlastností:

- zníženú imunogénnosť v porovnaní s divým typom ľudského interferónu β (napr. Avonexom alebo Rebifom) alebo s Betaseronom, napr. zníženie o aspoň 25 %, ako napríklad o aspoň 50 % a výhodnejšie o aspoň 75 %;

- predĺžený funkčný *in vivo* polčas rozpadu a/alebo predĺžený sérový polčas rozpadu v porovnaní s divým typom ľudského interferónu β (napr. Avonexom alebo Rebifom) alebo Betaseronom;

- redukovanú alebo žiadnu reakciu s neutralizačnými protilátkami od pacientov ošetrovaných s divým typom ľudského interferónu β (napr. Rebifom alebo Avonexom) alebo s Betaseronom, napr. redukcia neutralizácie o aspoň 25 %, ako napríklad o aspoň 50 % a výhodne o aspoň 70 %;

- hodnota protivírusovej aktivity konjugátu podľa vynálezu nemusí byť kritická, takže je znížená (napr. až o 75 %) alebo zvýšená (napr. o aspoň 5 %)

alebo rovnaká, ako aktivita divého typu ľudského interferónu β (napr. Avonexu alebo Rebifu) alebo Betaseronu;

- okrem toho sa stupeň protivírusovej aktivity v porovnaní s protiproliferatívnou aktivitou konjugátu podľa vynálezu môže meniť, takže môže byť vyšší, nižší alebo rovnaký ako pri divom type ľudského interferónu β .

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

Vo výhodnom uskutočnení má prvá nepolypeptidová časť ako pripájaciu skupinu lyzín, a tak obsahuje interferónový β polypeptid aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným lyzínovým zvyškom. Hoci nepolypeptidovou časťou môže byť ktorákoľvek z častí viažucich sa na lyzínový zvyšok, napr. na jeho ϵ -aminoskupinu, ako napríklad polymérna molekula, lipofilná skupina, organické derivatizačné činidlo alebo uhľovodíková časť, výhodne je ňou ktorákoľvek z polymérnych molekúl uvedených v časti s názvom "Konjugácia s polymérnou molekulou", najmä rozvetvený alebo lineárny PEG alebo polyalkylén-oxid. Najvýhodnejšie je polymérnou molekulou PEG a aktivovanou molekulou na použitie na konjugáciu je SS-PEG, NPC-PEG, aldehyd-PEG, mPEG-SPA, mPEG-SCM, mPEG-BTC od Shearwater Polymers, Inc., SC-PEG od Enzon, Inc., trezylovaný mPEG, ako je opísaný v US 5880255 alebo oxykarbonyl-oxy-N-dikarboximid-PEG (US 5122614). Normálne má nepolypeptidová časť na konjugáciu s lyzínovým zvyškom molekulovú hmotnosť približne 5 alebo 10 kDa.

V jednom uskutočnení sa aminokyselinová sekvencia interferónového β polypeptidu líši od sekvencie ľudského divého typu interferónu β aspoň jedným odstráneným lyzínovým zvyškom, ako napríklad 1 až 5 odstránenými lyzínovými zvyškami, najmä 1 až 4 alebo 1 až 3 odstránenými lyzínovými zvyškami. Lyzínový zvyšok (zvyšky), ktorý sa má odstrániť, výhodne zamenou, je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z K19, K33, K45, K52, K99, K105, K108, K115, K123, K134 a K136. Lyzínový zvyšok (zvyšky) sa môže nahradiť akýmkoľvek aminokyselinovým zvyškom, ale výhodne sa nahrádza arginínovým alebo glutamínovým zvyškom, aby

vznikol minimálny štruktúrny rozdiel. Konkrétne môže byť polypeptidovou časťou časť, v ktorej bol K19, K45, K52 a/alebo K123, výhodne K19, K45 a/alebo K123 nahradený ktorýmkoľvek iným aminokyselinovým zvyškom, výhodne arginínom alebo glutamínom. Interferónová β polypeptidová časť konjugátu podľa vynálezu obsahuje napríklad kombináciu aminokyselinových substitúcií vybraných z nasledujúceho zoznamu:

K19R+K45R+K123R;

K19Q+K45R+K123R;

K19R+K45Q+K123R;

K19R+K45R+K123Q;

K19Q+K45Q+K123R;

K19R+K45Q+K123Q;

K19Q+K45R+K123Q;

K19Q+K45Q+K123Q;

K45R+K123R;

K45Q+K123R;

K45Q+K123Q;

K45R+K123Q;

K19R+K123R;

K19Q+K123R;

K19R+K123Q;

K19Q+K123Q;

K19R+K45R;

K19Q+K45R;

K19R+K45Q alebo

K19Q+K45Q.

Okrem toho alebo ako alternatíva k aminokyselinovým substitúciám uvedeným vyššie v zozname, môže polypeptidová časť zahŕňať aspoň jednu substitúciu vybranú zo skupiny obsahujúcej K33R, K33Q, K52R, K52Q, K99R, K99Q, K105R, K105Q, K108R, K108Q, K115R, K115Q, K134R, K134Q, K136R a K136Q, napr. aspoň jednu z nasledujúcich substitúcií:

K52R+K134R;

K99R+K136R;

K33R+K105R+K136R;

K52R+K108R+K134R;

K99R+K115R+K136R;

K19R+K33R+K45R+K123R;

K19R+K45R+K52R+K123R;

K19R+K33R+K45R+K52R+K123R alebo

K19R+K45R+K52R+K99R+K123R.

V ďalšom uskutočnení sa aminokyselinová sekvencia interferónového β polypeptidu líši od sekvencie označenej ako sekv. č. 2 v tom, že bol začlenený lyzínový zvyšok substitúciou aspoň jedného aminokyselinového zvyšku nachádzajúceho sa v polohe, ktorú v rodičovskej interferónovej β molekule zaujíma aminokyselinový zvyšok vystavený na povrchu, výhodne aminokyselinový zvyšok majúci aspoň 25 %, ako napríklad aspoň 50 % svojho bočného reťazca, vystavených na povrchu. Výhodne je aminokyselinový zvyšok, ktorý sa má substituovať, vybraný zo skupiny obsahujúcej N4, F8, L9, R11, S12, F15, Q16, Q18, L20, W22, Q23, G26, R27, L28, E29, Y30, L32, R35, M36, N37, D39, P41, E42, E43, L47, Q48, Q49, T58, Q64, N65, F67, A68, R71, Q72, D73, S75, S76, G78, N80, E81, I83, E85, N86, A89, N90, Y92, H93, H97, T100, L102, E103, L106, E107, E109, D110, F111, R113, G114, L116, M117, L120, H121, R124, G127, R128, L130, H131, E137, Y138, H140, I145, R147, V148, E149, R152, Y155, F156, N158, R159, G162, Y163, R165 a N166 sekvencie č. 2.

Výhodnejšie sa aminokyselinová sekvencia interferónového β polypeptidu líši od aminokyselinovej sekvencie označenej ako sekv. č. 2 v tom, že lyzínový zvyšok bol začlenený substitúciou aspoň jedného aminokyselinového zvyšku nachádzajúceho sa v polohe vybranej zo skupiny, ktorá zahŕňa N4, F8, L9, R11, S12, G26, R27, E29, R35, N37, D39, E42, L47, Q48, Q49, A68, R71, Q72, D73, S75, G78, N80, E85, N86, A89, Y92, H93, D110, F111, R113, L116, H121, R124, G127, R128, R147, V148, Y155, N158, R159, G162 a R165, výhodnejšie zo skupiny, ktorá zahŕňa N4, R11, G26, R27, Q48, Q49, R71, D73, S75, N80, E85, A89, Y92, H93, F111, R113, L116, R124, G127, R128, Y155, N158 a G162, a ešte

výhodnejšie zo skupiny obsahujúcej R11, Q49, R71, S75, N80, E85, A89, H93, F111, R113, L116 a Y155, a najvýhodnejšie Q49 a F111.

V súlade s týmto uskutočnením obsahuje interferónový β polypeptid substitúciu na lyzín v jednej alebo viacerých vyššie uvedených polohách, konkrétne v 1 až 15, ako napríklad 1 až 8 alebo 1 až 15, a výhodne aspoň v dvoch polohách, ako napríklad 2 až 8 alebo 2 až 5 polohách.

V ďalšom uskutočnení sa aminokyselinová sekvencia interferónovej β polypeptidovej časti konjugátu líši aspoň jedným odstráneným a aspoň jedným začleneným lyzínovým zvyškom, ako napríklad 1 až 5 alebo 2 až 5 odstránenými lyzínovými zvyškami a 1 až 5 alebo 2 až 5 začlenenými lyzínovými zvyškami. Bude zrejmé, že lyzínové zvyšky, ktoré sa majú odstrániť a začleniť, sú výhodne vyberané zo zvyškov opísaných v tejto časti.

V súlade s týmto uskutočnením vynálezu je celkový počet konjugovateľných lyzínových zvyškov výhodne v rozsahu 1 až 10, ako napríklad 2 až 8 alebo 3 až 7.

Napríklad, interferónová β polypeptidová časť konjugátu podľa tohto uskutočnenia môže obsahovať aspoň jednu z nasledujúcich substitúcií: R11K, Q48K, Q49K, R71K, S75K, N80K, E85K, A89K, H93K, F111K, R113K, L116K a Y155K; výhodnejšie R11K, Q49K, R71K, S75K, N80K, E85K, A89K, H93K, F111K, R113K, L116K a Y155K, v kombinácii s aspoň jednou zo substitúcií: K19R/Q, K33R/Q, K45R/Q, K52R/Q, K99R/Q, K105R/Q, K108R/Q, K115R/Q, K123R/Q, K134R/Q a K136R/Q, kde R/Q označuje substitúciu na R alebo Q zvyšok, výhodne na R zvyšok. Výhodnejšie interferónový β polypeptid obsahuje aspoň jednu z nasledujúcich substitúcií: R11K, Q49K, R71K, S75K, N80K, E85K, A89K, H93K, F111K, R113K, L116K a Y155K, najmä Q49K, F111K a/alebo N80K, v kombinácii s aspoň jednou substitúciou K19, K45, K52 a/alebo K123 na R alebo Y zvyšok. Interferónový β polypeptid obsahuje najmä aspoň jednu zo substitúcií Q49K, F111K a N80K v kombinácii s aspoň jednou zo substitúcií uvedených vyššie na odstraňovanie lyzínového zvyšku. Interferónový β polypeptid môže obsahovať napríklad nasledujúce substitúcie:

Y+Z+K19R+K45R+K123R;

Y+Z+K19Q+K45R+K123R;

Y+Z+K19R+K45Q+K123R;

Y+Z+K19R+K45R+K123Q;

Y+Z+K19Q+K45Q+K123R;

Y+Z+K19R+K45Q+K123Q;

Y+Z+K19Q+K45R+K123Q;

Y+Z+K19Q+K45Q+K123Q;

Y+Z+K45R+K123R;

Y+Z+K45Q+K123R;

Y+Z+K45Q+K123Q;

Y+Z+K45R+K123Q;

Y+Z+K19R+K123R;

Y+Z+K19Q+K123R;

Y+Z+K19R+K123Q;

Y+Z+K19Q+K123Q;

Y+Z+K19R+K45R;

Y+Z+K19Q+K45R;

Y+Z+K19R+K45Q alebo

Y+Z+K19Q+K45Q,

kde Y je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z Q49K, F111K, N80K, Q49K+F111K, Q49K+N80K, F111K+N80K a Q49K+F11K+N80K a Z chýba alebo zahŕňa aspoň jednu substitúciu vybranú zo skupiny obsahujúcej K33R, K33Q, K52R, K52Q, K99R, K99Q, K105R, K105Q, K108R, K108Q, K115R, K115Q, K134R, K134Q, K136R a K136Q. Výhodne interferónový β polypeptid obsahuje nasledujúcu substitúciu: Y+Z+K19R+K45Q+K123R, kde Y a Z majú vyššie uvedený význam.

Konkrétnejšie, v súlade s týmto uskutočnením môže interferónový β polypeptid obsahovať jednu z nasledujúcich substitúcií:

K19R+K45R+F111K+K123R;

K19R+K45R+Q49K+F111K+K123R;

K19R+K45R+Q49K+K123R;

K19R+K45R+F111K;

K19R+K45R+Q49K+F111K;

K19R+Q49K+K123R;

K19R+Q49K+F111K+K123R;

K45Q+F111K+K123Q;

K45R+Q49K+K123R alebo

K45R+Q49K+F111K+K123R.

Špeciálne na expresiu v neglykozyľujúcom hostiteľovi, ako napríklad v *E. coli*, môže interferónový β polypeptid obsahovať substitúciu N80K alebo C17S+N80K, voliteľne v kombinácii s jednou alebo viacerými z K19R/Q; K45R/Q; K52R/Q alebo K123R/Q. Keď sa interferónový β polypeptid exprimuje v neglykozyľujúcej hostiteľskej bunke, je substitúcia N80K výnimočne zaujímavá, keďže N80 predstavuje časť vrodeneho glykozylačného miesta ľudského interferónu β a konjugácia v takomto mieste napodobuje prirodzenú glykozyľáciu.

Okrem toho je výhodné, aby konjugát podľa tohto predmetu vynálezu obsahoval aspoň dve prvé nepolypeptidové časti, ako napríklad 2 až 8 častí.

Konjugát podľa vynálezu, v ktorom sa nepolypeptidová časť viaže na cysteínový zvyšok

Ešte ďalší predmet vynálezu sa týka konjugátu vykazujúceho aktivitu interferónu β a obsahujúceho aspoň jeden prvý nepolypeptid konjugovaný s aspoň jedným cysteínovým zvyškom interferónového β polypeptidu, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β v tom, že bol začlenený aspoň jeden cysteínový zvyšok, výhodne substitúciou, do polohy, v ktorej sa v rodičovskej interferónovej β molekule nachádza aminokyselinový zvyšok, ktorý je vystavený na povrchu molekuly, výhodne aminokyselinový zvyšok, ktorý má aspoň 25 %, ako napríklad aspoň 50 %, svojho bočného reťazca vystavených na povrchu. Aminokyselinový zvyšok je vybraný napríklad zo skupiny, ktorá obsahuje F8, L9, R11, S12, F15, Q16, Q18, L20, W22, L28, L32, M36, P41, T58, Q64, N65, F67, I83, E85, N86, A89, N90, Y92, H93, H97, T100, L102, E103, L106, M117, L120, H121, R124, G127, R128, L130, H131, H140, I145, R147, V148, E149, R152, Y155 a F156 sekvencie č. 2.

Okrem toho alebo alternatívne, substitúcia sa výhodne uskutočňuje v polohách, v ktorých sa nachádza treonínový alebo serínový zvyšok. Takáto poloha

je vybraná napríklad zo skupiny, ktorá obsahuje S2, S12, S13, T58, S74, S75, S76, T77, T82, T100, T112, S118, S119, S139, T144 a T161, výhodnejšie S2, S12, S13, S74, S75, S76, T77, T82, T100, T112, S118, S119, S139 a T144 (bočný reťazec vystavený na povrchu), ešte výhodnejšie S2, S12, S75, S76, T82, T100, S119 a S139 (na povrch vystavených aspoň 25 % bočného reťazca) a ešte výhodnejšie S2, S12, S75, T82 a T100 (na povrch vystavených aspoň 50 % bočného reťazca).

Z vyššie uvedených treonínových a serínových substitúcií sú výhodné serínové substitúcie. Z toho vyplýva, že v ešte výhodnejších uskutočneniach je poloha vybraná zo skupiny obsahujúcej S2, S12, S13, S74, S75, S76, S118, S119 a S139, výhodnejšie S2, S12, S13, S74, S75, S76, S118, S119 a S139, ešte výhodnejšie S2, S12, S75, S76, S119 a S139 a ešte výhodnejšie S12 a S75.

V jednom uskutočnení sa do interferónového β polypeptidu začleňuje len jeden cysteínový zvyšok, aby sa zabránilo vytváraniu disulfidových mostíkov medzi dvoma alebo viacerými začlenenými cysteínovými zvyškami. V tejto súvislosti je možné odstrániť C17 nachádzajúci sa v divom type ľudského interferónu β , výhodne substitúciou, najmä substitúciou s S alebo A. V inom uskutočnení sa začleňujú dva alebo viac cysteínových zvyškov, ako napríklad 2 až 6 alebo 2 až 4 cysteínové zvyšky. Interferónová β polypeptidová časť konjugátu podľa tohto uskutočnenia vynálezu výhodne obsahuje mutáciu L47C, Q48C, Q49C, D110C, F111C alebo R113C, výhodne len jednu z týchto mutácií, voliteľne v kombinácii s mutáciou C17S. Interferónový β polypeptid môže obsahovať aj substitúciu C17S+N80C.

Hoci prvou nepolypeptidovou časťou môže byť v súlade s týmto predmetom vynálezu akákoľvek molekula, ktorá, použijúc danú konjugačnú metódu, má cysteín ako pripájajúcu skupinu (ako napríklad uhľovodíková časť, lipofilná skupina alebo organické derivatizačné činidlo), je výhodné, aby bola nepolypeptidovou časťou polymérna molekula. Polymérnou molekulou môže byť ktorákoľvek z molekúl uvedených v časti s názvom "Konjugácia s polymérnou molekulou", ale výhodne je vybraná zo skupiny obsahujúcej lineárny alebo rozvetvený polyetylén glykol alebo polyalkylén oxid. Najvýhodnejšou polymérnou molekulou je VS-PEG. Konjugáciu medzi polypeptidom a polymérom je možné dosiahnuť akýmkoľvek vhodným spôsobom, ako je opísané napr. v časti s názvom "Konjugácia s polymérnou

molekulou", napr. použitím jedнокrokového spôsobu alebo postupného spôsobu, ktoré sú opísané v uvedenej časti. Ak interferónový β polypeptid obsahuje len jeden konjugovateľný cysteínový zvyšok, výhodne sa konjuguje s prvou nepolypeptidovou časťou s molekulovou hmotnosťou najmenej 20 kDa, buď priamou konjugáciou, alebo nepriamo prostredníctvom polyméru s nízkou molekulovou hmotnosťou (ako je opísané vo WO 99/55377). Ak konjugát obsahuje dve alebo viac prvých nepolypeptidových častí, má normálne každá z nich molekulovú hmotnosť 5 alebo 10 kDa.

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

Ďalej sa vynález týka konjugátu vykazujúceho aktivitu interferónu β a obsahujúceho aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť majúcu kyselinovú skupinu ako pripájajúcu skupinu, ktorá je konjugovaná s aspoň jedným zvyškom kyseliny asparágovej alebo aspoň jedným zvyškom kyseliny glutámovej interferónového β polypeptidu, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným zvyškom kyseliny asparágovej alebo zvyškom kyseliny glutámovej. Relevantný aminokyselinový zvyšok môže byť začlenený do ktorejkoľvek polohy, v ktorej sa nachádza aminokyselinový zvyšok, ktorý je vystavený na povrchu molekuly, výhodne aminokyselinový zvyšok, ktorý má aspoň 25 % svojho bočného reťazca vystavených na povrchu. Výhodne bol aspoň jeden aminokyselinový zvyšok nachádzajúci sa v polohe vybranej zo skupiny, ktorá obsahuje N4, L5, L6, F8, L9, Q10, R11, S12, S13, F15, Q16, Q18, K19, L20, W22, Q23, L24, N25, G26, R27, Y30, M36, Q46, Q48, Q49, I66, F67, A68, I69, F70, R71, S75, T82, I83, L87, A89, N90, V91, Y92, H93, Q94, I95, N96, H97, K108, F111, L116, L120, K123, R124, Y126, G127, R128, L130, H131, Y132, K134, A135, H140, T144, R147, Y155, F156, N158, R159, G162, Y163 a R165, substituovaný zvyškom kyseliny asparágovej alebo zvyškom kyseliny glutámovej.

Výhodnejšie je poloha vybraná zo skupiny, ktorá obsahuje N4, L5, F8, L9, R11, S12, F15, Q16, Q18, K19, W22, Q23, G26, R27, Y30, M36, Q46, Q48, Q49, A68, R71, S75, T82, A89, N90, Y92, H93, N96, H97, K108, F111, L116, L120, K123, R124, G127, R128, L130, H131, K134, A135, H140, Y155, N158, R159,

G162, Y163 a R165, ako napríklad zo skupiny, ktorá obsahuje N4, L5, F8, S12, F15, Q16, K19, W22, Q23, R27, Y30, M36, Q46, Q48, Q49, R71, S75, T82, A89, Y92, H93, K108, F111, L116, K123, R124, G127, H131, K134, A135, Y155 a R165, ešte výhodnejšie zo skupiny obsahujúcej N4, L5, F8, S12, F15, Q16, K19, W22, Q23, R27, Y30, Q46, Q48, Q49, S75, T82, A89, Y92, H93, K108, F111, L116, R124, G127, H131, K134, Y155 a R165, ako napríklad zo skupiny, ktorá obsahuje L5, F8, S12, F15, Q16, K19, W22, Q23, Q48, Q49, Y92, H93, R124, G127, H131 a Y155, ešte výhodnejšie zo skupiny, ktorá obsahuje S12, Q16, K19, Q23, Q48, Q49, Y92, H93, R124, G127, H131 a Y155, ako napríklad zo skupiny, ktorá obsahuje S12, Q16, K19, Q23, Q48, H93 a H131, ešte výhodnejšie zo skupiny, ktorá obsahuje S12, Q16, K19, Q48, H93 a H131, a najvýhodnejšie zo skupiny, ktorá obsahuje Q16 a Q48.

Okrem toho je na získanie dostatočného počtu nepolypeptidových častí výhodné, aby boli začlenené aspoň dva zvyšky kyseliny asparágovej alebo aspoň dva zvyšky kyseliny glutámovej, výhodne v dvoch polohách vybraných z vyššie uvedených zoznamov polôh. Výhodné je aj to, aby konjugát podľa tohto predmetu vynálezu obsahoval aspoň dve prvé nepolypeptidové časti.

V prípade odstránenia aminokyselinového zvyšku sa aminokyselinová sekvencia interferónového β polypeptidu líši od sekvencie ľudského divého typu interferónu β aspoň jedným odstráneným zvyškom kyseliny asparágovej alebo kyseliny glutámovej, ako napríklad 1 až 5 odstránenými zvyškami, najmä 1 až 4 alebo 1 až 3 odstránenými zvyškami kyseliny asparágovej alebo kyseliny glutámovej. Zvyšok (zvyšky), ktorý sa má odstrániť, výhodne zámenou, je vybraný zo skupiny, ktorá obsahuje D34, D39, D54, D73, D110, E29, E42, E43, E53, E61, E81, E85, E103, E104, E107, E109, E137 a E149. Zvyšok (zvyšky) kyseliny asparágovej alebo kyseliny glutámovej sa môže nahradiť akýmkoľvek iným aminokyselinovým zvyškom, ale výhodne sa nahrádza arginínovým alebo glutamínovým zvyškom. Prvou nepolypeptidovou časťou môže byť akákoľvek nepolypeptidová časť s takouto vlastnosťou, ale tu je výhodné, aby nepolypeptidovou časťou bola polymérna molekula alebo organické derivatizačné činidlo majúce kyselinovú skupinu ako pripájaciu skupinu, najmä polymérna molekula ako PEG, a konjugát sa

pripravuje napr. podľa opisu v Sakane a Pardridge, Pharmaceutical Research, zv. 14, č. 8, 1997, str. 1085-1091. Normálne má nepolypeptidová časť na konjugáciu s kyselinovou skupinou molekulovú hmotnosť približne 5 alebo 10 kDa.

Konjugát podľa vynálezu, ktorý obsahuje druhú nepolypeptidovú časť

Okrem prvej nepolypeptidovej časti (ako je opísané v predchádzajúcich častiach) môže konjugát podľa vynálezu obsahovať druhú nepolypeptidovú časť odlišného typu v porovnaní s prvou nepolypeptidovou časťou. Výhodne, v ktoromkoľvek z vyššie opísaných konjugátov, v ktorých je prvou nepolypeptidovou časťou napr. polymérna molekula, ako PEG, je druhou nepolypeptidovou časťou sacharidová časť, najmä N-pripojená sacharidová časť. Hoci druhá nepolypeptidová časť môže byť pripojená na prirodzené glykozylačné miesto ľudského interferónu β , napr. N-pripájané glykozylačné miesto definované polohou N80, normálne je výhodné začleniť do interferónového β polypeptidu aspoň jedno ďalšie glykozylačné miesto. Takýmto miestom je napr. akékoľvek z miest opísaných v nasledujúcej časti s názvom "Konjugát podľa vynálezu, v ktorom je nepolypeptidovou časťou sacharidová časť". Okrem toho, v prípade, že je začleňované aspoň jedno ďalšie glykozylačné miesto, môže sa to uskutočňovať odstránením existujúceho glykozylačného miesta ako je opísané nižšie.

Bude zrejmé, že na získanie optimálnej distribúcie pripojených prvých a druhých nepolypeptidových častí môže byť modifikovaný počet a distribúcia pripájacích skupín pre prvú, ako aj druhú nepolypeptidovú časť, v interferónovom β polypeptide tak, aby sa napr. odstránila aspoň jedna pripájacia skupina pre prvú nepolypeptidovú časť, a aby sa začlenila aspoň jedna pripájacia skupina pre druhú nepolypeptidovú časť alebo naopak. Interferónový β polypeptid obsahuje napríklad aspoň dve (napr. 2 až 5) odstránené pripájacie skupiny pre prvú nepolypeptidovú časť a aspoň jednu (napr. 1 až 5) začlenenú pripájaciu skupinu pre druhú nepolypeptidovú časť alebo naopak. Výnimočne zaujímavý je konjugát, v ktorom je prvou nepolypeptidovou časťou polymérna molekula, ako napríklad PEG, majúca lyzín ako pripájaciu skupinu, a druhou nepolypeptidovou časťou je N-pripojená sacharidová časť.

Konkrétnejšie, konjugát podľa vynálezu môže byť konjugátom vykazujúcim aktivitu β interferónu a obsahujúcim aspoň jednu polymérnu molekulu, výhodne PEG, a aspoň jednu sacharidovú časť, ktoré sú kovalentne pripojené na interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β :

a) aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre polymérnu molekulu a

b) aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným *in vivo* glykozylačným miestom, najmä N-glykozylačným miestom,

za predpokladu, že keď je pripájacou skupinou pre polymérnu molekulu cysteínový zvyšok a sacharidovou časťou je N-pripojená sacharidová časť, cysteínový zvyšok je začlenený takým spôsobom, aby sa nezničilo N-glykozylačné miesto. WO99/03887 navrhuje, že cysteínový zvyšok môže byť začlenený do prirodzeného N-glykozylačného miesta interferónu β .

V konkrétnom uskutočnení obsahuje interferónový β polypeptid jednu z nasledujúcich sád mutácií:

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

K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T, alebo

K19R+K45R+Q49N+Q51T+K123R.

Konjugát podľa vynálezu, v ktorom je nepolypeptidovou časťou sacharidová časť

Keď konjugát podľa vynálezu obsahuje aspoň jednu sacharidovú časť pripojenú na *in vivo* glykozylačné miesto, najmä N-glykozylačné miesto, je týmto miestom buď prirodzené N-glykozylačné miesto divého typu ľudského interferónu β v polohe N80, tzn. definované aminokyselinovými zvyškami N80, E81, T82 a I83, alebo nové *in vivo* glykozylačné miesto začlenené do interferónového β polypeptidu. *In vivo* glykozylačným miestom môže byť O-glykozylačné miesto, ale výhodne ním je N-glykozylačné miesto.

Konkrétnejšie, jeden predmet vynálezu sa týka konjugátu vykazujúceho aktivitu interferónu β a obsahujúceho interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň

jedným začleneným glykozylačným miestom, pričom konjugát ďalej obsahuje aspoň jednu nePEGylovanú sacharidovú časť pripojenú na začlenené glykozylačné miesto.

Iný predmet vynálezu sa týka konjugátu vykazujúceho aktivitu interferónu β a obsahujúceho interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β v tom, že sa zaviedlo alebo odstránilo glykozylačné miesto, s podmienkou, že ak sa glykozylačné miesto len odstránilo (takže sa nezačlenilo žiadne glykozylačné miesto), interferónový β polypeptid neobsahuje jednu alebo viacero z nasledujúcich substitúcií: N80C, E81C alebo T82C. Posledná z týchto substitúcií je navrhnutá vo WO 99/03887.

In vivo glykozylačné miesto sa začleňuje napríklad do polohy rodičovskej interferónovej β molekuly, v ktorej sa nachádza aminokyselinový zvyšok vystavený na povrchu molekuly, výhodnej s viac ako 25 % bočného reťazca vystavenými rozpúšťadlu, najmä viac ako 50 % vystavenými rozpúšťadlu (tieto polohy sú tu uvedené v časti Metódy). N-glykozylačné miesto sa začleňuje takým spôsobom, aby bol N-zvyšok uvedeného miesta lokalizovaný v uvedenej polohe. Analogicky, O-glykozylačné miesto sa začleňuje takým spôsobom, aby S alebo T zvyšok tvoriaci uvedené miesto bol lokalizovaný v uvedenej polohe. Okrem toho je na zaistenie účinnej glykozylácie výhodné, aby bolo *in vivo* glykozylačné miesto, najmä N zvyšok N-glykozylačného miesta alebo S alebo T zvyšok O-glykozylačného miesta, lokalizované v rámci prvých 141 aminokyselinových zvyškov interferónového β polypeptidu, výhodnejšie v rámci prvých 116 aminokyselinových zvyškov. Ešte výhodnejšie je začleňovať *in vivo* glykozylačné miesto do polohy, v ktorej je na vytvorenie miesta potrebná len jedna mutácia (tzn. tam, kde sa ktorýkoľvek z aminokyselinových zvyškov potrebných na vytvorenie funkčného glykozylačného miesta už nachádza v molekule).

Substitúcie, ktoré vedú k začleneniu ďalšieho N-glykozylačného miesta do polôh vystavených na povrchu interferónovej β molekuly, v ktorých sa nachádzajú aminokyselinové zvyšky majúce viac ako 25 % svojho bočného reťazca vystavených na povrchu, zahŕňajú:

S2N+N4S/T, L6S/T, L5N+G7S/T, F8N+Q10S/T, L9N+R11S/T, R11N, R11N+S13T, S12N+N14S/T, F15N+C17S/T, Q16N+Q18S/T, Q18N+L20S/T, K19N+L21S/T, W22N+L24S/T, Q23N+H25S/T, G26N+L28S/T, R27N+E29S/T, L28S+Y30S/T, Y30N+L32S/T, L32N+D34S/T, K33N+R35S/T, R35N+N37S/T, M36N+F38S/T, D39S/T, D39N+P41S/T, E42N+I44S/T, Q43N+K45S/T, K45N+L47S/T, Q46N+Q48S/T, L47N+Q49S, Q48N+F50S/T, Q49N+Q51S/T, Q51N+E53S/T, K52N+D54S/T, L57N+I59S/T, Q64N+I66S/T, A68N+F70S/T, R71N+D73S/T, Q72N, Q72N+S74T, D73N, D73N+S75T, S75N+T77S, S75N, S76N+G78S/T, E81N+I83S/T, T82N+V84S/T, E85N+L87S/T, L88S/T, A89N+V91S/T, Y92S/T, Y92N+Q94S/T, H93N+I95S/T, L98S/T, H97N+K99S/T, K99N+V101S/T, T100N+L102S/T, E103N+K105S/T, E104N+L106S/T, K105N+E107S/T, E107N+E109S/T, K108N+D110S/T, E109N+F111S/T, D110N+T112S, D110N, F111N+R113S/T, R113N+K115S/T, G114N+L116S/T, K115N+M117S/T, L116N, L116N+S118T, S119N+H212S/T, L120N+L122S/T, H121N+K123S/T, K123N+Y125S/T, R124N+Y126S/T, G127N+I129S/T, R128N+L130S/T, L130N+Y132S/T, H131N+L133S/T, K134N+K136S/T, A135N+EI37S/T, K136N+Y138S/T, E137N, Y138N+HI40S/T, H140N+A142S/T, V148N+I150S/T, R152N+F154S/T, Y155N+I157S/T, L160S/T, R159N+T161S, R59N, G162N+L164S/T a Y163N+R165 S/T.

Substitúcie, ktoré vedú k začleneniu ďalšieho N-glykozylačného miesta do polôh vystavených na povrchu interferónovej β molekuly, ktoré majú viac ako 50 % bočného reťazca vystavených na povrchu, zahŕňajú:

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

G127N+I129S/T, H131N+L133S/T, K134N+K136S/T, A135N+E137S/T, E137N, V148N+I150S/T a Y155N+I157S/T.

Zo substitúcií vymenovaných vo vyššie uvedených zoznamoch sú výhodné tie, ktoré majú N zvyšok začlenený v rámci 141 N-koncových aminokyselinových zvyškov, najmä v rámci 116 N-koncových aminokyselinových zvyškov.

Substitúcie, ktoré vedú k začleneniu N-glykozylačného miesta prostredníctvom jedinej aminokyselinovej substitúcie, zahŕňajú: L6S/T, R11N, D39S/T, Q72N, D73N, S75N, L88S/T, Y92S/T, L98S/T, D110N, L116N, E137N, R159N a L160S/T. Z týchto je výhodná substitúcia, ktorá je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z L6S/T, R11N, D39S/T, Q72N, D73N, S75N, L88S/T, Y92S/T, L98S/T, D110N a L116N, výhodnejšie zo skupiny pozostávajúcej z L6S/T, D39S/T, D73N, S75N, L88S/T, D110N, L116N a E137N; a najvýhodnejšie je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z L6S/T, D39S/T, D73N, S75N, L88S/T, D110N a L116N.

V súčasnosti najvýhodnejší interferónový β polypeptid v súlade s týmto uskutočnením zahŕňa aspoň jednu z nasledujúcich substitúcií: S2N+N4T/S, L9N+R11T/S, R11N, S12N+N14T/S, F15N+C17S/T, Q16N+Q18T/S, K19N+L21T/S, Q23N+H25T/S, G26N+L28T/S, R27N+E29T/S, L28N+Y30T/S, D39T/S, K45N+L47T/S, Q46N+Q48T/S, Q48N+F50T/S, Q49N+Q51T/S, Q51N+E53T/S, R71N+D73T/S, Q72N, D73N, S75N, S76N+G78T/S, L88T/S, Y92T/S, 93N+I95T/S, L98T/S, E103N+K105T/S, E104N+L106T/S, E107N+E109T/S, K108N+D110T/S, D110N, F111N+R113T/S alebo L116N, výhodnejšie aspoň jednu z nasledujúcich substitúcií: S2N+N4T, L9N+R11T, 49N+Q51T alebo F111N+R113T alebo R71N+D73T, najmä 49N+Q51T alebo F111N+R113T alebo R71N+D73T. Interferónový β polypeptid obsahuje napríklad jednu z nasledujúcich sád substitúcií:

Q49N+Q51T+F111N+R113T;

Q49N+Q51T+R71N+D73T+ F111N+ R113T;

S2N+N4T+ F11N+R113T;

S2N+N4T+Q49N+Q51T;

S2N+N4T+Q49N+Q51T+F111N+R113T;

S2N+N4T+L9N+R11T+Q49N+Q51T;

S2N+N4T+L9N+R11T+F111N+R113T;

S2N+N4T+L9N+R11T+Q49N+Q51T+F111N+R113T;

L9N+R11T+Q49N+Q51T;

L9N+R11T+Q49N+Q51T+F111N+R113T; alebo

L9N+R11T+F111N+R113T.

Bude zrejmé, že na začlenenie funkčného *in vivo* glykozylačného miesta sa musí aminokyselinový zvyšok medzi N-zvyškom a S/T zvyškom líšiť od prolínu. Normálne bude aminokyselinovým zvyškom v medzipolohe zvyšok, ktorý sa nachádza v relevantnej polohe v aminokyselinovej sekvencii označenej ako sekv. č. 2. Napr. v polypeptide obsahujúcom substitúcie Q49N+Q51S je medzipolohou poloha 50.

Interferónová β polypeptidová časť konjugátu podľa vynálezu môže obsahovať jediné *in vivo* glykozylačné miesto. Avšak na získanie dostatočného zatienenia epitopov nachádzajúcich sa na povrchu rodičovského polypeptidu je často želateľné, aby polypeptid obsahoval viac ako jedno *in vivo* glykozylačné miesto, konkrétne 2 až 7 glykozylačných miest, ako napríklad 2, 3, 4, 5, 6 alebo 7 *in vivo* glykozylačných miest. Takže interferónový β polypeptid môže obsahovať jedno ďalšie glykozylačné miesto alebo môže obsahovať dve, tri, štyri, päť, šesť, sedem alebo viac začlenených *in vivo* glykozylačných miest, výhodne začlenených prostredníctvom jednej alebo viacerých substitúcií opísaných v ktoromkoľvek z vyššie uvedených zoznamov.

Ako bolo uvedené vyššie, okrem jedného alebo viacerých začlenených glykozylačných miest je možné z interferónového β polypeptidu odstrániť existujúce glykozylačné miesta. Napríklad ktorákoľvek z vyššie uvedených substitúcií na začlenenie glykozylačného miesta môže byť kombinovaná so substitúciou na odstránenie prirodzeného N-glykozylačného miesta ľudského divého typu interferónu β . Interferónový β polypeptid môže obsahovať napríklad substitúciu N80, napr. jednu zo substitúcií N80K/C/D/E, keď je prvou nepolypeptidovou časťou časť majúca K, C, D, E ako pripájajúcu skupinu. Interferónový β polypeptid môže obsahovať aspoň jednu z nasledujúcich substitúcií: S2N+N4T/S, L9N+R11T/S, R11N, S12N+N14T/S, F15N+C17S/T, Q16N+Q18T/S, K19N+L21T/S, Q23N+H25T/S, G26N+L28T/S, R27N+E29T/S, L28N+Y30T/S, D39T/S,

K45N+L47T/S, Q46N+Q48T/S, Q48N+F50T/S, Q49N+Q51T/S, Q51N+E53T/S, R71N+D73T/S, Q72N, D73N, S75N, S76N+G78T/S, L88T/S, Y92T/S, N93N+I95T/S, L98T/S, E103N+K105T/S, E104N+L106T/S, E107N+E109T/S, K108N+D110T/S, D110N, F111N+R113T/S alebo L116N v kombinácii s N80K/C/D/E. Konkrétnejšie môže interferónový β polypeptid obsahovať substitúciu: Q49N+Q51T alebo F111N+R113T alebo R71N+D73T, najmä Q49N+Q51T+F111N+R113T alebo Q49N+Q51T+R71N+D73T+F111N+R113T, v kombinácii s N80K/C/D/E.

Ktorýkoľvek z glykozylovaných variantov opísaných v tejto časti majúcich začlenené a/alebo odstránené aspoň jedno glykozylačné miesto, ako napríklad variant obsahujúci substitúcie Q48N+F50T/S, Q48N+F50T/S+F111N+R113T/S, Q49N+Q51T/S, F111N+R113T/S alebo Q49N+Q51T/S+F111N+R113T/S, môže byť ďalej konjugovaný s polymérnou molekulou, ako napríklad PEG, alebo inou nepolypeptidovou časťou. Za týmto účelom sa konjugácia môže dosiahnuť použitím pripájacích skupín, ktoré sa už nachádzajú v interferónovom β polypeptide, alebo sa pripájacie skupiny môžu začleniť a/alebo odstrániť, konkrétne tak, aby bolo na konjugáciu dostupných celkovo 1 až 6, najmä 3 až 4 alebo 1, 2, 3, 4, 5 alebo 6 pripájacích skupín. Výhodne je v konjugáte podľa vynálezu, v ktorom interferónový β polypeptid obsahuje dve glykozylačné miesta, počet a molekulová hmotnosť nepolypeptidovej časti vyberaná tak, aby celková molekulová hmotnosť pridaná nepolypeptidovou časťou bola v rozsahu 20 až 40 kDa, konkrétne približne 20 kDa alebo 30 kDa.

Konkrétne, glykozylovaný variant môže byť konjugovaný s nepolypeptidovou časťou prostredníctvom lyzínovej pripájacej skupiny a jeden alebo viacero lyzínových zvyškov rodičovského polypeptidu sa môže odstrániť, napr. ktoroukoľvek zo substitúcií uvedených v časti s názvom "Konjugát podľa vynálezu, v ktorom je nepolypeptidovou časťou molekula majúca lyzín ako pripájaciu skupinu", najmä substitúciami K19R+K45R+K123R. Alternatívne alebo okrem toho sa lyzínový zvyšok môže začleniť napríklad prostredníctvom ktorejkoľvek zo substitúcií spomenutých v uvedenej časti, najmä substitúciou R71K. Z toho vyplýva, že jedným konkrétnym konjugátom podľa vynálezu je konjugát, ktorý obsahuje glykozylovaný interferónový β polypeptid zahŕňajúci mutácie

Q49N+Q51T+F111N+R113T+K19R+K45R+K123R alebo Q49N+Q51T+F111N+R113T+K19R+K45R+K123R+R71K zároveň konjugovaný s PEG. Glykozylovaná polypeptidová časť uvedeného konjugátu sa prednostne produkuje v CHO bunkách a po purifikácii sa PEGyluje použitím napr. SS-PEG, NPC-PEG, aldehyd-PEG, mPEG-SPA, mPEG-SCM, mPEG-BTC od Shearwater Polymers, Inc., SC-PEG od Enzon, Inc., trezylovaného mPEG ako je opísaný v US 5880255 alebo oxykarbonyloxy-*N*-dikarboximid-PEG (US 5122614).

Ako alternatíva k PEGylácii prostredníctvom lyzínovej skupiny sa môže glykozylovaný konjugát podľa tohto uskutočnenia PEGylovať prostredníctvom cysteínovej skupiny, ako je opísané v časti s názvom "Konjugát podľa vynálezu, v ktorom je nepolypeptidovou časťou molekula, ktorá má cysteín ako pripájajúcu skupinu" (za týmto účelom môže interferónový β polypeptid obsahovať napr. aspoň jednu z mutácií N80C, R71C a C17S), prostredníctvom kyselinovej skupiny, ako je opísané v časti s názvom "Konjugát podľa vynálezu, v ktorom sa nepolypeptidová časť viaže na kyselinovú skupinu", alebo prostredníctvom akejkoľvek inej vhodnej skupiny.

Iné konjugáty podľa vynálezu

Okrem začleňovania a/alebo odstraňovania aminokyselinových zvyškov obsahujúcich pripájajúcu skupinu pre zvolenú nepolypeptidovú časť (ako je opísané v ktorejkoľvek z častí z názvom "Konjugát podľa vynálezu..."), môže interferónový β polypeptidová časť konjugátu obsahovať ďalšie substitúcie. Výhodným príkladom je substitúcia ktoréhokoľvek zo zvyškov M1, C17, N80 alebo V101, napr. jedna alebo viacero z nasledujúcich substitúcií: C17S; N80K/C/D/E; V101Y/W/F/H; delécia M1; alebo M1K. Substitúcia M1K je výnimočne zaujímavá, keď sa interferónový β polypeptid exprimuje s prívieskom ("tag"), napr. His-14tag, pričom príviesok ("tag") sa má odstrániť prostredníctvom DAP (diaminopeptidázou) následne po purifikácii a/alebo konjugácii.

Nepolypeptidová časť konjugátu podľa vynálezu

Ako je podrobnejšie uvedené vyššie, nepolypeptidová časť konjugátu podľa vynálezu je výhodne vybraná zo skupiny, ktorá obsahuje polymérnu molekulu,

lipofilnú zlúčeninu, sacharidovú časť (prostredníctvom *in vivo* glykozylácie) a organické derivatizačné činidlo. Všetky tieto činidlá môžu poskytnúť polypeptidovej časti konjugátu požadované vlastnosti, najmä zníženú imunogénnosť a/alebo predĺžený funkčný *in vivo* polčas rozpadu a/alebo predĺžený sérový polčas rozpadu. Polypeptidová časť konjugátu môže byť konjugovaná len s jedným typom nepolypeptidovej časti, ale môže byť konjugovaná aj s dvoma alebo viacerými odlišnými typmi nepolypeptidových častí, napr. s polymérnou molekulou a sacharidovou časťou, s lipofilnou skupinou a sacharidovou časťou, s organickým derivatizačným činidlom a sacharidovou časťou, s lipofilnou skupinou a polymérnou molekulou, atď. Konjugácia s dvoma alebo viacerými odlišnými nepolypeptidovými časťami sa môže uskutočňovať simultánne alebo postupne. Voľba nepolypeptidovej časti (častí) závisí napr. na požadovanom účinku, ktorý sa má dosiahnuť konjugáciou. Napríklad sa zistilo, že sacharidové časti sú výnimočne užitočné na znižovanie imunogénnosti, zatiaľ čo polymérne molekuly, ako napríklad PEG, sú výnimočne užitočné na predlžovanie funkčného *in vivo* polčasu rozpadu a/alebo sérového polčasu rozpadu. Výsledkom použitia polymérnej molekuly ako prvej nepolypeptidovej časti a sacharidovej časti ako druhej nepolypeptidovej časti môže byť zníženie imunogénnosti a predĺženie funkčného *in vivo* polčasu rozpadu alebo sérového polčasu rozpadu.

Spôsoby prípravy konjugátu podľa vynálezu

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

Konjugácia s lipofilnou zlúčeninou

Na konjugáciu s lipofilnou zlúčeninou môžu nasledujúce polypeptidové skupiny slúžiť ako pripájacie skupiny: N-koniec alebo C-koniec polypeptidu, hydroxyskupiny aminokyselinových zvyškov Ser, Thr alebo Tyr, ϵ -aminoskupina Lys, SH skupina cysteínu alebo karboxylová skupina Asp a Glu. Polypeptid a lipofilná zlúčenina sa môžu navzájom konjugovať buď priamo, alebo použitím

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

Konjugácia s polymérnou molekulou

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

Príklady homopolymérov zahŕňajú polyol (tzn. poly-OH), polyamín (tzn. poly-NH₂) a polykarboxylovú kyselinu (tzn. poly-COOH). Heteropolymérom je polymér, ktorý obsahuje jednu alebo viacero odlišných párovacích skupín, ako napr. hydroxylovú skupinu a amínovú skupinu.

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

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

Na účinné kovalentné pripojenie polymérnej molekuly (molekúl) na polypeptid, musia byť hydroxylové koncové skupiny polymérnej molekuly poskytnuté v aktivovanej forme, tzn. s reaktívnymi funkčnými skupinami (príklady ktorých zahŕňajú primárne aminoskupiny, hydrazín (HZ), tiol, jantaran (SUC), sukcinimidyl-jantaran (SS), sukcinimidylsukcinamid (SSA), sukcinimidylpropionát (SPA), sukcinimidylkarboxymetylát (SCM), benzotriazolkarbonát (BTC), *N*-hydroxysukcinimid (NHS), aldehyd, nitrofenylkarbonát (NPC) a tresylát (TRES)). Vhodné aktivované polymérne molekuly sú komerčne dostupné napr. od Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL, USA. Alternatívne je možné polymérne molekuly aktivovať bežnými metódami známymi v oblasti, ako sú opísané napr. vo WO 90/13540. Konkrétne príklady aktivovaných lineárnych alebo rozvetvených polymérnych molekúl na použitie v predložennom vynáleze sú opísané v katalógoch firmy Shearwater Polymers, Inc. 1997 a 2000 (Functionalized Biocompatible Polymers for Research and pharmaceuticals, Polyethylene Glycol and Derivatives, ktoré sú tu zahrnuté ich citáciou). Konkrétne príklady aktivovaných PEG polymérov zahŕňajú nasledujúce lineárne PEG-y: NHS-PEG (napr. SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG a SCM-PEG a NOR-PEG), BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG a MAL-PEG a rozvetvené PEG-y, ako napríklad PEG2-NHS a tie, ktoré sú opísané v US 5932462 a US 5643575, pričom oba tieto dokumenty sú tu zahrnuté ich citáciou. Okrem toho, nasledujúce publikácie, ktoré sú tu zahrnuté ich citáciou, opisujú užitočné polymérne molekuly a/alebo PEGylačné chemické postupy: US 5824778, US 5476653, WO 97/32607, EP 229108, EP 402378, US

4902502, US 5281698, US 5122614, US 5219564, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921131, US 5736625, WO 98/05363, EP 809996, US 5629384, WO 96/41813, WO 96/07670, US 5473034, US 5516673, EP 605963, US 5382657, EP 510356, EP 400472, EP 183503 a EP 154316.

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

Bude zrejmé, že PEGylácia sa navrhuje tak, aby produkovala optimálnu molekulu čo sa týka počtu pripojených PEG molekúl, veľkosti a formy (napr. či sú lineárne alebo rozvetvené) takýchto molekúl, a toho kde na polypeptide sú takéto molekuly pripojené. Napríklad molekulová hmotnosť polyméru, ktorý sa má použiť, môže byť vybraná na základe požadovaného účinku, ktorý sa má dosiahnuť. Ak je napríklad primárnym účelom konjugácie dosiahnuť konjugát s vysokou molekulovou

hmotnosťou (napr. na redukciu odstraňovania obličkami), zvyčajne je želateľné konjugovať čo najmenej polymérnych molekúl s vysokou molekulovou hmotnosťou (M_w), aby sa získala požadovaná molekulová hmotnosť. Keď je želateľný vysoký stupeň epitopového zatienenia, je to možné získať použitím dostatočne vysokého počtu polymérov s nízkou molekulovou hmotnosťou (napr. s molekulovou hmotnosťou približne 5000 Da), aby sa účinne zatienili všetky alebo väčšina epitopov polypeptidu. Použitých môže byť napríklad 2 až 8, ako napríklad 3 až 6 epitopov.

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

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

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

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

Kovalentné *in vitro* párovanie uhľovodíkovej časti s aminokyselinovými zvyškami interferónu β sa môže používať na modifikáciu alebo zvýšenie počtu alebo zlepšenie profilu uhľovodíkových substituentov. V závislosti na použítom spôsobe párovania sa uhľovodík (uhľovodíky) môžu pripájať: a) na arginín a histidín (Lundblad a Noyes, Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc. Boca Raton, FL), b) na voľné karboxylové skupiny (napr. C-koncových amino-

kyselinových zvyškov, asparagín alebo glutamín), c) na voľné sulfhydrylové skupiny, ako napríklad skupinu cysteínu, d) na voľné hydroxylové skupiny, ako napríklad hydroxylové skupiny serínu, treonínu, tyrozínu alebo hydroxyprolínu, e) na aromatické zvyšky, ako napríklad na zvyšky fenylalanínu alebo tryptofánu, alebo f) na amidovú skupinu glutamínu. Tieto aminokyselinové zvyšky predstavujú príklady pripájacích skupín pre uhľovodíkovú časť, ktoré môžu byť začleňované do a/alebo odstraňované z interferónového β polypeptidu. Vhodné spôsoby *in vitro* párovania sú opísané vo WO 87/05330 a v Aplin a ďalší, CRC Crit Rev. Biochem., str. 259-306, 1981. *In vitro* párovanie uhľovodíkových častí alebo PEG s Gln-zvyškami naviazanými na proteín a peptid sa môže uskutočňovať aj transglutaminázami (TGases), ako je opísané napr. v Sato a ďalší, 1996 Biochemistry 35, 13072-13080 alebo v EP 725145.

Konjugácia so sacharidovou časťou

Na dosiahnutie *in vivo* glykozylácie interferónového β polypeptidu, ktorý bol modifikovaný začlenením jedného alebo viacerých glykozylačných miest (pozri časť "Konjugáty podľa vynálezu, v ktorých je nepolypeptidovou časťou sacharidová časť"), musí sa sekvencia kódujúca polypeptidovú časť konjugátu vnieť do glykozyľujúceho eukaryotického expresného hostiteľa. Expresná hostiteľská bunka môže byť vybraná z plesňovej bunky (bunka vláknitých húb alebo kvasinková bunka), hmyzej bunky, cicavčej bunky, alebo z buniek transgénnych rastlín alebo transgénnych živočíchov. Okrem toho je možné glykozyláciu dosiahnuť v ľudskom tele, keď sa nukleotidová sekvencia kódujúca polypeptidovú časť konjugátu podľa vynálezu alebo polypeptid podľa vynálezu používa na génovú terapiu. V jednom uskutočnení je hostiteľskou bunkou cicavčia bunka, ako napríklad CHO bunka, BHK alebo HEK bunka, napr. HEK293, alebo hmyzia bunka, ako napríklad SF9 bunka, alebo kvasinková bunka, napr. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, alebo akýkoľvek iný vhodný hostiteľ, ako je podrobnejšie opísané napr. nižšie. Voliteľne sa sacharidové časti pripojené na interferónový β polypeptid *in vivo* glykozyľáciou ďalej modifikujú použitím glykozyltransferáz, napr. použitím glycoAdvance® technológie predávanej firmou Neose, Horsham, PA, USA. Tým je možné napr.

zvýšiť sialyáciu glykozylovaného interferónového β polypeptidu po jeho expresii a *in vivo* glykozylácii CHO bunkami.

Konjugácia s organickým derivatizačným činidlom

Kovalentnú modifikáciu interferónového β polypeptidu je možné uskutočňovať reagovaním pripájacej skupiny (skupín) polypeptidu s organickým derivatizačným činidlom. Vhodné derivatizačné činidlá a spôsoby sú v oblasti dobre známe. Napríklad cysteinylové zvyšky najbežnejšie reagujú s α -halogénacetátmi (a zodpovedajúcimi amínmi), ako napríklad kyselinou chlórctovou alebo chlóracetamidom, čím vznikajú karboxymetylové alebo karboxyamidometylové deriváty. Cysteinylové zvyšky je možné derivatizovať aj reakciou s brómtrifluóracetónom, α -bróm- β -(4-imidazolyl)propiónovou kyselinou, chlóracetylfosfátom, *N*-alkylmaleimidmi, 3-nitro-2-pyridyldisulfidom, metyl-2-pyridyldisulfidom, *p*-chlórmerkuri-benzoátom, 2-chlórmerkuri-4-nitrofenolom alebo chlór-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolom. Histidylové zvyšky je možné derivatizovať reakciou s dietylpyrokarbonátom, pri pH 5,5 až 7,0, pretože toto činidlo je relatívne špecifické pre histidylový bočný reťazec. Užitočný je aj *para*-brómfenacylbromid; reakcia sa výhodne uskutočňuje v 0,1M kakodyláte sodnom pri pH 6,0. Lyzinylové alebo aminokoncové zvyšky reagujú s anhydridom kyseliny jantárovej alebo anhydridmi iných karboxylových kyselín. Účinkom derivatizácie týmito činidlami je reverzia náboja lyzinylových zvyškov. Iné vhodné reakčné činidlá na derivatizáciu zvyškov obsahujúcich α -amino zahŕňajú imidoestery, ako napríklad metylpikolínimidát; pyridoxalfosfát; pyridoxal; chlórborohydrid; kyselinu trinitrobenzénsulfónovú; *O*-metylizomočovinu; 2,4-pentándión; a transaminázou katalyzovanú reakciu s glyoxylátom. Arginylové zvyšky sú modifikované reakciou s jedným alebo niekoľkými bežnými činidlami, medzi iným fenylglyoxálom, 2,3-butándiónom, 1,2-cyklohexándiónom a ninhydrínom. Derivatizácia arginínových zvyškov vyžaduje, aby sa reakcia uskutočňovala v alkalických podmienkach, kvôli vysokej hodnote pKa guanidínovej funkčnej skupiny. Okrem toho, tieto reakčné činidlá môžu reagovať so skupinami lyzínu, ako aj s arginínguanidinoskupinou. Karboxylové bočné skupiny (aspartylová alebo glutamylová skupina alebo C-koncový aminokyselinový zvyšok)

sa selektívne modifikujú reakciou s karbodiimidmi ($R-N=C=N-R'$), kde R a R' znamenajú rozličné alkylové skupiny, ako napríklad 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinyl-4-etyl)karbodiimid alebo 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetylpentyl)karbodiimid. Okrem toho sa aspartylové a glutamylové zvyšky konvertujú na asparaginylové a glutaminylové zvyšky reakciou s amónnymi iónmi.

Blokovanie funkčného miesta

Bolo publikované, že nadmerná polymérová konjugácia môže viesť k strate aktivity interferónového β polypeptidu, s ktorým sa polymér konjuguje. Tento problém je možné eliminovať napr. odstránením pripájacích skupín umiestnených vo funkčnom mieste alebo blokovaním funkčného miesta pred konjugáciou. Tieto stratégie predstavujú ďalšie uskutočnenia vynálezu (príklad prvej stratégie je podrobnejšie uvedený vyššie, napr. odstraňovanie lyzínových zvyškov, ktoré môžu byť lokalizované v blízkosti funkčného miesta). Konkrétnejšie, v súlade s druhou stratégiou sa konjugácia medzi interferónovým β polypeptidom a nepolypeptidovou časťou uskutočňuje v podmienkach, v ktorých sa funkčné miesto polypeptidu blokuje pomocnou molekulou, ktorá je schopná viazať sa na funkčné miesto polypeptidu. Výhodne je pomocnou molekulou molekula, ktorá špecificky rozoznáva funkčné miesto polypeptidu, ako napríklad receptor, najmä interferónový receptor typu I. Alternatívne môže byť pomocnou molekulou protilátka, najmä monoklonálna protilátka rozoznávajúca interferónový β polypeptid. Pomocnou molekulou môže byť najmä neutralizačná monoklonálna protilátka.

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

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

Bez ohľadu na povahu pomocnej molekuly, ktorá sa má použiť na zatienie funkčného miesta polypeptidu pred konjugáciou, je žiadateľné, aby pomocná molekula neobsahovala alebo obsahovala len niekoľko pripájacích skupín pre zvolenú nepolypeptidovú časť (časti) molekuly, kde by konjugácia s takýmito skupinami brzdila desorpciu konjugovaného polypeptidu od pomocnej molekuly. Tak je možné získať selektívnu konjugáciu s pripájacími skupinami nachádzajúcimi sa v nezatielených častiach polypeptidu a je možné znova použiť pomocnú molekulu na opakované cykly konjugácie. Napríklad, aj je nepolypeptidovou časťou polymérna molekula, ako PEG, ktorá má ako pripájajúcu skupinu epsilon aminoskupinu lyzínu alebo N-koncového aminokyselinového zvyšku, je žiadateľné, aby pomocná molekula v podstate neobsahovala konjugovateľné epsilon aminoskupiny, výhodne aby neobsahovala žiadnu epsilon aminoskupinu. Z toho vyplýva, že vo výhodnom uskutočnení je pomocnou molekulou proteín alebo peptid schopný viazať sa na funkčné miesto polypeptidu, ktorý neobsahuje žiadnu konjugovateľnú pripájajúcu skupinu pre zvolenú nepolypeptidovú časť.

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

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

Konjugácia interferónového β polypeptidu s prívieskom

V alternatívnom uskutočnení sa interferónový β polypeptid exprimuje ako fúzovaný proteín s prívieskom, tzn. aminokyselinovou sekvenciou alebo peptidovým reťazcom vytvoreným typicky z 1 až 30, ako napríklad 1 až 20 alebo 1 až 15 alebo 1 až 10 aminokyselinových zvyškov. Okrem toho, že umožňuje rýchlu a jednoduchú purifikáciu, je príviesok bežným nástrojom na dosiahnutie konjugácie medzi polypeptidom s prívieskom a nepolypeptidovou časťou. Príviesok môže byť použitý najmä na dosiahnutie konjugácie v mikrotitračných platniach alebo na iných nosičoch, ako napríklad paramagnetických guľôčkách, na ktorých môže byť polypeptid s prívieskom imobilizovaný prostredníctvom príviesku. Konjugácia polypeptidu s prívieskom, napr. v mikrotitračných platniach, má tú výhodu, že polypeptid s prívieskom sa môže imobilizovať na mikrotitračných platniach priamo z kultivačného média (v princípe bez akejkoľvek purifikácie) a môže sa priamo podrobiť konjugácii. Tým je možné redukovať celkový počet procesných krokov (od expresie po konjugáciu). Okrem toho môže príviesok fungovať ako oddeľovacia molekula na zaistenie zlepšenej dostupnosti imobilizovaného polypeptidu, ktorý sa má konjugovať. Polypeptid s prívieskom sa môže použiť na konjugáciu s ktoroukoľvek z tu opísaných nepolypeptidových častí, napr. s polymérnou molekulou, ako napríklad PEG.

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

His-His-His-His-His-His

Met-Lys-His-His-His-His-His-His

Met-Lys-His-His-Ala-His-His-Gln-His-His

Met-Lys-His-Gln-His-Gln-His-Gln-His-Gln-His-Gln

(vektory užitočné na poskytovanie takýchto prívěskov sú dostupné od Unizyme Laboratories, Dánsko)

alebo ktorúkoľvek z nasledujúcich:

EQKLI SEEDL (C-koncový prívěsok opísaný v Mol. Cell. Biol. 5: 3610-16,1985)

DYKDDDDK (C- alebo N-koncový prívěsok)

YPYDVDPDYA

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

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

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

Polypeptidy podľa vynálezu

Ďalšie uskutočnenia vynálezu sa vo všeobecnosti týkajú tu opísaných nových interferónových β polypeptidov, ktoré v porovnaní s ľudským divým typom interferónu β majú aspoň jednu začlenenú a/alebo aspoň jednu odstránenú pripájaciu skupinu pre nepolypeptidovú časť. Nové polypeptidy sú dôležitými medzi-produktami na prípravu konjugátu podľa vynálezu. Okrem toho, samotné tieto polypeptidy majú zaujímavé vlastnosti.

Príklady takýchto polypeptidov zahŕňajú polypeptidy obsahujúce aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β v tom, že aspoň jeden aminokyselinový zvyšok vybraný zo skupiny, ktorá obsahuje N4, F8, L9, Q10, R11, S13, L24, N25, G26, L28, E29, N37, F38, Q48, Q49, Q64, N65, I66, F67, A68, I69, F70, R71, Q72, D73, S74, S75, S76, T77, G78, W79, N80, E81, T82, I83, V84, L87, L88, A89, N90, V91, Y92, H93, Q94, D110, F111, T112, R113, R128, H140, T144, I145, R147, V148, L151, R152, F154, Y155, N158 a N166, je nahradený iným aminokyselinovým zvyškom vybraným zo skupiny, ktorá

obsahuje K, R, D, E, C a N. Vyššie uvedené aminokyselinové zvyšky sú lokalizované v polohách, ktoré sú vystavené na povrchu ľudskej interferónovej β molekuly, ako demonštruje rozriešená 3D štruktúra ľudského interferónu β . Nahradením jedného alebo viacerých z týchto zvyškov jedným z K, R, D, E, C a N, sa pripájacia skupina (skupiny) pre nepolypeptidovú časť, najmä polymérová pripájacia skupina alebo aminokyselinový zvyšok vhodný na modifikáciu uhľovodíkovou časťou, začlení do ľudského interferónu β . Výsledná modifikovaná ľudská interferónová β molekula je vhodnou východiskovou zlúčeninou na prípravu interferónového β konjugátu majúceho zlepšené vlastnosti v porovnaní s nemodifikovanou ľudskou interferónovou β molekulou.

Ďalší predmet vynálezu sa týka interferónového β polypeptidu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β v tom, že aspoň jeden aminokyselinový zvyšok vybraný zo skupiny obsahujúcej N4, F8, L9, Q10, R11, S12, S13, L24, N25, G26, L28, E29, N37, F38, D39, Q48, Q49, Q64, N65, I66, F67, A68, I69, F70, R71, Q72, D73, S74, S75, S76, T77, G78, W79, N80, E81, T82, I83, V84, E85, L87, L88, A89, N90, V91, Y92, H93, Q94, D110, F111, T112, R113, R128, H140, T144, I145, R147, V148, L151, R152, F154, Y155, N158, G162 a N166 je nahradený lyzínovým zvyškom, s podmienkou, že polypeptid sa líši od polypeptidu majúceho aminokyselinovú sekvenciu divého typu ľudského interferónu β s nasledujúcimi substitúciami: D54N+E85K+V91I+V101M, a líši sa od polypeptidu, ktorý je hybridnou molekulou medzi interferónom β a interferónom α , ktorý následkom toho, že je hybridom, má lyzín v polohe 39. Prvý z nenárokovaných polypeptidov je opísaný v Stewart a ďalší, DNA zv. 6 č. 2 1987 str. 119-128 a zistilo sa, že je neaktívny, druhý je opísaný v US 4769233 a bol skonštruovaný za účelom zlepšenia biologickej aktivity interferónu β . Žiadny z nenárokovaných polypeptidov nebol vyrábaný na, alebo opísaný ako vhodný medziprodukt na prípravu interferónových β konjugátov so zníženou imunogénnosťou a/alebo predĺženým funkčným *in vivo* polčasom rozpadu a/alebo sérovým polčasom rozpadu.

Ešte ďalší príklad zahŕňa interferónový β polypeptid obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od sekvencie č. 2 jednou alebo viacerými

substitúciami vybranými zo skupiny, ktorá obsahuje N4K, F15K, Q16K, R27K, R35K, D39K, Q49K, E85K, A89K, E103K, E109K, R124K, E137K a R159K, s podmienkou, že ak je substitúciou R27K, polypeptid sa líši od polypeptidu majúceho aminokyselinovú sekvenciu divého typu ľudského interferónu β s nasledujúcimi substitúciami: R27K+E43K. Nenárokovaný polypeptid je opísaný v Stewart a ďalší, DNA zv. 6 č.2 1987 str. 119-128 a zistilo sa, že má nízku aktivitu. Polypeptid bol vyrobený v priebehu štúdie vzťahu funkcie a štruktúry a nebol uvedený ako možný medziprodukt na prípravu zlepšených interferónových β konjugátových molekúl. Interferónový β polypeptid napríklad obsahuje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od sekvencie č. 2 v tom, že obsahuje substitúciu R27K v kombinácii s aspoň jednou ďalšou substitúciou, ktorá sa líši od E43K, alebo substitúciu R35K v kombinácii s aspoň jednou ďalšou substitúciou, s podmienkou, že polypeptid má aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od aminokyselinovej sekvencie divého typu ľudského interferónu β modifikovaného nasledujúcimi substitúciami: G7E+S12N+C17Y+R35K. Nenárokovaný polypeptid je opísaný v Stewart a ďalší, DNA zv. 6 č.2 1987 str. 119-128 ako majúci zachovanú protiproliferatívnu aktivitu na Daudi bunkách vo vzťahu k ich protivírusovej aktivite, ale zníženú celkovú aktivitu v porovnaní s divým typom interferónu β . Nenárokovaný polypeptid nebol pripravený za účelom zníženia imunogénnosti a/alebo predĺženia funkčného *in vivo* polčasu rozpadu a/alebo sérového polčasu rozpadu, ale bol vyrobený v priebehu štúdie vzťahu štruktúry a funkcie interferónu β .

Polypeptid podľa vynálezu môže, okrem ktorejkoľvek z vyššie uvedených substitúcií, obsahovať substitúciu C17S a/alebo deléciu M1 alebo substitúciu M1K. Okrem toho môže polypeptid podľa vynálezu obsahovať aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa navyše líši od sekvencie č. 2 odstránením, výhodne prostredníctvom substitúcie, aspoň jedného lyzínového zvyšku vybraného zo skupiny, ktorá obsahuje K19, K33, K45, K52, K99, K105, K108, K115, K123, K134 a K136. Lyzínový zvyšok (zvyšky) môže byť nahradený akýmkoľvek iným aminokyselinovým zvyškom, ale výhodne je nahradený arginínom alebo glutamínom. Polypeptidom podľa vynálezu môže byť najmä polypeptid, v ktorom bol K45, K52 a/alebo K123 nahradený iným aminokyselinovým zvyškom, ale výhodne

arginínovým alebo glutamínovým zvyškom. Polypeptid môže byť exprimovaný aj s prívieskom, ako je podrobnejšie opísané napr. vo vyššie uvedenej časti s názvom "Konjugácia interferónového β polypeptidu s prívieskom".

Ešte ďalší príklad interferónového β polypeptidu podľa vynálezu zahŕňa polypeptid, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu líšiacu sa od sekvencie divého typu ľudského interferónu β v tom, že aspoň jeden lyzínový zvyšok vybraný zo skupiny, ktorá obsahuje K19, K33, K45, K52, K99, K105, K108, K115, K123, K134 a K136, je nahradený akýmkoľvek aminokyselinovým zvyškom, s podmienkou, že interferónový β polypeptid sa líši od hybridu medzi interferónom β a interferónom α , ktorý má následkom toho, že je hybridom, fenylalanín v polohe 45. Výhodnej je nahradený aspoň K19, K45, K52 a/alebo K123. Hoci je v súlade s týmto uskutočnením vynálezu možné lyzínový zvyšok deletovať, výhodné je nahradiť ho iným aminokyselinovým zvyškom, výhodne arginínovým alebo glutamínovým. Normálne obsahuje polypeptid podľa vynálezu aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši 1 až 15 aminokyselinovými zvyškami od aminokyselinovej sekvencie označenej ako sekv. č. 2, ako bolo podrobnejšie diskutované vyššie. Príklady polypeptidov podľa vynálezu sú vybrané zo skupiny obsahujúcej polypeptidy, ktoré zahŕňajú aminokyselinovú sekvenciu líšiacu sa od sekv. č. 2 aspoň nasledujúcimi substitúciami:

R27K+R159K;

R27K+K45R+R159K;

R27K+Q49K+E85K+A89K;

R27K+K45R+Q49K+E85K+A89K;

R27K+D39K+Q49K+E85K+A89K;

R27K+D39K+K45R+Q49K+E85K+A89K;

N4K+R27K+D39K+Q49K+E85K+A89K;

N4K+R27K+D39K+K45R+Q49K+E85K+A89K;

R27K+K123R+R159K;

R27K+K45R+K123R+R159K;

R27K+Q49K+E85K+A89K+K123R;

R27K+K45R+Q49K+E85K+A89K+K123R;

R27K+D39K+Q49K+E85K+A89K+K123R;

R27K+D39K+K45R+Q49K+E85K+A89K+K123R;
N4K+R27K+D39K+Q49K+E85K+A89K+K123R a
N4K+R27K+D39K+K45R+Q49K+E85K+A89K+K123R.

Bude zrejmé, že ktorýkoľvek z tu opísaných polypeptidov podľa vynálezu sa môže použiť na prípravu konjugátu podľa vynálezu, tzn. na kovalentné spojenie s ktoroukoľvek z tu opísaných nepolypeptidových častí. Najmä, keď sa polypeptid podľa vynálezu exprimuje v glykozyľujúcom mikroorganizme, môže byť poskytnutý v glykozyľovanej forme.

Spôsoby prípravy interferónového β polypeptidu na použitie podľa vynálezu

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

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

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

Alternatívne sa nukleotidová sekvencia pripravuje chemickou syntézou, napr. použitím oligonukleotidového syntetizéra, v ktorom sa oligonukleotidy navrhujú na základe aminokyselinovej sekvencie požadovaného polypeptidu a výhodne sa vyberajú tie kodóny, ktoré sú uprednostňované hostiteľskou bunkou, v ktorej bude

produkovaný rekombinantný polypeptid. Napríklad, niekoľko malých oligonukleotidov kódujúcich časti požadovaného polypeptidu môže byť syntetizovaných a zostavených prostredníctvom PCR, ligácie alebo ligačnej reťazovej reakcie (LCR). Jednotlivé oligonukleotidy typicky obsahujú 5' alebo 3' prečnievania na komplementárne zostavovanie.

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

Samozrejme je potrebné, aby bolo zrejmé, že nie všetky vektory a expresné riadiace sekvencie fungujú rovnako dobre pri expresii nukleotidovej sekvencie kódujúcej tu opísaný polypeptidový variant. Nie všetci hostitelia budú fungovať rovnako dobre s rovnakým expresným systémom. Avšak priemerný odborník v oblasti môže vybrať spomedzi týchto vektorov, expresných riadiacich sekvencií a hostiteľov bez nadmerného experimentovania. Napríklad, pri výbere vektora je potrebné brať do úvahy hostiteľa, pretože vektor sa v ňom musí replikovať alebo musí byť schopný integrovať sa do chromozómu. Do úvahy je potrebné brať aj počet kópií vektora, schopnosť kontrolovať tento počet kópií a expresiu akýchkoľvek iných proteínov kódovaných vektorom, ako napríklad antibiotikových markerov. Pri výbere expresnej riadiacej sekvencie by sa mali zvažovať rôzne faktory. Tieto zahŕňajú napríklad relatívnu silu sekvencie, jej kontrolovateľnosť a jej kompatibilitu s nukleotidovou sekvenciou kódujúcou polypeptid, najmä čo sa týka potenciálnych sekundárnych štruktúr. Hostitelia by sa mali vyberať po zvážení ich kompatibility s vybraným vektorom, toxicity produktu kódovaného nukleotidovou sekvenciou, ich sekrečných vlastností, ich schopnosti správne poskladať polypeptid, ich fermentačných alebo kultivačných požiadaviek a jednoduchosti purifikácie produktov kódovaných nukleotidovou sekvenciou.

Rekombinantným vektorom môže byť autonómne sa replikujúci vektor, tzn. vektor, ktorý existuje ako extrachromozomálna entita, ktorej replikácia nie je závislá na chromozomálnej replikácii, napr. plazmid. Alternatívne je vektorom taký vektor, ktorý sa po zavedení do hostiteľskej bunky integruje do hostiteľského bunkového

genómu a replikuje sa spolu s chromozómom (chromozómami), do ktorého sa integroval.

Vektorom je výhodne expresný vektor, v ktorom je nukleotidová sekvencia kódujúca polypeptid podľa vynálezu operatívne spojená s ďalšími segmentami potrebnými na transkripciu nukleotidovej sekvencie. Vektor je typicky odvodený od plazmidovej alebo vírusovej DNA. Množstvo tu uvedených vhodných expresných vektorov na expresiu v hostiteľských bunkách je dostupných komerčne alebo opísaných v literatúre. Užitočné expresné vektory pre eukaryotických hostiteľov zahŕňajú napríklad vektory obsahujúce expresné riadiace sekvencie z SV40, hovädzieho papilloma vírusu, adenovírusu a cytomegalovírusu. Konkrétnymi vektormi sú napr. pCDNA3.1 (+)\Hyg (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a pCI-neo (Stratagene, La Jola, CA, USA). Užitočné expresné vektory pre bakteriálnych hostiteľov zahŕňajú známe bakteriálne plazmidy, ako napríklad plazmidy z *E. coli*, vrátane pBR322, pET3a a pET12a (oba od Novagen Inc., WI, USA), plazmidy so širším rozsahom hostiteľov, ako napríklad RP4, fágové DNA-y, napr. početné deriváty fága lambda, napr. NM989, a iných DNA fágov, ako napríklad M13 a vláknitých jednoreťazcových DNA fágov. Užitočné expresné vektory pre kvasinkové bunky zahŕňajú 2 μ plazmid a jeho deriváty, POT1 vektor (US 4931373), pJS037 vektor opísaný v Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782, 202-207, 1996 a pPICZ A, B alebo C (Invitrogen). Užitočné vektory pre hmyzie bunky zahŕňajú pVL941, pBG311 (Cate a ďalší, "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance And Expression of the Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, str. 685-98 (1986), pBluebac 4.5 a pMelbac (oba dostupné od Invitrogen).

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

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

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

Výraz "riadiace sekvencie" je tu definovaný tak, aby zahŕňal všetky komponenty, ktoré sú nevyhnutné alebo výhodné na expresiu polypeptidu podľa vynálezu. Každá riadiaca sekvencia môže byť prirodzená alebo cudzia vo vzťahu k nukleokyselinovej sekvencii kódujúcej polypeptid. Takéto riadiace sekvencie zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na vedúcu sekvenciu, polyadenylačnú sekvenciu, propeptidovú sekvenciu, promótor, zosilňovač alebo aktivačnú sekvenciu proti smeru expresie génu (upstream), signálnu peptidovú sekvenciu a transkripčný terminátor. Minimálne zahŕňajú riadiace sekvencie promótor.

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

Príklady vhodných riadiacich sekvencií na riadenie transkripcie v cicavčích bunkách zahŕňajú skoré a neskoré promótory SV40 a adenovírusov, napr. adenovírusový 2. hlavný neskorý promótor, promótor MT-1 (metalotioneínového génu), okamžitý skorý promótor ľudského cytomegalovírusového génu (CMV), promótor ľudského elongačného faktora 1 α (EF-1 α), promótor minimálneho

tepelného šokového *Drosophila* proteínu 70 , promótor Rous sarkóma vírusu (RSV), promótor ľudského ubiquitínu C (UbC), terminátor ľudského rastového hormónu, polyadenylačné signály SV40 alebo adenovírusovej Elb oblasti a Kozakovu konsenzus sekvenciu (Kozak, M. J Mol Biol 1987 Aug 20; 196 (4): 947-50).

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

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

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

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

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

Nukleotidová sekvencia podľa vynálezu kódujúca interferónový β polypeptid, či už pripravená miestne špecifickou mutagenézou, syntézou alebo inými metódami, môže alebo nemusí obsahovať aj nukleotidovú sekvenciu, ktorá kóduje signálny peptid. Signálny peptid je prítomný, keď sa má polypeptid vylučovať z buniek, v ktorých sa exprimuje. Takýto signálny peptid, ak je prítomný, by mal byť

rozoznávaný bunkou zvolenou na expresiu polypeptidu. Signálny peptid môže byť homologický (napr. to môže byť peptid, ktorý je normálne spojený s ľudským interferónom β) alebo heterologický (tzn. pochádzajúci z iného zdroja ako ľudský interferón β) s polypeptidom alebo môže byť homologický alebo heterologický s hostiteľskou bunkou, tzn. môže byť peptidom, ktorý sa normálne exprimuje v hostiteľskej bunke, alebo môže byť peptidom, ktorý sa normálne neexprimuje v hostiteľskej bunke. Z toho vyplýva, že signálny peptid môže byť prokaryotický, napr. odvodený od baktérie, ako napríklad *E. coli*, alebo eukaryotický, napr. odvodený od cicavčej alebo hmyzej alebo kvasinkovej bunky.

Prítomnosť alebo neprítomnosť signálneho peptidu bude závisieť napr. na expresii hostiteľskej bunky použitej na produkciu polypeptidu, na proteíne, ktorý sa má exprimovať (či je to vnútrobunkový alebo extracelulárny proteín) a na tom, či je želateľné získať sekréciu. Na použitie vo vláknitých hubách môže byť signálny peptid bežne odvodený od génu kódujúceho *Aspergillus sp.* amylázu alebo glukoamylázu, génu kódujúceho *Rhizomucor miehei* lipázu alebo proteázu alebo *Humicola lanuginosa* lipázu. Signálny peptid je výhodne odvodený od génu kódujúceho *A. oryzae* TAKA amylázu, *A. niger* neutrálnu α -amylázu, *A. niger* amylázu stabilnú v kyslom prostredí alebo *A. niger* glukoamylázu. Na použitie v hmyzích bunkách môže byť signálny peptid jednoducho odvodený od hmyzieho génu (cf. WO 90/05783), ako napríklad génu prekursora adipokinetického hormónu motýľa *Manduca sexta*, (cf. US 5,023,328), génu pre včelí melitín (Invitrogen), génu pre ekdysteroidnú UDP glukozyltransferázu (*egt*) (Murphy a ďalší, Protein Expression and Purification 4, 349-357 (1993)) alebo génu pre ľudskú pankreatickú lipázu (*hpl*) (Methods in Enzymology 284, str. 262-272, 1997).

Výhodným signálnym peptidom na použitie v cicavčích bunkách je signálny peptid ľudského interferónu β zrejmy z nižšie uvedených príkladov alebo signálny peptid hlodavčieho Ig kapa ľahkého reťazca (Coloma, M (1992) J. Imm. Methods 152: 89-104). Zistilo sa, že na použitie v kvasinkových bunkách sú vhodnými signálnymi peptidmi signálny peptid α -faktora zo *S. cerevisiae* (cf. US 4870008), signálny peptid myšacej slinnej amylázy (cf. O. Hagenbuehle a ďalší, Nature 289, 1981, str. 643-646), modifikovaný karboxypeptidázový signálny peptid (cf. L. A.

Valls a ďalší, Cell 48,1987, str. 887-897), kvasinkový BAR1 signálny peptid (cf. WO 87/02670) a signálny peptid kvasinkovej asparágovej proteázy 3 (YAP3) (cf. M. Egel-Mitani a ďalší, Yeast 6,1990, str. 127-137).

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

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

Príklady vhodných kvasinkových hostiteľských buniek zahŕňajú kmene *Saccharomyces*, napr. *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Klyveromyces*, *Pichia*,

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

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

Príklady vhodných cicavčích hostiteľských buniek zahŕňajú vaječníkové bunkové línie čínskeho škrečka (CHO) (napr. CHO-K1; ATCC CCL-61), mačiakové bunkové línie (COS) (napr. COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); myšacie bunky (napr. NS/O), obličkové bunkové línie z mladých škrečkov (napr. ATCC CRL-1632 alebo ATCC CCL-10) a ľudské bunky (napr. HEK 293 (ATCC CRL-1573)), ako aj rastlinné bunky v tkanivovej kultúre. Ďalšie vhodné bunkové línie sú známe v oblasti a dostupné z verejných zbierok, ako napríklad American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Cicavčie bunky, ako napríklad CHO bunky, môžu byť aj modifikované, aby exprimovali sialyltransferázu, napr. 1,6-sialyltransferázu, ako je opísané napr. v US 5047335, aby sa poskytla zlepšená glykozylácia interferónového β polypeptidu.

Spôsoby zavádzania exogénnej DNA do cicavčích hostiteľských buniek zahŕňajú transfekciu sprostredkovanú fosforečnanom vápenatým, elektroporáciu, DEAE-dextránom sprostredkovanú transfekciu, lipozómom sprostredkovanú transfekciu, vírusové vektory a transfekčné spôsoby opísané v Life Technologies Ltd, Paisley, UK použitím Lipofectamin 2000 a Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA použitím FuGENE 6. Tieto spôsoby sú v oblasti dobre známe a opísané napr. v Ausbel a ďalší (vyd.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA. Kultivácia cicavčích buniek sa uskutočňuje

podľa zavedených metód, ako je opísané napr. v *Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols*, vyd. Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc, Totowa, New Jersey, USA a Harrison MA a Rae IF, *General Techniques of Cell Culture*, Cambridge University Press 1997.

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

Výsledný polypeptid môže byť izolovaný spôsobmi známymi v oblasti. Polypeptid sa môže z nutričného média izolovať napríklad jednoduchými spôsobmi, ktoré zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na centrifugáciu, filtráciu, extrakciu, sprejové sušenie, odparovanie alebo precipitáciu.

Polypeptidy sa môžu purifikovať rôznymi postupmi známymi v oblasti, ktoré zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na chromatografiu (napr. iónová výmenná, afinitná, hydrofóbna chromatografia, chromatofokusovanie a veľkostné vylučovanie), elektroforetické postupy (napr. preparatívna izoelektrická fokusácia), diferenciáciu rozpustnosti (napr. precipitácia so síranom amónnym), SDS-PAGE alebo extrakciu (pozri napr. *Protein Purification*, J.-C. Janson a Lars Ryden, vyd., VCH Publishers, New York, 1989). Konkrétne spôsoby purifikácie polypeptidov vykazujúcich aktivitu interferónu β sú opísané v US 4289689, US 4359389, US 4172071, US 4551271, US 5244655, US 4485017, US 4257938 a US 4,541,952. Špecifický purifikačný spôsob je založený na imunoafinitnej purifikácii (pozri napr. Okamura a ďalší, "Human Fibroblastoid Interferon: Immunosorbent Column Chromatography

And N-Terminal Amino Acid Sequence", Biochem., 19, str. 3831-35 (1980)). Okrem toho môže byť purifikácia založená na použití IFNAR 1 a/alebo IFNAR 2, najmä IFNAR 2.

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

Bunková kultúra podľa vynálezu

Ďalší predmet vynálezu sa týka bunkovej kultúry, ktorá obsahuje a) hostiteľskú bunku transformovanú nukleotidovou sekvenciou kódujúcou polypeptid vykazujúci aktivitu interferónu β a b) kultivačné médium obsahujúce uvedený polypeptid produkovaný expresiou uvedenej nukleotidovej sekvencie v koncentrácii najmenej 800000 IU/ml média, výhodne v koncentrácii v rozsahu 800000 až 3500000 IU/ml média. Hoci polypeptidom vykazujúcim aktivitu interferónu β môže byť divý typ interferónu β , napr. ľudský interferón β alebo jeho variant (napr. interferón β 1a alebo β 1b), polypeptidom je výhodne tu opísaný interferónový β polypeptid.

Ešte ďalší predmet vynálezu sa týka spôsobu produkcie tu opísaného interferónového β polypeptidu, ktorý zahŕňa:

- a) kultiváciu bunky exprimujúcej interferónový β polypeptidový variant v kultivačnom médiu, tak, aby bola koncentrácia interferónového β polypeptidového variantu v médiu najmenej 800000 IU/ml média, najmä v rozsahu 800000 až 3500000 IU/ml média, a
- b) izoláciu interferónového β polypeptidu.

Iné spôsoby podľa vynálezu

Ešte ďalší predmet vynálezu sa týka spôsobu redukcie imunogénnosti a/alebo predĺženia funkčného *in vivo* polčasu rozpadu a/alebo sérového polčasu rozpadu interferónového β polypeptidu, ktorý zahŕňa začleňovanie aminokyselinového zvyšku tvoriaceho pripájajúcu skupinu pre prvú nepolypeptidovú časť do polohy vystavenej na povrchu proteínu, ktorá neobsahuje takúto skupinu, a/alebo odstraňovanie aminokyselinového zvyšku tvoriaceho pripájajúcu skupinu pre prvú nepolypeptidovú časť a konjugovanie výsledného modifikovaného polypeptidu s prvou nepolypeptidovou časťou.

Výhodne je aminokyselinový zvyšok, ktorý sa má začleniť a/alebo odstrániť, v súlade s definíciou podľa predloženej prihlášky. Nepolypeptidová časť je normálne vybraná zo skupiny, ktorá obsahuje polymérnu molekulu, sacharidovú časť, lipofilnú skupinu a organické derivatizačné činidlo.

Ešte ďalší predmet vynálezu sa týka spôsobu prípravy konjugátu podľa vynálezu, pričom interferónový β polypeptid reaguje s nepolypeptidovou časťou, s ktorou sa má konjugovať, v podmienkach vedúcich k uskutočneniu konjugácie a konjugát sa izoluje.

Farmaceutický prostriedok a použitie konjugátu podľa vynálezu

Interferónový β polypeptid alebo konjugát podľa vynálezu sa podávajú v dávke, ktorá približne zodpovedá dávke využívanej v terapii s ľudským interferónom β , ako napríklad Avonexom, Rebifom a Betaseronom, alebo vo vyšších dávkach. Presná dávka, ktorá sa má podávať, závisí na okolnostiach. Normálne by dávka mala byť schopná zabrániť alebo znížiť závažnosť alebo rozšírenie stavu alebo indikácie, ktorá sa lieči. Pre priemerného odborníka v oblasti bude zrejmé, že účinné množstvo polypeptidu, konjugátu alebo prostriedku podľa vynálezu *inter alia* závisí na ochorení, dávke, rozvrhu podávania, na tom, či sa polypeptid alebo konjugát alebo prostriedok podáva sám alebo spolu s inými terapeutickými činidlami, na sérovom polčase rozpadu prostriedkov a na všeobecnom zdravotnom stave pacienta.

Polypeptid alebo konjugát podľa vynálezu môže byť používaný ako taký a/alebo vo forme jeho solí. Vhodné soli zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na soli s

alkalickými kovmi alebo kovmi alkalických zemín, ako napríklad sodíkom, draslíkom, lítiom, vápnikom a horčíkom, ako aj napr. zinočnaté soli. Tieto soli alebo komplexy môžu mať kryštalickú a/alebo amorfnú štruktúru.

Polypeptid alebo konjugát podľa vynálezu je výhodne podávaný v prostriedku obsahujúcom farmaceuticky prijateľný nosič alebo excipient. "Farmaceuticky prijateľný" znamená nosič alebo excipient, ktorý nespôsobuje žiadne nežiadúce účinky pacientom, ktorým sa podáva. Takéto farmaceuticky prijateľné nosiče a excipienty sú v oblasti dobre známe.

Polypeptid alebo konjugát podľa vynálezu môže byť formulovaný do farmaceutických prostriedkov prostredníctvom dobre známych spôsobov. Vhodné prostriedky sú opísané v US 5183746; Remington's Pharmaceutical Sciences od E. W. Martin, 18. vydanie, A. R. Gennaro, vyd., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer a L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; a Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3. vydanie, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000].

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

Farmaceutický prostriedok obsahujúci polypeptid alebo konjugát podľa vynálezu sa môže podávať orálne, intravenózne, intracerebrálne, intramuskulárne, intraperitoneálne, intradermálne, subkutánne, intranazálne, intrapulmonárne, inhaláciou alebo akýmkoľvek iným prijateľným spôsobom, napr. použitím PowderJect alebo ProLease technológie. Výhodný spôsob podávania bude závisieť na konkrétnej indikácii, ktorá sa má liečiť, a bude pre priemerného odborníka v oblasti zrejmy.

Parenterálne prostriedky

Príkladom farmaceutického prostriedku je roztok upravený na parenterálne podávanie. Hoci sú v mnohých prípadoch farmaceutické roztokové prostriedky poskytnuté v kvapalnej forme, vhodnej na okamžité použitie, môžu byť takéto

parenterálne prostriedky poskytnuté aj v zmrazenej alebo lyofilizovanej forme. V prípade zmrazenej formy musí byť pre použitím prostriedkov rozmrazený. Lyofilizovaná forma sa často používa na posilnenie stability účinnej zlúčeniny obsiahnutej v prostriedku v širokom rozsahu skladovacích podmienok. Ako je zrejmé pre priemerného odborníka v oblasti, lyofilizované prípravky sú vo všeobecnosti stabilnejšie ako ich kvapalné náprotivky. Takéto lyofilizované prípravky sa rekonštituujú pred použitím pridaním jedného alebo viacerých vhodných farmaceuticky prijateľných riedidiel, ako napríklad sterilnej vody pre injekcie alebo sterilného fyziologického roztoku.

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

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

kyseliny oxalovej a oxalátu sodného, zmes kyseliny oxalovej a hydroxidu sodného, zmes kyseliny oxalovej a oxalátu draselného, atď.), mliečnanové tlmivé roztoky (napr. zmes kyseliny mliečnej a mliečnanu sodného, zmes kyseliny mliečnej a hydroxidu sodného, zmes kyseliny mliečnej a mliečnanu draselného, atď.) a acetátové tlmivé roztoky (napr. zmes kyseliny octovej a octanu sodného, zmes kyseliny octovej a hydroxidu sodného, atď.). Ďalšími možnosťami sú fosfátové tlmivé roztoky, histidínové tlmivé roztoky a trimetylamínové soli, ako napríklad Tris.

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

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

Stabilizátory označujú širokú kategóriu excipientov, ktorých funkcia môže byť rôzna, od zväčšovania objemu po aditívum, ktoré solubilizuje terapeutické činidlo alebo pomáha zabraňovať denaturácii alebo adherovaniu na steny nádoby. Typickými stabilizátormi môžu byť polyhydrické sacharidové alkoholy (vymenované vyššie); aminokyseliny, ako napríklad arginín, lyzín, glycín, glutamín, asparagín, histidín, alanín, ornitín, L-leucín, 2-fenylalanín, kyselina glutámová, treonín, atď.; organické sacharidy alebo sacharidové alkoholy, ako napríklad laktóza, trehalóza, stacyóza, manitol, sorbitol, xylitol, ribitol, myoinizitol, galaktitol, glycerol a podobne, vrátane cyklitolov, ako napríklad inozitolu; polyetylénglykol; aminokyselinové polyméry; redukčné činidlá obsahujúce síru, ako napríklad močovina, glutatión, kyselina tioktová, tioglykolát sodný, tioglycerol, α -monotioglycerol a tiosulfát sodný; polypeptidy s nízkou molekulovou hmotnosťou (tzn. < 10 zvyškov); proteíny, ako

napríklad ľudský sérový albumín, hovädzí sérový albumín, želatína alebo imunoglobulíny; hydrofilné polyméry, ako napríklad polyvinylpyrolidón; monosacharidy, ako napríklad xylóza, manóza, fruktóza a glukóza; disacharidy, ako napríklad laktóza, maltóza a sacharóza; trisacharidy, ako napríklad rafinóza, a polysacharidy, ako napríklad dextrán. Stabilizátory sú typicky prítomné v rozsahu od 0,1 do 10000 hmotn. častí, vzťahnuté k hmotnosti účinného proteínu.

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

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

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

Prípravky s nepretržitým uvoľňovaním

Vhodné príklady prípravkov s nepretržitým uvoľňovaním zahŕňajú semi-permeabilné matrice tuhých hydrofóbných polymérov obsahujúce polypeptid alebo konjugát, ktoré majú vhodnú formu, sú napríklad vo forme filmu alebo mikrokapsúl. Príklady matric s nepretržitým uvoľňovaním zahŕňajú polyestery, hydrogély

(napríklad poly(2-hydroxyetyl-metakrylát) alebo poly(vinylalkohol)), polylaktidy, kopolyméry kyseliny L-glutámovej a etyl-L-glutamátu, nedegradovateľný etylénvinylacetát, degradovateľné kopolyméry kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej, ako napríklad ProLease® technológia alebo Lupron Depot® (injektovateľné mikrosféry zložené z kopolyméru kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej a leuprolidového acetátu) a kyselinu poly-D-(-)-3-hydroxybutyrovú. Zatiaľ čo polyméry ako etylén-vinylacetát a kopolymér kyseliny mliečnej a kyseliny glykolovej umožňujú vylučovanie molekúl v priebehu dlhej časovej periódy, ako napríklad do 100 dní alebo viac ako 100 dní, určité hydrogély vylučujú proteíny v priebehu kratších časových periód. Keď enkapsulované polypeptidy ostávajú v tele dlhý čas, môžu v dôsledku ich vystavenia vlhkosti pri 37 °C denaturovať alebo agregovať, čo vedie k strate biologickej aktivity a možným zmenám imunogenosti. V závislosti na použitom mechanizme je možné navrhnúť racionalizačné stratégie na stabilizáciu. Napríklad, ak sa zistí, že agregáčnym mechanizmom je vytváranie medzimolekulových S-S väzieb prostredníctvom tiodisulfidovej výmeny, je možné dosiahnuť stabilizáciu prostredníctvom modifikácie sulfhydrylových zvyškov, lyofilizáciou z kyslých roztokov, kontrolou obsahu vlhkosti, použitím príslušných aditív a vývojom špecifických polymérových matricových zložení.

Pľúcne dodávanie

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

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

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

Troma konkrétnymi príkladmi komerčne dostupných rozprašovačov vhodných na uskutočňovanie vynálezu sú Ultravent rozprašovač vyrábaný firmou Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Mo., Acorn II rozprašovač vyrábaný firmou Marquest Medical Products, Englewood, Colorado a AERx systém na dodávanie liečiva do pľúc vyrábaný firmou Aradigm Corporation, Hayward, California.

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

Častice so správnou veľkosťou sa potom suspendujú v hnacom plyne s pomocou povrchovo aktívnej látky. Hnacím plynom môže byť akýkoľvek bežný materiál používaný na tento účel, ako napríklad chlórfluóruhľovodík, fluóruhľovodík alebo uhľovodík, vrátane trichlórflórometánu, dichlórdifluórometánu, dichlórtetrafluóretanolu a 1,1,1,2-tetrafluóretánu alebo ich kombinácií. Vhodné povrchovo aktívne

látky zahŕňajú trioleát sorbitanu a sójový lecitín. Ako povrchovo aktívna látka môže byť užitočná aj kyselina olejová. Táto zmes sa potom naplní do dodávacieho zariadenia. Príkladom komerčne dostupného inhalátora s odmerným dávkovaním vhodného na použitie podľa predloženého vynálezu je Ventolin inhalátor s odmerným dávkovaním vyrábaný firmou Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.

Takéto konjugátové prostriedky pre práškové inhalátory budú obsahovať jemne rozdrvený suchý prášok obsahujúci konjugát a môžu obsahovať aj činidlo zväčšujúce objem, ako napríklad laktózu, sorbitol, sacharózu alebo manitol, v množstvách, ktoré uľahčujú dispergovanie prášku zo zariadenia, napr. 50 % až 90 % hmotn. prostriedku. Častice prášku by mali mať v pľúcach aerodynamické vlastnosti zodpovedajúce časticiam s hustotou približne 1 g/cm^2 , so stredným priemerom menším ako 10 mikrometrov, výhodne medzi 0,5 a 5 mikrometrami, najvýhodnejšie medzi 1,5 a 3,5 mikrometrami.

Príkladom práškového inhalátora vhodného na použitie v súlade s tu uvedeným opisom je Spinhaler práškový inhalátor vyrábaný firmou Fisons Corp., Bedford, Mass.

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

Farmaceutický prostriedok obsahujúci konjugát podľa vynálezu môže byť podávaný prostredníctvom veľkého množstva rôznych mechanických zariadení skonštruovaných na dodávanie terapeutických produktov do pľúc, vrátane, ale bez obmedzenia na rozprašovače, inhalátory s odmerným dávkovaním a práškové inhalátory, ktoré sú všetky pre priemerného odborníka v oblasti dobre známe.

Niektorými konkrétnymi príkladmi komerčne dostupných zariadení vhodných na uskutočňovanie tohto vynálezu sú Ultravent rozprašovač vyrábaný firmou Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; Acorn II rozprašovač vyrábaný firmou Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; Ventolin inhalátor s odmerným dávkovaním vyrábaný firmou Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; Spinhaler práškový inhalátor vyrábaný firmou Fisons Corp., Bedford, Massachusetts; "standing cloud" zariadenie od Inhale Therapeutic Systems, Inc., San Carlos, California; AIR inhalátor vyrábaný firmou Alkermes, Cambridge,

Massachusetts a AERx systém na dodávanie liečiva do pľúc vyrábaný firmou Aradigm Corporation, Hayward, California.

Farmaceutický prostriedok podľa vynálezu môže byť podávaný spolu s inými terapeutickými činidlami. Tieto činidlá môžu byť zahrnuté ako časť rovnakého farmaceutického prostriedku alebo môžu byť podávané oddelene od polypeptidu alebo konjugátu podľa vynálezu, buď zároveň, alebo podľa akéhokoľvek iného prijateľného rozvrhu liečby. Okrem toho môže byť polypeptid, konjugát alebo farmaceutický prostriedok podľa vynálezu používaný ako doplnok iných terapií.

Z toho vyplýva, že tento vynález poskytuje prostriedky a spôsoby liečby väčšiny typov vírusových infekcií, rakoviny alebo nádorov (napr. karcinómu prsníka, rakoviny iných ako malých buniek pľúc) alebo tumorovej angiogenézy, Chrohnovej choroby, vredovej kolitídy, Guillain-Barré syndrómu, gliómu, idiopatickej pľúcnej fibrózy, abnormálneho bunkového rastu alebo imunomodulácie u ktoréhokoľvek vhodného živočícha, výhodne cicavca a najmä človeka. Polypeptid, konjugát alebo prostriedok podľa vynálezu môže byť použitý najmä na liečbu sklerózy multiplex (MS), ako napríklad ktoréhokoľvek zo všeobecne rozoznávaných štyroch typov MS (benígnej, recidívu remitujúcej MS (RRMS), primárnej progresívnej MS (PPMS) a sekundárnej progresívnej MS (SPMS) a na liečbu monosymptomatickej MS), hepatitídy alebo herpesovej infekcie (herpesová infekcia sa voliteľne lieči v kombinácii s IL-10).

Ďalší predmet vynálezu sa týka spôsobu liečby cicavca majúceho cirkulujúce protilátky proti interferónu β 1a, ako napríklad Avonexu[®] alebo Rebifu[®], alebo 1b, ako napríklad Betaseronu[®], ktorý zahŕňa podávanie zlúčeniny, ktorá má biologickú aktivitu interferónu β , a ktorá má zníženú alebo žiadnu reakciu s uvedenými protilátkami. Zlúčenina sa podáva v účinnom množstve. Zlúčeninou je výhodne tu opísaný konjugát a cicavcom je výhodne človek. Cicavce, ktoré sa majú liečiť môžu trpieť akoukoľvek z vyššie uvedených chorôb, pri ktorých je interferón β užitočnou liečbou. Tento predmet vynálezu sa týka najmä liečby sklerózy multiplex (ktoréhokoľvek z vyššie uvedených typov) alebo rakoviny. Okrem toho sa vynález týka spôsobu výroby farmaceutického produktu na použitie na liečbu cicavcov majúcich cirkulujúce protilátky proti interferónu β 1a, ako napríklad Avonexu[®] alebo

Rebifu[®], alebo 1b, ako napríklad Betaseronu[®], pričom zlúčenina, ktorá má biologickú aktivitu interferónu β , a ktorá nereaguje s týmito protilátkami, je formulovaná v injektovateľnej alebo inej vhodnej formulácii. Výraz "cirkulujúce protilátky" je mienený ako označenie protilátok, konkrétne neutralizačných protilátok, vytvorených v cicavcovi ako odpoveď na liečbu s ktorýmkoľvek z komerčne dostupných interferónových β prípravkov (Rebif, Betaseron, Avonex).

Ďalší predmet vynálezu sa týka spôsobu liečby pacienta, ktorý potrebuje liečbu s farmaceutickým prostriedkom s aspoň niektorými terapeuticky užitočnými vlastnosťami interferónu β , ktorý zahŕňa podávanie prostriedku obsahujúceho zlúčeninu s aspoň časťou terapeuticky užitočnej aktivity interferónu β , pričom takáto liečba má redukované alebo nemá nežiadúce psychologické účinky v porovnaní s liečbou s interferónom β , pričom uvedenou zlúčeninou je nie prirodzene sa vyskytujúci konjugát polypeptidu s aktivitou interferónu β a nepolypeptidovej časti, najmä konjugát podľa predloženého vynálezu.

Ešte ďalší predmet vynálezu sa týka farmaceutického prostriedku na liečbu pacienta, ktorý potrebuje liečbu so zlúčeninou majúcou aspoň časť terapeuticky užitočných vlastností interferónu β , ktorý obsahuje zlúčeninu, ktorou je nie prirodzene sa vyskytujúci konjugát interferónu β a nepolypeptidovej časti, pričom dôsledkom takejto liečby je menej nežiadúcich psychologických účinkov ako pri liečbe s interferónom β . Konjugátom je výhodne konjugát podľa vynálezu.

Zahrnuté je aj použitie nukleotidovej sekvencie kódujúcej polypeptid podľa vynálezu v aplikáciách génovej terapie. Konkrétne, zaujímavé môže byť použitie nukleotidovej sekvencie kódujúcej polypeptid, ako je opísané v časti s názvom "Glykozylované polypeptidy podľa vynálezu modifikované tak, aby sa začlenili ďalšie glykozylačné miesta". Glykozylácia polypeptidov sa tak dosiahne v priebehu génovej terapie, tzn. po expresii nukleotidovej sekvencie v ľudskom tele.

Do úvahy sú brané aplikácie génovej terapie zahŕňajúce liečbu takých ochorení, pri ktorých sa exprimuje polypeptid, aby poskytol účinnú terapiu ako dôsledok jeho protivírusovej aktivity, napr. vírusových ochorení, vrátane hepatitídy, ako napríklad hepatitídy C, a najmä HPV, alebo iných infekčných ochorení, ktoré reagujú na interferón β alebo infekčných činiteľov citlivých na interferón β . Okrem

toho môže byť konjugát alebo polypeptid podľa vynálezu použitý na liečbu chronickej zápalovej demyelinizačnej polyradikuloneuropatie a ťažkých nekrotizujúcich kožných lézií. Zahnutá je aj génová terapia v spojitosti s liečbou ktoréhokoľvek typu MS. Podobne, vynález zahŕňa aj aplikácie génovej terapie na imunomoduláciu, ako aj na liečbu tých ochorení, pri ktorých sa očakáva, že interferón β poskytne účinnú terapiu v dôsledku jeho antiproliferatívnej aktivity, napr. na liečbu nádorov a rakoviny alebo iných stavov, ktoré sa vyznačujú nežiadúcou bunkovou proliferáciou, ako napríklad restenózy. Podrobný opis takejto génovej terapie je poskytnutý vo WO 95/25170.

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

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

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

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

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

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

DNA vírusom sprostredkovaný prenos DNA. Takéto DNA vírusy zahŕňajú adenovírusy (výhodne vektory založené na Ad-2 alebo Ad-5), herpes vírusy (výhodne vektory založené na víruse herpes simplex) a parvovírusy (výhodne

vektory založené na "defektných" a neautonómnych parvovírusoch, výhodnejšie vektory založené na adeno-asociovaných vírusoch, najvýhodnejšie vektory založené na AAV-2). Pozri napr. Ali a ďalší, "The Use Of DNA Viruses as Vectors for Gene Therapy", Gene Therapy, 1, str. 367-84 (1994); US 4797368 a US 5139941.

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

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 znázorňuje protivírusovú aktivitu konjugátu podľa vynálezu.

Obrázok 2 znázorňuje výťažok produkcie interferónu β získaný podľa príkladu 8.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Materiály a metódy

Materiály

HeLa bunky (dostupné z American Type Culture Collection (ATCC))

ISRE-Luc (Stratagene, La Jolla USA)

pCDNA 3.1/hygro (Invitrogen, Carlsbad USA)

pGL3 základný vektor (Promega)

Ľudská genomická DNA (CloneTech, USA)

DMEM médium: Dulbeccové modifikované eagle médium (DMEM), 10% fetálne hovädzie sérum (dostupné od Life Technologies A/S, Copenhagen, Dánsko)

Testy

Prehľad interferónových testov

Už bolo zverejnené, že interferón β interaguje a aktivuje interferónové receptory typu I na HeLa bunkách. V dôsledku toho sa aktivuje transkripcia v

promótoroch obsahujúcich interferénom stimulovaný rezponzívny element (ISRE). Takže je možné robiť skrining na agonistov interferónových receptorov použitím luciferázového reporterového génu spojeného s ISRE (ISRE-luc), ktorý sa nachádza v HeLa bunkách.

Primárny test

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

Na skrining muteínov sa naočkuje 150000 buniek/jamku na 96-jamkové kultivačné platne a inkubujú sa cez noc v DMEM médiu. Na nasledujúci deň sa k bunkám pridajú v rôznych koncentráciách muteíny, ako aj známe štandardy. Platne sa inkubujú 6 hodín pri 37 °C v 5% CO₂ vzdušnej atmosfére a následne sa do každej jamky pridá LucLite substrát (Packard Bioscience, Groningen, Holandsko). Platne sa utesnia a meria sa luminiscencia na TopCount luminometri (Packard) SPC (počítanie jednotlivých fotónov) spôsobom. Každá platňa obsahuje jamky inkubované s interferénom β , ako stimulovanou kontrolou, a iné jamky obsahujúce normálne médium, ako nestimulovanú kontrolu. Pomer medzi stimulovanou a nestimulovanou luciferázovou aktivitou slúži ako interný štandard tak pre muteínovú aktivitu, ako aj pre odchýlku medzi jednotlivými experimentmi.

Druhý test

V súčasnosti existuje 18 nealelických interferónových α génov a jeden interferónový β gén. Tieto proteíny vykazujú prekrývajúce sa aktivity, a tak je kritické zaistenie toho, aby si muteíny zachovávali selektivitu a špecificitu voči interferónu β .

β -R1 gén sa aktivuje interferénom β , a neaktivuje sa inými interferónmi. Takže transkripcia β -R1 slúži ako druhý marker aktivácie interferónu β a používa sa na zaistenie toho, že si muteíny zachovávajú interferónovú β aktivitu. 300bp

promótorový fragment β -R1, o ktorom sa ukázalo, že riadi interferón senzitívnu transkripciu (Rani. M. R. a ďalší (1996) JBC 27122878-22884), bol izolovaný prostredníctvom PCR z ľudskej genomickej DNA a začlenil sa do pGL3 základného vektora (Promega). Výsledný β -R1:luciferázový gén sa používa v podobných testoch, akým je vyššie opísaný primárny test. Bolo opísané, že v astrocytových bunkách vykazuje výsledný β -R1:luciferázový gén 250 násobne vyššiu senzitivitu voči interferónu β ako voči interferónu α (Rani a ďalší, vyššie).

ELISA test

Koncentrácia IFN- β sa kvantifikuje použitím komerčného sendvičového imunotestu (PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ, USA). Kit je založený na ELISA s monoklonálnymi myšimi anti-IFN- β protilátkami na zachytenie a detekciu IFN- β v testovacích vzorkách. Detekčná protilátka je konjugovaná s biotínom.

Testovacie vzorky a rekombinantný ľudský IFN- β štandard sa pridávajú v množstve 0,1 ml v koncentráciách od 10 do 0,25 ng/ml do mikrotitračných platní, ktoré boli vopred pokryté zachytávacou protilátkou. Platne sa inkubujú pri laboratórnej teplote 1 hodinu. Vzorky a štandard sa nariaďia v kitovom riediacom tlmivom roztoku. Platne sa premyjú v kitovom tlmivom roztoku a inkubujú sa s biotinylovanou detekčnou protilátkou v 0,1 ml 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Po ďalšom premytí sa pridá konjugát streptavidínu a chrenovej peroxidázy v 0,1 ml a inkubuje sa 1 hodinu pri laboratórnej teplote.

Reakcia sa vizualizuje pridaním 0,1 ml tetrametylbenzidínového (TMB) substrátového chromogénu. Platne sa inkubujú 15 minút v tme pri laboratórnej teplote a reakcia sa ukončí pridaním stop roztoku. Absorbancia sa odčítava pri 450 nm použitím ELISA snímača.

Receptorový väzobný test

Schopnosť polypeptidu alebo konjugátu podľa vynálezu viazať sa na receptor je možné stanoviť použitím testu opísaného vo WO 95/25170 s názvom "Analýza IFN- β (Phe₁₀₁) z hľadiska viazania sa na receptor" (ktorá je založená na Daudi alebo

A549 bunkách). Rozpusťné domény IFNAR1 a IFNAR2 je možné získať v podstate ako je opísané v Arduini a ďalší, Protein Science, 1999, zv. 8, 1867-1877 alebo ako je opísané tu, v príklade 9.

Alternatívne sa schopnosť viazať receptor stanovuje použitím zosieťovacieho činidla, ako napríklad disukcinimidylsüberátu (DSS) dostupného od Pierce, Rockford, IL, USA, nasledovne:

Polypeptid alebo konjugát sa inkubujú s rozpustným IFNAR-2 receptorom v prítomnosti alebo v neprítomnosti DSS v súlade s inštrukciami výrobcu. Vzorky sa rozdelia prostredníctvom SDS-PAGE a uskutoční sa Western blot použitím anti-interferónovej β protilátky alebo anti-IFNAR-2 protilátky. Prítomnosť funkčného interferónového β polypeptidu/konjugátu: receptorová interakcia je zrejma prostredníctvom zväčšenia molekulovej veľkosti receptora a interferónu β v prítomnosti DSS.

Okrem toho môže zosieťovací test použitím polypeptidu alebo konjugátu podľa vynálezu a oboch receptorových subjednotiek (IFNAR-1 a IFNAR-2) stanoviť schopnosť viazať sa na interferónový 1 receptor. V tejto súvislosti bolo publikované, že IFNAR-1 sa viaže len po vytvorení komplexu interferón β :IFNAR-2 (Mogensen a ďalší, Journal of Interferon and Cytokine Research, 19: 1069-1098, 1999).

In vitro testy imunogénnosti interferónových β konjugátov

Znížená imunogénnosť konjugátu alebo polypeptidu podľa vynálezu sa stanovuje použitím ELISA spôsobu, meraním imunoreaktivity konjugátu alebo polypeptidu v porovnaní s referenčnou molekulou alebo prípravkom. Referenčnou molekulou alebo prípravkom je normálne rekombinantný ľudský interferónový β prípravok, ako napríklad Avonex, Rebif alebo Betaseron, alebo iný rekombinantný ľudský interferónový prípravok produkovaný rovnakým spôsobom, akým sú vyrábané tieto produkty. ELISA spôsob je založený na protilátkach od pacientov ošetrovaných s jedným z týchto rekombinantných interferónových prípravkov. Imunogénnosť sa považuje za zníženú, keď má konjugát alebo polypeptid podľa vynálezu štatisticky významne nižšiu odpoveď v teste ako referenčná molekula alebo prípravok.

Iným spôsobom stanovenia imunogénnosti je použitie sér od pacientov ošetrovaných s interferónom beta (tzn. akýmkoľvek komerčným interferónovým β produktom) analogickým spôsobom ako je opísané v Ross a ďalší, J. Clin Invest. 95,1974-78,1995. V protivírusovom neutralizačnom biologickom teste je výsledkom zníženej imunogénnosti znížená inhibícia konjugátu podľa vynálezu pacientovým sérom v porovnaní s divým typom (wt) IFN- β referenčnej molekuly. Okrem toho sa v biochemickom IFN väzobnom teste očakáva, že menej imunogénny konjugát sa viaže na pacientove IgG v menšom rozsahu ako referenčné IFN- β molekuly.

Na neutralizačný test sa referenčná a konjugátová molekula pridávajú v koncentráciách, ktoré poskytujú približne 80% ochranu vírusu v protivírusovom neutralizačnom biologickom teste. IFN- β proteíny sa miešajú s patientskými sérami v rôznych riedeniach (vychádzajúc z pomeru 1:20).

Protivírusová aktivita

Protivírusový biologický test sa uskutočňuje použitím A549 buniek (CCL 185, Americká zbierka tkanivových kultúr) a vírusu encefalomyokarditídy (EMC) (VR-129B, Americká zbierka tkanivových kultúr).

Bunky sa vysejú na 96-jamkové kultivačné platne v koncentrácii 10000 buniek/jamku a inkubujú sa pri 37 °C v 5% CO₂ vzdušnej atmosfére. Pridá sa polypeptid alebo konjugát podľa vynálezu v koncentráciách od 100 do 0,0001 IU/ml celkovo v 100 μ l DMEM média obsahujúceho fetálne teľacie sérum a antibiotiká.

Po 24 hodinách sa médium odstráni a do každej jamky sa pridá 0,1 ml čerstvého média obsahujúceho EMC vírus. EMC vírus sa pridáva v koncentrácii, ktorá spôsobuje 100% smrť buniek v bunkových kultúrach bez IFN- β po 24 hodinách.

Po ďalších 24 hodinách sa meria protivírusový účinok polypeptidu alebo konjugátu použitím WST-1 testu. K 0,1 ml kultúry sa pridá 0,01 WST-1 (WST-1 bunkové proliferačné činidlo, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemecko) a inkubuje sa pol až 2 hodiny pri 37 °C v 5% CO₂ vzdušnej atmosfére. Výsledkom štiepenia tetrazólievej soli WST-1 mitochondriálnymi dehydrogenázami v žijúcich

bunkách je vytvorenie formazánu, ktorý sa kvantifikuje meraním absorpcie pri 450 nm.

Neutralizácia aktivity v teste s interferénom stimulovaným responzívnym elementom (ISRE)

Interferónový β neutralizačný účinok anti-interferónového β séra sa analyzuje použitím testu ISRE-luciferázovej aktivity.

Používajú sa séra od pacientov ošetrovaných s interferénom β alebo od imunizovaných zvierat. Séra sa pridávajú buď v pevných koncentráciách (riedenie 1:20 až 1:500 (séra pacientov) alebo 20 až 600 ng/ml (zvieracie séra)), alebo v päťnásobných sériových riedeniach séra vychádzajúc z 1/20 (séra pacientov) alebo 600 ng/ml (zvieracie séra). Interferón β sa pridáva buď v päťnásobných riedeniach vychádzajúc z 25000 IU/ml alebo v pevnej koncentrácii (0,1 až 10 IU/ml) v celkovom objeme 80 μ l DMEM média + 10% FCS. Séra sa inkubujú 1 hodinu pri 37 °C s IFN- β .

Vzorky sa potom prenesú na 96-jamkové tkanivové kultivačné platne obsahujúce HeLa bunky transfekované s ISRE-Luc, ktoré predtým rástli 24 hodín (15000 buniek/jamku) v DMEM médiu. Kultúry sa inkubujú 6 hodín pri 37 °C v 5% CO₂ vzdušnej atmosfére. Následne sa do každej jamky pridá LucLite substrát (Packard Bioscience, Groningen, Holandsko). Platne sa utesnia a meria sa luminiscencia na TopCount luminometri (Packard) SPC spôsobom (počítaním jednotlivých fotónov).

Keď sa interferónové β vzorky titrujú v prítomnosti pevného množstva séra, definuje sa neutralizačný účinok ako násobok inhibície (FI) stanovený ako EC₅₀(w.sérum)/EC₅₀(w/o sérum). Redukcia protilátkovej neutralizácie interferónových β variantových proteínov sa definuje ako

$$\left(1 - \frac{\text{FI variant}}{\text{FI wt}}\right) \times 100 \%$$

Meranie biologického polčasu rozpadu PEG-interferónového β konjugátu

Meranie biologického polčasu rozpadu sa môže uskutočňovať množstvom spôsobov opísaných v literatúre. Jeden spôsob je opísaný v Munafo a ďalší (European Journal of Neurology 1998, zv. 5 č.2 str. 187-193), kde sa používa ELISA spôsob na detekciu sérových hladín interferónu β po subkutánnom a intramuskulárnom podaní interferónu β .

Tento test je dôležitý na hodnotenie biologických odpovedí na liečbu interferónom β , kvôli rýchlemu poklesu interferónových β sérových koncentrácií po i.v. podaní. Avšak predpokladá sa, že konjugáty podľa predloženého vynálezu budú mať predĺžené sérové polčasy rozpadu aj po i.v. podaní, čím bude umožnené ich meranie napr. ELISA spôsobom alebo primárnym skríningovým testom.

Študované boli aj rozličné farmakodynamické markery (napr. sérový neupterín a beta2 mikroglobulín) (Clin Drug Invest (1999) 18 (1): 27-34). Tieto je možné rovnako dobre použiť na hodnotenie biologického účinku. Tieto experimenty sa môžu uskutočňovať aj na vhodných živočíšnych druhoch, napr. potkanoch.

Testy na hodnotenie biologických účinkov interferónu β , ako napríklad protivírusového, protiproliferatívneho a imunomodulačného účinku (ako sú opísané napr. v Annals of Neurology 1995 zv. 37 č. 1 str. 7-15) je možné použiť spolu s tu opísanými primárnymi a sekundárnymi skríningovými testami na hodnotenie biologickej účinnosti konjugátu v porovnaní s divým typom interferónu β .

Nakoniec môže byť na stanovenie účinnosti konjugátu alebo polypeptidu podľa vynálezu použitý živočíšny model, ako napríklad bežne používaný experimentálny model autoimunitnej encefalomyelitídy (EAE). V EAE modeli vyvoláva imunizácia s myelínom alebo proteínmi odvodenými od myelínu ochorenie napodobujúce väčšinu zápalových a neurologických znakov sklerózy multiplex u ľudí. EAE bol použitý u myší, potkanov, králikov a kosmáčov (Cannella a ďalší, PNAS, 95, 10100-5, 1998; Zaprianova a ďalší, Morfologija, 112, 25-8, 1997; Hassouna a ďalší, J. Urology, 130, 806-10, 1983; Genain & Hauser J. Mol. Med. 75, 18797, 1997). Iné modely vrátane Theilerového hlodavčieho encefalomyelitídového vírusového (TMEV) modelu (Murray a ďalší, J. Neurosci. 18, 7306-14, 1998) budú používané na stanovovanie účinnosti interferónového β konjugátu.

PEGylácia polypeptidu s prívieskom s aktivitou interferónu β v mikrotitračných platniach

Spôsob zahŕňa:

Exprimovanie interferónového β polypeptidu s vhodným prívieskom, napr. ktorýmkoľvek z prívieskov, ktorých príklady sú uvedené vyššie vo všeobecnom opise.

Prenesenie kultivačného média do jednej alebo viacerých jamiek v mikrotitračnej platni, ktorá je schopná imobilizovať polypeptid s prívieskom. Ak je prívieskom His-His-His-His-His-His (Casey a ďalší, J. Immunol. Meth., 179, 105 (1995)), je možné použiť Ni-NTA HisSorb mikrotitračnú platňu komerčne dostupnú od QiaGen.

Po umožnení imobilizácie polypeptidu s prívieskom na mikrotitračnej platni sa jamky premyjú s tlmivým roztokom vhodným na viazanie a následnú PEGyláciu.

Inkubovanie jamiek so zvoleným aktivovaným PEG. Ako príklad sa používa M-SPA-5000 od Shearwater Polymers. Molárny pomer aktivovaného PEG ku polypeptidu musí byť optimalizovaný, ale typicky bude vyšší ako 10:1, typickejšie vyšší ako 100:1. Po vhodnom reakčnom čase pri laboratórnej teplote, čo je typicky približne 1 hodina, sa reakcia zastaví odstránením aktivovaného PEG roztoku. Konjugovaný proteín sa eluuje z platne prostredníctvom inkubovania s vhodným tlmivým roztokom. Vhodné elučné tlmivé roztoky môžu obsahovať imidazol, nadbytok NTA alebo inú chelatačnú zlúčeninu.

Konjugovaný proteín sa testuje podľa toho ako je to vhodné z hľadiska biologickej aktivity a imunogénnosti.

Tento príviesok je možné voliteľne odštiepiť použitím spôsobu známeho v oblasti, napr. použitím diaminopeptidázy, a Gln v polohe -1 bude konvertovaný na pyroglutamyl s GCT (glutamylcyklotransferázou) a nakoniec odštiepený s PGAP (pyro-glutamyl-aminopeptidázou), čím vznikne natívny proteín. Proces zahŕňa niekoľko krokov kovovej chelatačnej afinitnej chromatografie. Alternatívne je možné konjugovať polypeptid s prívieskom.

Pegylácia interferónového β polypeptidu naviazaného na receptor

Na optimalizáciu PEGylácie interferónového β polypeptidu spôsobom vylučujúcim PEGyláciu lyzínov podieľajúcich sa na rozoznávaní receptora bol vyvinutý nasledujúci spôsob:

Rozpusťné domény IFNAR1 a IFNAR2 sa získajú v podstate tak ako je opísané v Arduini a ďalší, Protein Science (1999), zv. 8: 1867-1877, alebo ako je opísané v príklade 9.

V PBS tlmivom roztoku pri pH 7 až 9 sa vytvorí ternárny komplex pozostávajúci s interferónového β polypeptidu, rozpustnej domény IFNAR1 a rozpustnej domény IFNAR2 so stechiometriou 1:1:1. Koncentrácia interferónového β polypeptidu je približne 20 $\mu\text{g/ml}$ alebo 1 μM a receptory sú prítomné v ekvimolárnej koncentrácii.

M-SPA-5000 od Shearwater Polymers, Inc sa pridá v 3 rozličných koncentráciách zodpovedajúcich 5, 20 alebo 100 molárnemu nadbytku interferónového β polypeptidu. Reakčný čas je 30 minút pri laboratórnej teplote. Po 30 minútach reakčného času sa pH reakčnej zmesi nastaví na pH 2,0 a reakčná zmes sa nanesie na Vydac C18 kolónu a eluuje sa v acetonitrilovom gradiente, v podstate tak ako je opísané v Utsumi a ďalší, J. Biochem., zv. 101, 1199-1208, (1987). Alternatívne a elegantnejšie je možné použiť izopropanolový gradient.

Frakcie sa analyzujú použitím tu opísaného primárneho skriningového testu a týmto spôsobom získaný aktívny PEGylovaný interferónový β polypeptid sa uskladňuje pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v PBS, pH 7, obsahujúcom 1 mg/ml HSA.

Ako alternatíva k vyššie opísanému postupu sa rozpustná doména IFNAR2 používa ako jediná receptorová zložka na vytvorenie binárneho komplexu. Okrem toho, IFNAR2 môže byť imobilizovaná na vhodnej živici (napr. Epoxy aktivovanej Sepharose 6B) v súlade s inštrukciami výrobcov pred tým, ako sa vytvorí binárny komplex. Po PEGylácii sa PEGylovaný interferón β eluuje s 0,1M glycinovým tlmivým roztokom, pH 2, a aktivita sa meria, ako bolo opísané, po nastavení pH na neutrálne.

Prístupná povrchová oblasť (ASA)

Počítačový program Access (B. Lee a F. M. Richards, J. Mol. Biol. 55: 379400 (1971)) verzia 2 (Copyright (c) 1983 Yale University) sa používa na vypočítanie prístupnej povrchovej oblasti (ASA) jednotlivých atómov v štruktúre. Tento spôsob typicky používa veľkosť sondy 1,4 Å a definuje prístupnú povrchovú oblasť (ASA) ako oblasť tvorenú centrom sondy. Pred touto kalkuláciou sa z koordinátovej sady odstráni všetky molekuly vody a všetky atómy vodíka, ako aj iné atómy, ktoré priamo nesúvisia s proteínom. Na vypočítavanie ASA sú dostupné alternatívne programy, napr. program WhatIf G. Vriend, J. Mol. Graph. (1990) 8, 52-56, elektronicky dostupný na WWW stránke <http://swift.emblheidelberg.de/servers2/> (R. Rodriguez a ďalší, CABIOS (1998) 14, 523-528), používajúci možnosť *Accessibility* na vypočítavanie prístupného molekulového povrchu.

Frakčná ASA bočného reťazca

Frakčná ASA bočných reťazcových atómov sa vypočítava vydelením súčtu ASA atómov v bočnom reťazci s hodnotou reprezentujúcou ASA bočných reťazcových atómov zvyšku v predĺženom ALA-x-ALA tripeptide. Pozri Hubbard, Campbell & Thornton (1991) J. Mol. Biol. 220, 507-530. V tomto príklade je CA atóm braný ako časť bočného reťazca glycinových zvyškov, ale nie ostávajúcich zvyškov. Nasledujúca tabuľka uvádza 100% ASA štandard pre vedľajší reťazec:

Ala	69,23 Å ²
Arg	200,35 Å ²
Asn	106,25 Å ²
Asp	102,06 Å ²
Cys	96,69 Å ²
Gln	140,58 Å ²
Glu	134,61 Å ²
Gly	32,28 Å ²
His	147,00 Å ²
Ile	137,91 Å ²
Leu	140,76 Å ²
Lys	162,50 Å ²

Met	156,08 Å ²
Phe	163,90 Å ²
Pro	119,65 Å ²
Ser	78,16 Å ²
Thr	101,67 Å ²
Trp	210,89 Å ²
Tyr	176,61 Å ²
Val	114,14 Å ²

Determinácia aminokyselinových zvyškov vystavených na povrchu

Trojrozmerná kryštalická štruktúra ľudského interferónu β s 2,2 Å rozlíšením (Karpusas a ďalší, Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1997) 94: 11813-11818) je dostupná s proteínovej databanky (PDB) (Bernstein a ďalší, J. Mol. Biol. (1977) 112 str. 535) a elektronicky je dostupná prostredníctvom The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB na <http://www.pdb.org/> pod prístupovým kódom 1AU1. Táto kryštalická štruktúra obsahuje dve nezávislé molekuly ľudského interferónu β . V tomto príklade je použitá molekula A.

Vystavenie na povrchu:

Použitím vyššie opísaného WhatIf programu sa zistilo, že nasledujúce zvyšky majú nulovú povrchovú prístupnosť svojich bočných reťazcových atómov (pre Gly sa používa prístupnosť CA atómu): G7, N14, C17, L21, I44, A55, A56, T58, I59, M62, L63, L98, L122, Y125, I129, L133, A142, W143, V146, I150, N153, I157, L160, T161 a L164.

Frakčné vystavenie na povrchu

Na ďalšiu analýzu bolo nevyhnutné remodelovať bočné reťazce zvyškov R71, R113, K115, L116, M117, kvôli priestorovým zrážkam. Remodeling sa uskutočňoval použitím Modeler 98, MSI INC. Uskutočňovanie frakčných ASA výpočtov použitím Access počítačového programu na remodelovanej interferónovej β molekule (zahŕňajúc len aminokyselinové zvyšky a bez N-pripojenej sacharidovej časti) viedlo k zisteniu, že v nasledujúcich zvyškoch je viac ako 25 % ich bočného

reťazca vystavených na povrchu: S2, N4, L5, F8, L9, R11, S12, F15, Q16 Q18, K19, W22, Q23, G26, R27, L28, E29, Y30, L32, K33, R35, M36, N37, D39, E42, K45, Q46, L47, Q48, Q49, Q51, K52, Q64, A68, R71, Q72, D73, S75, S76, G78, N80, E81, T82, E85, N86, A89, Y92, H93, N96, H97, K99, T100, E103, E104, K105, E107, K108, E109, D110, F111, R113, G114, K115, L116, S119, L120, H121, K123, R124, G127, R128, L130, H131, K134, A135, K136, E137, Y138, S139, H140, V148, R152, Y155, N158, G162, Y163, R165 a N166, a že nasledujúce zvyšky majú viac ako 50 % svojho bočného reťazca vystavených na povrchu: N4, L5, F8, S12, F15, Q16, K19, W22, G26, R27, E29, Y30, K33, R35, N37, D39, E42, Q46, Q48, Q49, Q51, K52, R71, D73, S75, G78, N80, E81, T82, E85, N86, A89, Y92, H93, K99, T100, E103, E104, E107, K108, D110, F111, L116, K123, R124, G127, H131, K134, E137, V148, Y155, R165 a N166.

Príklad 1

Návrh expresnej kazety na expresiu interferónu β v cicavčích a hmyzích bunkách

DNA sekvencia, GenBank poradové číslo M28622 (označená ako sekv. č. 1), obsahujúca celú dĺžku cDNA kódujúcej ľudský interferón β s jeho prirodzeným signálnym peptidom, bola modifikovaná tak, aby bola uľahčená silná expresia v cicavčích bunkách. Kontext prvého ATG štartovacieho kodónu bol modifikovaný podľa Kozakovej konsenzus sekvencie (Kozak, M. J Mol Biol 1987 Aug 20; 196 (4): 947-50), tak, že sa úplne zhodovala s konsenzus sekvenciou pred ATG štartovacím kodónom. Za druhé sa kodóny prirodzeného ľudského interferónu β modifikovali vytvorením posunu v používaní kodónov smerom ku kodónom, ktoré sú často používané v silno exprimovaných ľudských génoch. Následne boli určité nukleotidy v sekvencii substituované inými, aby sa zaviedli miesta rozoznávané DNA restriktčnými endonukleázami (to umožňuje neskoršie ľahšiu modifikáciu DNA sekvencie). Primery sa navrhli tak, aby bolo možné syntetizovať gén:

CBProFpr1:

5'GGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTCGCCACCATGACCAACAAGTGCCTGCTCC
AGATCGCCCTGCTCCTGT-3', sekv. č. 3,

CBProFpr2:

5'ACAACCTGCTCGGCTTCCTGCAGAGGAGTTCGAACTTCCAGTGCCAGAAGCT
CCTGTGGCAGCTGAACGG-3', sekv. č. 4,

CBProFpr3:

5'GAACTTCGACATCCCCGAGGAAATCAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGA
GGACGCCGCTCTGACCATC-3', sekv. č. 5,

CBProFpr4:

5'TTCCGCCAGGACTCCAGCTCCACCGGTTGGAACGAGACCATCGTGGAGAAC
CTGCTGGCCAACGTGTACC-3', sekv. č. 6,

CBProFpr5:

5'AGGAGAAGCTGGAGAAGGAGGACTTCACCCGCGGCAAGCTGATGAGCTCCC
TGCACCTGAAGCGCTACTA-3', sekv. č. 7,

CBProFpr6:

5'GGAGTACAGCCACTGCGCCTGGACCATCGTACGCGTGGAGATCCTGCGCAA
CTTCTACTTCATCAACCGC-3', sekv. č. 8,

CBProFpr9:

5'CACCACACTGGACTAGTGGATCCTTATCAGTTGCGCAGGTAGCCGGTCAGG
CGGTTGATGAAGTAGAAGT-3', sekv. č. 9,

CBProFpr10:

5'AGGCGCAGTGGCTGTACTCCTTGGCCTTCAGGTAGTGCAGGATGCGGCCAT
AGTAGCGCTTCAGGTGCAG-3', sekv. č. 10,

CBProFpr11:

5'CTCCTTCTCCAGCTTCTCCTCCAGCACGGTCTTCAGGTGGTTGATCTGGTGG
TACACGTTGGCCAGCAGG-3', sekv. č. 11,

CBProFpr12:

5'GAGCTGGAGTCCTGGCGGAAGATGGCGAAGATGTTCTGCAGCATCTCGTAG
ATGGTCAGAGCGGCGTCCT-3', sekv. č. 12,

CBProFpr13:

5'CCTCGGGGATGTCGAAGTTCATCCTGTCCTTCAGGCAGTACTCCAGGCGCC
CGTTCAGCTGCCACAGGAG-3', sekv. č. 13,

CBProFpr14:

5'CAGGAAGCCGAGCAGGTTGTAGCTCATCGATAGGGCCGTGGTGCTGAAGCA
CAGGAGCAGGGCGATCTGG-3', sekv. č. 14.

Primery sa zostavili do syntetického génu jednokrokovou PCR použitím Platinum Pfx-polymerázového kitu (Life Technologies) a štandardných trojkrokových PCR cyklických parametrov. Zostavený gén sa amplifikoval prostredníctvom PCR použitím rovnakých podmienok.

cDNA kódujúca formu ľudského interferónu β predĺženú na N-konci sa syntetizovala použitím rovnakých PCR podmienok ako boli opísané vyššie, ale primery CBProFpr1 a -14 boli nahradené primermi:

CBProFpr7

5'CTGCTCCAGATCGCCCTGCTCCTGTGCTTCAGCACCACGGCCCTATCGATGA
AGCACCAGCACCAGCATC-3', sekv. č. 15,

CBProFpr8

5'CACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAA
GCTGGCTAGCGTTTAAAC-3', sekv. č. 16,

CBProFpr15

5'CAGGAAGCCGAGCAGGTTGTAGCTCATCTGTTGGTGTGATGTTGGTGCTGA
TGCTGGTGCTGGTGCTTC-3', sekv. č. 17,

CBProFpr16

5'AGCAGGGCGATCTGGAGCAGGCACTTGTGGTCATGGTGGCGAAGCTTAAG
TTTAAACGCTAGCCAGCTT-3', sekv. č. 18,

aby sa do interferónovej β molekuly začlenil purifikačný privesok.

Syntetizované gény sa klonovali do pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen) medzi *HindIII* miesto na 5' konci a *BamHI* miesto na 3' konci, čím vznikli pCBProF1 a pCBProF2.

Syntetický intrón z pCI-Neo (Promega) sa amplifikoval použitím vyššie opísaných štandardných PCR podmienok a nasledujúcich plazmidov:

CBProFpr37

5'-CCGTCAGATCCTAGGCTAGCTTATTGCGGTAGTTTATCAC-3', sekv. č. 19,

CBProFpr38

5'-GAGCTCGGTACCAAGCTTTTAAAGAGCTGTAAT-3', sekv. č. 20,

čím vznikol 332bp PCR fragment, ktorý sa poštíepil s *NheI* a *HindIII* a začlenil sa do 5'UTR plazmidov pCBProF1 a pCBProF2, čím vznikli pCBProF4 a pCBProF5.

Kodóny pre jednotlivé aminokyseliny sa zmenili amplifikáciou relevantných oblastí kódujúcej oblasti prostredníctvom PCR takým spôsobom, aby zmeny v sekvencii zavedené prostredníctvom PCR mohli byť začlenené do expresných plazmidov klasickými klonovacími technikami. Napr. primery:

Lys45arg-5'primer (NarI/KasI):

5'GCTGAACGGGCGCCTGGAGTACTGCCTGAAGGACAGGATGAACTTCGACAT
CCCCGAGGAAATCCGCCAGCTGCAGC-3', sekv. č. 21,

Lys45mut-3'primer (BsiWI):

5'TCTCCACGCGTACGATGGTCCAGGCGCAGTGGCTG-3', sekv. č. 22,

boli použité na zavedenie K45R substitúcie do PCR fragmentu zahŕňajúceho oblasť od polohy 1055 po polohu 1243 v pCBProF 1. Tak PCR fragment, ako aj pCBProF1 boli poštíepené s *NarI* a *BsiWI*, pričom obe štíepili len v jednom mieste. PCR fragment a vektorová kostra pCBProF1 sa purifikovali a ligovali, čo viedlo k substitúcii Lys45 kodónu AAG s Arg kodónom CGC v pCBProF1.

Okrem toho bola na začleňovanie aminokyselinových substitúcií použitá SOE (prečnievajúce výbežky sekvencie) PCR. V SOE-PCR sa v jednotlivých primárnych PCRs najprv amplifikovala N-koncová časť, ako aj C-koncová časť INFB molekuly.

Pre tieto primárne PCR sa syntetizovali centrálné komplementárne primery tak, aby kodón (kodóny) pre aminokyselinu (aminokyseliny), ktorá sa má substituovať, bol zamenený za požadovaný kodón (kodóny). Koncové primery boli štandardnými primermi, ktoré definovali N-, respektíve C-koniec INFB molekuly. Ďalej terminálne primery poskytovali miesto rozoznávané restričnou endonukleázou, čo umožňovalo následné klonovanie PCR produktu s úplnou dĺžkou. Takže centrálny (nonsense) primer a N-koncový (sense) primer boli použité na amplifikáciu N-koncovej časti INFB kódujúcej oblasti v jednej z primárnych PCRs a rovnako tomu bolo pre C-koncovú časť. Keď sa už N- a C-koncové časti amplifikovali, zostavili sa v sekundárnej PCR do produktu s úplnou dĺžkou a klonovali sa do modifikovanej verzie pCDNA3.1/Hygro ako bolo opísané vyššie. Nasledujúce primery boli napríklad použité na zavedenie mutácií pre substitúcie F111N a R113T:

CBProFprimer9 (Sense):

CACCACACTGGACTAGTGGATCCTTATCAGTTGCGCAGGTAGCCGGTCAGGC
GGTTGATGAAGTAGAAGT (sekv. č. 23),

CBProFprimer231 (Antisense):

CATCAGCTTGCCGGTGGTGTTCCTCCTTC (sekv. č. 24),

CBProFprimer230 (Sense):

GAAGGAGGACAACACCACCGCAAGCTGATG (sekv. č. 25),

CBProFprimer42 (Antisense):

CACACTGGACTAGTAAGCTTTTATCAGTTGCGCAGGTAGC (sekv. č. 26).

Okrem toho boli v prípadoch, kedy bola zavádzaná mutácia (mutácie) v expresnom plazmide dostatočne blízko unikátneho miesta rozoznávaneho restričnou endonukleázou, variantné gény konštruované použitím konštrukčného postupu zahŕňajúceho jediný PCR krok a následné klonovanie. Napríklad, substitúcia K19R bola zavádzaná použitím PCR primeru:

CBProFpr58:

GAGGAGTTCGAACTTCCAGTGCCAGCGCCTCCTGTGGCAGCTGAACG (sekv. č. 27) a *CBProFprimer9*:

PCR produkt sa následne klonoval použitím restričných endonukleázových miest *BsiWI* a *BstBI*.

Príklad 2

Expresia ľudského interferónu β v bakulovírusovom/hmyzom bunkovom systéme

Aby sa exprimoval syntetický gén kódujúci ľudský interferón β umiestnený v pCBProF1 (opísaný v príklade 1) v bakulovírusovom/hmyzom bunkovom systéme, gén sa vystrihol s *NheI* a *XhoI* a ligoval sa s transferovým vektorom pBlueBac 4.5, ktorý je súčasťou MaxBac 2.0 transfekčného kitu získaného od Invitrogen (San Diego, USA). Všetky spôsoby použité na generovanie rekombinantného bakulovírusu a na expresiu v hmyzích bunkách sú opísané v "MaxBac 2.0 Transfection and Expression Manual", ktorý je súčasťou kitu.

V stručnosti: spolu s linearizovanou AcMNPV DNA (Bac-N-Blue DNA) sa pBlueBac 4.5-interferón β CBProF1 preniesol do SF9 buniek. 3 dni po transfekcii sa

odobral transfekčný supernatant a pripravil sa plakový test s príslušnými vírusovými riedeniami. Modré ohraničené plaky boli viditeľné po 7 dňoch a izolovalo sa 6 jednotlivých plakov na rozmnožovanie v 6-jamkovej platni. Po 5 dňoch sa z každej jamky odobrali 2 ml vírusového supernatantu (P-1 zásobný roztok). Z P-1 zásobných roztokov sa odobralo 0,75 ml a izolovala sa vírusová genomická DNA. Vírusové genomické DNA sa analyzovali v PCR reakciách s priamymi/reverznými primermi, aby bolo možné selektovať rekombinantné bakulovírusy spomedzi šiestich P-1 zásobných roztokov. Malá alikvota z rekombinantného P-1 zásobného roztoku sa testovala v ľudskej interferónovej β špecifickej ELISA (dostupná od PBL Biomedical Laboratories), aby sa potvrdilo, že v supernatante sa nachádza rekombinantný ľudský interferón β .

Na ďalšie rozmnožovanie vybraného rekombinantného bakulovírusu sa 6×10^6 SF9 buniek vysialo do T-80 kultivačnej fľaše a infikovalo sa s 200 μ l P-1 zásobného roztoku. Po 5 dňoch sa odobral supernatant (P-2 zásobný roztok) a 2 ml P-2 zásobného roztoku sa použilo na infekciu 100 ml suspenznej kultúry (1×10^6 SF9 buniek/ml) v 500ml Erlenmeyerovej fľaši (Corning). Po 5 dňoch sa odobral supernatant (P-3 zásobný roztok) a plakovým testom sa stanovil vírusový titer.

Aby sa vyprodukoval ľudský interferón β na purifikáciu, odobralo sa 1×10^9 SF9 buniek zo záložnej suspenznej kultúry. V 50ml skúmavke so šroubovacím uzáverom sa SF9 bunky infikovali s rekombinantným bakulovírusom z P-3 zásobného roztoku (MOI = 2) v priebehu 15 minút. Potom sa bunky scentrifugovali a jedenkrát premyli médiom bez séra (Sf-900 II SFM, Gibco BRL) a preniesli sa do 2800ml Triple Baffle Fernbach fľaše (Bellco) obsahujúcej 1 l média bez séra. 3 dni po infekcii sa odobral mediový supernatant a purifikoval sa rekombinantný ľudský interferón β .

Purifikácia interferónových β molekúl

Fermentačné médium sa zakoncentruje a/alebo nastaví sa pH na približne 4,5 po nariedení na vhodnú iónovú silu. Výraz vhodný je mienený ako označenie iónovej sily, ktorá je tak nízka, aby sa interferón β viazal na Mono S katiónovú výmennú kolónu (Pharmacia) ekvilibrovanú v 4mM kyseline octovej, pH 4,5 (tlmivý

roztok A). Po aplikácii sa kolóna premyje tromi kolónovými objemami tlmivého roztoku A a interferón β sa eluuje lineárnym gradientom z tlmivého roztoku A do tlmivého roztoku A obsahujúceho 1M NaCl. Alternatívne je možné uskutočniť purifikáciu podľa opisu pre interferón α (Analytical Biochemistry 247, 434-440 (1997) použitím TSK-gel SP-5PW kolóny (Toso Haas)).

Alternatívne je možné purifikovať interferón β s His príveskom použitím IMAC (afinitná chromatografia s imobilizovaným kovom) v súlade s dobre známymi spôsobmi, ako je opísané napr. v UniZyme Laboratories, Dánsko.

Iný purifikačný spôsob využíva monoklonálne alebo polyklonálne protilátky. Interferónové β fermentačné médium sa nastaví na pH 7 a 0,5M NaCl a aplikuje sa na kolónu s imobilizovanou monoklonálnou protilátkou proti rekombinantnému ľudskému interferónu β . Kolóna sa pred aplikáciou ekvilibruje napr. s 10 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7 (tlmivý roztok B). Po aplikácii sa kolóna premyje tromi kolónovými objemami tlmivého roztoku B a eluuje sa s vhodným tlmivým roztokom pri nízkom pH (napr. pH 2 až 3).

Alternatívne, keď má interferón β prívesok, napr. c-Myc peptid (EQKLI SEEDL), je možné podobným spôsobom použiť monoklonálne protilátky proti c-Myc peptidu. Imobilizácia protilátky na kolónu sa dosiahne napr. použitím CNBr-Sepharose (Pharmacia) v súlade s inštrukciami výrobcu.

Ak je pre ďalšie experimenty nevyhnutné získať relevantnú čistotu, je možné aplikovať kombináciu kationovej výmennej chromatografie, IMAC a/alebo protilátkovej chromatografie.

Čistotu, identitu, kvantitu a aktivitu frakcií eluovaných z vyššie uvedených kolón je možné stanoviť použitím kombinácie spôsobov, ktoré sú známe pre priemerného odborníka v oblasti. Tieto môžu zahŕňať jeden alebo viacero z nasledujúcich testov a spôsobov alebo iné relevantné spôsoby, ktoré sú známe priemernému odborníkovi v oblasti: primárne a sekundárne testy opísané vyššie, ELISA spôsoby, SDS-PAGE, wester blotting, IEF, HPLC, sekvenovanie aminokyselín, hmotnostnú spektroskopiu a analýzu aminokyselín.

Po purifikácii sa modifikovaný interferónový β polypeptid môže konjugovať s polymérom, ako napríklad s M-SPA-5000 od Shearwater Polymers v

súlade s inštrukciami výrobcu. Výhodne sa pred konjugáciou blokuje receptorové rozoznávacie miesto purifikovaného modifikovaného interferónového β polypeptidu, ako je opísané vo vyššie uvedenej časti Materiály a metódy.

Príklad 3

Expresia ľudského interferónu β v HEK293 bunkách

Aby sa expimoval syntetický gén kódujúci interferón β a nachádzajúci sa v pCBProFI (opísaný v príklade 1), v HEK293 bunkách (ATCC kat. č. CRL-1573), amplifikoval sa tento gén prostredníctvom PCR s dvoma primermi:

PBR 7

5' CGCGGATCCATATGACCAACAAGTGCCTG-3' (sekv. č. 28) a

PBR 2

5' CGCGGATCCTTATCAGTTGCGCAG-3' (sekv. č. 29)

a klonoval sa do *Bam*HI miesta pcDNA3.1(-) (Invitrogen, USA) v správnej orientácii, čím vznikol plazmid pPR9.

Na transfekciu sa HEK293 bunková línia vysiala do T-25 kultivačnej fľaše do 50% pokrytia v DMEM médiu (Life Technologies, USA) obsahujúcom 10% FBS a inkubovali sa cez noc. pPR9 sa transfekoval do buniek použitím FuGENE 6 transfekčného reakčného činidla (Roche, USA): K 95 μ l DMEM média bez séra sa pridalo 5 μ l FuGENE 6 a 1,7 μ l (2 μ g) pPR9 a inkubovalo sa pri laboratórnej teplote 20 minút. Potom sa ku bunkám po kvapkách pridal transfekčný komplex a kultivačná fľaša sa vrátila do inkubátora. Na ďalší deň sa bunky trypsinizovali a vysiali sa do T-80 kultivačnej fľaše v DMEM médiu obsahujúcom 10% FBS a 500 μ g geneticínu (Life Technologies) na ml.

Po dosiahnutí súvislej vrstvy buniek sa potvrdilo, použitím ELISA špecifickej pre ľudský interferón β , že primárna transfekčná skupina exprimuje želaný proteín, a bunky sa subklonovali limitovaným riedením. Takýmto spôsobom sa identifikoval HEK293 klon exprimujúci ľudský interferón β vo veľkom množstve.

Príklad 4

Vysoká hladina expresie interferónu β v CHO bunkách

Bunková línia CHO K1 [p22]-E4 (ATCC č. CCL-61) stabilne exprimujúca ľudský interferón β sa pasážovala v pomere 1:10 zo súvislej kultúry a rozmnožovala sa vo forme adherentných buniek v T-25 fľašiach v médiu obsahujúcom sérum (MEM α w/ribonukleotidy a deoxyribonukleotidy (Gibco/BRL kat. č. 32571)), 10% FCS (Gibco/BRL kat. č.10091), penicilín a streptomycín (Gibco/BRL kat. č. 15140-114) až kým sa nedosiahla súvislá vrstva buniek. Médium sa potom vymenilo za médium bez séra (RenCyte CHO; MediCult kat. č. 22600140) na 24 hodín, pred tým, ako sa pridal 5mM butyrát sodný (Merck kat. č. 8.17500) v priebehu výmeny média. Bunky sa nechali potom exprimovať interferón β 48 hodín a potom sa odobralo médium. Hodnota koncentrácie interferónu β v duplikátnych kultúrach sa stanovila na 854797 IU/ml (pričom spodná hranica intervalu 95% vierohodnosti bola 711134 IU/ml a horná 1032012 IU/ml).

V oddelených experimentoch sa bunková línia CHO K1 [p22]-E4 stabilne exprimujúca ľudský interferón β pasážovala v pomere 1:10 zo súvislej kultúry a rozmnožovala sa vo forme adherentných buniek v médiu obsahujúcom sérum (MEM α w/ribonukleotidy a deoxyribonukleotidy (Gibco/BRL kat. č. 32571)), 10% FCS (Gibco/BRL kat. č.10091), penicilín a streptomycín (Gibco/BRL kat. č. 15140-114), až kým sa nedosiahla súvislá vrstva buniek v 10 vrstvovej bunkovej fabrike (NUNC č. 165250). Médium sa potom vymenilo za médium bez séra DMEM/F12 (Gibco/BRL kat. č. 11039-021) s pridaním ITS-A v pomere 1:100 (Gibco/BRL kat. č. 51300-044) a EX-CYTE VLE v pomere 1:500 (Serological Proteins Inc. č. 81-129-1) a penicilínu a streptomycínu v pomere 1:100 (Gibco/BRL kat. č. 15140-114) na 48 hodín, pred tým, ako sa vymenilo médium s ďalším prídavkom 5mM butyrátu (Merck kat. č. 8.17500). Bunky sa nechali potom exprimovať interferón β 48 hodín a potom sa odobralo médium. Hodnota koncentrácie interferónu β v duplikátnych kultúrach sa stanovila na 824791 IU/ml (pričom spodná hranica intervalu 95% vierohodnosti bola 610956 IU/ml a horná 1099722 IU/ml).

Považuje sa za samozrejmé, že interferónové β polypeptidy podľa vynálezu môžu byť produkované s rovnako vysokými výťažkami rovnakým spôsobom ako je ktorýkoľvek z vyššie opísaných.

Príklad 5

Konštrukcia a expresia interferónového β variantu s jedným začleneným glykozylačným miestom

Aby sa začlenilo extra N-pripojené glykozylačné miesto do polohy 111 v hINF- β , zmenil sa syntetický gén (*hinf- β*) kódujúci hINF- β (opísaný v príklad 1) prostredníctvom miestne špecifickej PCR mutagenézy. Použitím BIO-X-ACT (Bioline, UK) a plazmidu PF050 [*hinf- β*]/pcDNA3.1(-)Hygro/Intron (derivát pcDNA3.1(-) Hygro (Invitrogen, USA), v ktorom bol chimérny intrón získaný z pCIneo (Promega, USA) vložený medzi *Bam*HI a *Nhe*I miesto v MCS vektora] ako templátu, sa uskutočnili dve PCR reakcie s dvoma prekrývajúcimi sa primerovými sadami:

CB41

5' TTTAAACTGGATCCAGCCACCATGACCAACAAG-3' (sekv. č. 30)

ICB55

5'CGGCCATAGTAGCGCTTCAGGTGCAGGGAGCTCATCAGCTTGCCGGTGGTG
TTGTCCTCCTTC-3) (sekv. č. 31) a

CB42 (sekv. č. 26)/*CB86*

5'GAAGGAGGACAACACCACCGGCAAGCTGATGAGCTCCCTGCACCTGAAGCG
CTACTATGGCC G-3' (sekv. č. 32),

čím vznikli dva fragmenty s dĺžkou 446, respektíve 184 bázových párov. Tieto dva fragmenty sa zostavili v tretej PCR s prekrývajúcimi sa primermi *CB41* a *CB42*. Výsledný gén sa zaviedol do cicavčieho expresného vektora pcDNA3.1(-) Hygro/Intron a DNA sekvenovaním sa overilo, že má správne zmeny báz vedúce k substitúciám F111N a R113T v hINF- β (plazmid označený ako PF085).

Na testovanie aktivity [F111N+R113T] hINF- β variantu sa plazmidom PF085 transfekovala CHO K1 bunková línia (ATCC č. CCL-61) použitím Lipofectamine

2000 (Life Technologies, USA) ako transfekčného činidla. O 24 hodín sa odobralo kultivačné médium a testovala sa aktivita/koncentrácia INF- β :

Aktivita: 56046 IU/ml [primárny test]

ELISA: 80 ng/ml

Špecifická aktivita: 7×10^8 IU/mg

Ako je vidieť [F111N+R113T]hINF- β variant má veľmi vysokú špecifickú aktivitu, ktorá je približne dvojnásobkom špecifickej aktivity wt hINF- β .

Príklad 6

Konštrukcia a expresia interferónu β s iným začleneným glykozylačným miestom [Q49N+Q51T]

Analogicky, ako bolo opísané v príklade 5, sa zaviedlo extra N-pripojené glykozylačné miesto do polohy 49 prostredníctvom substitúcií Q49N a Q51T. Použitím PF043 (*hinf- β* /pcDNA3.1 (Invitrogen, USA)) ako templátu sa uskutočňovali dve PCR reakcie s dvoma prekrývajúcimi sa primerovými sadami:

PBR7 (sekv. č. 28)/*PBR78*

5' GGCGTCCTCCTTGGTGAAGTTCTGCAGCTG-3' (sekv. č. 33) a

PBR8

5' ATATATCCCAAGCTTTTATCAGTTGCGCAGGTAGCCGGT-3' (sekv. č. 34)/

PBR77

5'-CAGCTGCAGAACTTCACCAAGGAGGACGCC-3' (sekv. č. 35),

čím vznikli dva fragmenty s dĺžkou 228, respektíve 369 bázových párov. Tieto dva fragmenty sa zostavili v tretej PCR s ohraničujúcimi primermi *PBR7* a *PBR8*. Výsledný gén sa zaviedol do cicavčieho expresného vektora pcDNA3.1(-) Hygro/Intron a DNA sekvenovaním sa overilo, že má správne zmeny báz vedúce k [Q49N, Q51 T] hINF- β (plazmid označený PF104).

Na testovanie aktivity [Q49N+Q51T]hINF- β variantu sa plazmidom PF104 transfekovala CHO K1 bunková línia použitím Lipofectamine 2000 (Life Technologies, USA) ako transfekčného činidla. O 24 hodín sa odobralo kultivačné médium a testovala sa aktivita/koncentrácia INF- β :

Aktivita: 17639 IU/ml [primárny test]
ELISA: 10 ng/ml
Špecifická aktivita: $1,7 \times 10^9$ IU/mg

Ako tu bolo pozorované, [Q49N+Q51T]hINF- β variant má vysokú špecifickú aktivitu. To môže byť spôsobené slabým rozoznávaním jednou z monoklonálnych protilátok použitých v ELISA.

Príklad 7

Konštrukcia a expresia interferónu β s dvoma začlenenými glykozylačnými miestami

Ďalšie glykozylačné miesta opísané v príkladoch 5 a 6 sa začlenili do ľudského interferónu β prostredníctvom substitúcií Q49N, Q51T, F111N a R113T.

Použitím PF085 (opísaný v príklade 5) ako templátu sa uskutočnili dve PCR reakcie s dvoma prekrývajúcimi sa primerovými sadami:

PBR89

5'CGCGGATCCAGCCACCATGACCAACAAGTGCCTG (sekv. č. 36)/

PBR78 (sekv. č. 33) a

PBR8 (sekv. č. 34)/*PBR77* (sekv. č. 35),

čím vznikli dva fragmenty s dĺžkou 228, respektíve 369 bázových párov.

Tieto dva fragmenty sa zostavili v tretej PCR s ohraničujúcimi primermi *PBR89* a *PBR8*. Výsledný gén sa zaviedol do cicavčieho expresného vektora pcDNA3.1(-)Hygro/Intron a sekvenovaním sa potvrdilo, že má správne bázové zmeny vedúce k [Q49N, Q51T, F111N, R113T]hINF- β (plazmid označený ako PF123).

PF123 sa transfekoval do CHO K1 buniek použitím Fugene 6 (Roche) ako transfekčného činidla. O 24 hodín neskôr sa odobralo kultivačné médium a testovalo sa z hľadiska aktivity/koncentrácie INF- β :

Aktivita: 29401 IU/ml [primárny test]
ELISA: 14 ng/ml
Špecifická aktivita: $2,1 \times 10^9$ IU/ml

Ako sa tu pozorovalo, aj [Q49N+Q51T+ F111N+ R113T]hINF- β variant má vysokú špecifickú aktivitu.

V teste na receptorové viazanie opísanom v časti Materiály a metódy, ktorý je založený na použití zosieťovacieho činidla DSS, sa zistilo, že variant má receptor viažucu aktivitu.

Príklad 8

Produkcia [Q49N+Q51T+F111N+ R113T]interferónového β glykozylačného variantu vo valcovitých fľašiach

CHOK1 subklon (5/G-10) produkujúci [Q49N+Q51T+F111N+R113T] glykozylačný variant sa vysial do 2 valcovitých fliaš, pričom každá mala expandovaný povrch 1700 cm² (Corning, USA), v 200 ml DMEM/F-12 média (Life Technologies; kat. č. 31330), do ktorého bolo pridané 10% FBS a penicilín/streptomycín (P/S). Po 2 dňoch sa médium vymenilo. Po ďalších 2 dňoch bola v dvoch valcovitých fľašiach skoro 100% súvislá vrstva a médium sa zamenilo za 300 ml UltraCHO média bez séra (BioWhittaker; kat. č. 12-724) s prídavkom 1/500 EX-CYTE (Serologicals Proteins; kat. č. 81129N) a P/S. Bunky rastúce v tomto médiu produkujú vyššiu bunkovú masu ako je možné dosiahnuť v médiu obsahujúcom sérum. Po 2 dňoch sa médium obnovilo. Po ďalších 2 dňoch sa médium zamenilo za produkčné médium: DMEM/F-12 médium (Life Technologies; kat. č. 21041) doplnené s 1/100 ITSA (Life Technologies; kat. č. 51300-044) [ITSA označuje inzulínový (1,0 g/l)-transferínový (0,55 g/l)-selénový (0,67 mg/l) doplnok pre adherentné kultúry], 1/500 EC-CYTE a P/S. Na obrázku 2 je znázornený priebeh produkcie, pričom každý deň sa z každej valcovitej fľaše odobralo 300 ml média. Odobraté médiá z dvoch valcovitých fliaš sa spojili pred tým, ako sa odobrala vzorka média na stanovovanie interferónovej β aktivity.

Ako je vidieť na obrázku 2, priebeh produkcie sa ukončil po 26 dňoch. Po log-perióde trvajúcej 5 dní sa aktivita sprostredkovaná [49N+Q51T+F111N+ R113T]interferónovým- β variantom dramaticky zvýšila a po zvyšok priebehu produkcie bola aktivita odobratého interferónu β denne priemerne 2,4 milióna IU/ml

x 600 ml = 1,440 miliarda IU. Celkovo sa vyprodukovalo $3,2 \times 10^{10}$ IU, čo zodpovedá 160 mg proteínu (s hypotetickou špecifickou aktivitou 2×10^8 IU/mg).

Príklad 9

Produkcia, purifikácia a PEGylácia interferónového β variantu K19R+K45R+K123R

Aby nakoniec vzniklo 100 ml média bez séra obsahujúceho interferónový β variant K19R+K45R+K123R, vysiali sa do 3 T-175 fliaš COS-7 bunky v DMEM médiu (Life Technologies; kat. č. 21969-035), do ktorého bolo doplnené 10% FBS a glutamín a penicilín/streptomycín. V deň transfekcie (takmer 100% súvislá vrstva) sa 4 až 5 hodín pred transfekciou médium vymenilo za 30 ml čerstvého média. Na prípravu transfekcie sa 1890 μ l DMEM média bez prídavkov dalo do 14ml polypropylénovej skúmavky (Corning). Priamo do média sa pridalo 210 μ l Fugene 6 (Roche) a inkubovalo sa 5 minút pri laboratórnej teplote. Medzi tým sa 168 μ g alikvota plazmidovej DNA ([K19R, K45R, K123R]INF- β /pcDNA3.1 (-)Hygro; PF č. 161) dala do inej 14ml polypropylénovej skúmavky. Po 5 minútach inkubovania sa Fugene 6 zmes pridala priamo k DNA roztoku a inkubovala sa ďalších 15 minút pri laboratórnej teplote. Po inkubovaní sa po kvapkách pridalo približne 700 μ l do každého z troch z troch bunkových médií.

Na ďalší deň sa transfekčné médium nahradilo 35 ml produkčného média bez séra. Médium bez séra je založené na DMEM médiu (Life Technologies; kat. č. 31053-028), ktoré je doplnené glutamínom, pyruvátom sodným penicilínom/streptomycínom, 1% ITSA (Life Technologies; kat. č. 51300-044) a 0.2% Ex-Cyte (Serologicals Proteins; kat. č. 81-129). Pred tým ako sa pridalo produkčné médium, premyli sa bunkové vrstvy dvakrát v DMEM médiu bez aditív.

Tri dni po transfekcii sa odobralo 100 ml média bez séra na purifikáciu a PEGyláciu interferónového- β variantu.

pH sa nastavilo na 6,8 a vodivosť sa nastavila na < 10 mS/cm s MilliQ vodou. Potom sa médium po dávkach naadsorbovalo na 1ml SP550 kationovú výmennú živicu (TosoHaas) vopred ekvilibrovanú s tlmivým roztokom A (20mM fosfát, 100mM NaCl, pH 7). Po 2 hodinách rotácie sa živica nechala sedimentovať a preniesla sa

na kolónu. Živica sa premyla s 5 kolónovými objemami tlmivého roztoku A a eluovala sa s 2 ml tlmivého roztoku B (20mM fosfát, 800mM NaCl, pH 7). Eluát sa zakoncentroval na 500 μ l na VivaSpin (hranica 10 kDa) po pridaní 5% etylénglykolu. Koncentrát sa nastavil na 50 mM fosfát, 0,3M NaCl, 20% etylénglykol, pH 8 v konečnom objeme 2 ml a ďalej sa zakoncentroval na 0,5 ml.

Finálny koncentrát sa PEGyloval nasledovne: k 100 μ l finálneho koncentráту sa pridalo 25 μ l aktivovaného mPEG-SPA (5000 kDa, Shearwater, Alabama), ktorý bol čerstvo pripravený vo fosfátovom tlmivom roztoku, pH 8, aby vznikli konečné koncentrácie aktivovaného PEG 0, 5, 10, 25 alebo 50 mg/ml. Reakcia sa nechala prebiehať 30 minút pri laboratórnej teplote a potom sa zastavila pridaním 50mM glycinového tlmivého roztoku. Vzorky sa okamžite zmrazili pri -80 °C a zmerala sa biologická aktivita, ako bolo opísané (primárny test). Uskutočnili sa western bloty každej vzorky, aby sa zhodnotilo množstvo nezreagovaného interferónového β variantu nachádzajúceho sa v PEGylovanej vzorke.

Výsledky demonštrujú, že pri použití 25 mg aktivovaného PEG/ml nebol prítomný nePEGylovaný interferónový β variant, ako sa zistilo western blotom, a variant si zachovával 50 % svojej biologickej aktivity v porovnaní s kontrolnou vzorkou (ošetrovaná rovnako, ale s 0 mg/ml aktivovaného PEG).

Príklad 10

Expresia a purifikácia rozpustného IFNAR2

cDNA kódujúce extracelulárnu doménu IFNAR-1 a IFNAR-2 (označované ako IFNAR1ec, respektíve IFNAR2ec) sa amplifikovali z HeLa bunkovej cDNA použitím PCR s primermi zodpovedajúcimi prvým 10 aminokyselinovým zvyškom a posledným 10 aminokyselinovým zvyškom extracelulárnej domény IFNAR-2 (ktorej nukleotidová sekvencia je zrejmá z Novick a ďalší, Cell, zv. 77, str. 391-400,1994) a primermi zodpovedajúcimi prvým 10 aminokyselinovým zvyškom a posledným 10 aminokyselinovým zvyškom extracelulárnej domény IFNAR-1 (ktorej nukleotidová sekvencia je zrejmá z Uze a ďalší, Cell zv. 60, 225-234,1990). cDNA'y sa subklonovali do pBlueBac 4.5/V5-His-TOPO vektora (Invitrogen) a homologickou

rekombináciou, plakovou purifikáciou a rozmnožovaním na Sf9 bunkách sa získal rekombinantný bakulovírus. Sf9 bunky sa infikovali s rekombinantným bakulovírusom a expresia z výsledných buniek sa získala v podstate ako je opísané v príklade 2.

IFNAR1ec a IFNAR2ec proteíny sa pozorovali v kultivačných supernatantoch dva až tri dni po infekcii Sf9 buniek s rekombinantným bakulovírusom. Aktivita rozpustných receptorov sa pozorovala v interferónovom antagonistovom teste. V stručnosti: HeLa bunky obsahujúce ISRE element (ako je opísaný v primárnom teste vyššie) sa stimulujú so submaximálnou dávkou ľudského divého typu interferónu β v prítomnosti rôznych koncentrácií IFNARec supernatantu. Antagonistický účinok supernatantu je priamo úmerný množstvu prítomného rozpustného receptora.

IFNAR2ec sa purifikovala z prefiltrovaných kultivačných supernatantov použitím iónovej výmennej a afinitnej chromatografie. V kultivačných supernatantoch, ktoré boli pozitívne na IFNAR2ex, sa nastavilo pH na 7,5 a naniesli sa na aniónovú výmennú kolónu a naviazaný rekombinantný proteín sa eluoval použitím 500mM NaCl. Čiastočne čistá IFNAR2ec sa potom nariedila a pH sa nastavilo na 8,0 pred ďalšou purifikáciou použitím viazania na TALON™ kovovú afinitnú živicu a eluovaním s imidazolom. Finálny prípravok sa v alikvotách zmrazil. IFNAR1ec je možné purifikovať ako IFNAR2ec s tým rozdielom, že ako iónový výmenný krok sa použije kationová výmenná chromatografia pri pH 6,0.

Príklad 11

Použitie rozpustného IFNAR2 na purifikáciu a PEGyláciu interferónu β a jeho variantov

Purifikovaný IFNAR2, získaný ako je opísané v príklade 9, sa imobilizuje buď prostredníctvom aminoskupiny, alebo prostredníctvom karboxylovej skupiny, použitím CNBr-aktivovanej Sepharose 4B alebo EAH Sepharose 4B v súlade s inštrukciami výrobcu (Amersham Pharmacia Biotech, Affinity Chromatography, Principles and Methods, 18-1022-29, vydanie AB). Je veľmi dôležité, aby spôsob pripájania umožňoval imobilizáciu funkčného IFNAR2 a to sa testuje

prostredníctvom optimalizácie podmienok pripájania (pH, pripájací tlmivý roztok, pomer IFNAR2 ku aktivovanej matrici, atď.) Iným kritickým parametrom je blokovanie nadbytku aktívnych skupín. Následne sa uskutočňuje testovanie väzobnej kapacity pridaním interferónu β a meraním prudkého vzostupu.

Optimálne imobilizovaný IFNAR2 sa používa na purifikáciu interferónu β nasledovne: 5ml kolóna s 1 mg IFNAR2 imobilizovaným na ml gélu sa ekvilibruje s tlmivým roztokom A (20 mM fosfát, 300mM NaCl, pH 7). Potom sa na kolónu naniesie 2mg vzorka interferónu β v tlmivom roztoku A a následne sa premyje 5 kolónovými objemami tlmivého roztoku A. Eluovanie sa dosiahne pumpovaním 2 kolónových objemov tlmivého roztoku B do kolóny. Odoberajú sa 1ml frakcie a testujú sa z hľadiska biologickej aktivity. Optimálne elučné podmienky závisia na spôsobe imobilizácie, ale príklady elučných podmienok zahŕňajú pH 1,5 až 3 (napr. 0,1M glycín pH 2,3 v 0,5M NaCl), pH 11,5 až 12, 3,5M MgCl₂, 6M močovinu alebo podobne.

Príklad 12

Použitie imobilizovaného IFNAR2 na PEGyláciu interferónu β (variantov)

Okrem použitia opísaného v príklade 10 môže byť imobilizovaný IFNAR2 použitý na optimálnu PEGyláciu, kedy je vylúčená PEGylácia časti interferónu β alebo jeho variantov, ktorá interaguje s receptorom.

5ml kolóna s 1 mg IFNAR2 imobilizovaným na ml gélu sa ekvilibruje s tlmivým roztokom A (20 mM fosfát, 300mM NaCl, pH 7). Potom sa na kolónu naniesie 2mg vzorka interferónu β v tlmivom roztoku A a následne sa premyje 5 kolónovými objemami tlmivého roztoku A. Na kolónu sa napumpuje roztok aktivovaného mPEG-SPA (1 až 50 mg/ml v tlmivom roztoku A) a nechá sa reagovať 15 minút až 2 hodiny v závislosti na teplote. Jednou výhodnou kombináciou rozsahov rezidenčného času a teploty je 15 až 60 minút, 10 až 20 °C; inou je 30 minút až 5 hodín, 2 až 8 °C. Po uvedenom čase sa eluovanie dosiahne pumpovaním 2 kolónových objemov tlmivého roztoku B do kolóny. Odoberajú sa 1ml frakcie a testujú sa z hľadiska biologickej aktivity použitím primárneho

skriningového testu. Optimálne elučné podmienky závisia na spôsobe imobilizácie, ale príklady elučných podmienok zahŕňajú pH 1,5 až 3 (napr. 0,1M glycín pH 2,3 v 0,5M NaCl), pH 11,5 až 12, 3,5M MgCl₂, 6M močovinu alebo podobne.

Príklad 13

Protivírusová aktivita PEGylovaného variantu

Pegylovaný IFN- β variantový proteín, K19R+K45R+K123R, sa testoval použitím protivírusového biologického testu. Proteín divého typu a variantný proteín sa pridali ku A549 bunkám v koncentráciách od 10 do 0,001 IU/ml v trojitých kultúrach.

Pegylovaný IFN- β variant vykazoval úplnú inhibíciu EMC vírusom indukovanej bunkovej smrti v koncentrácii 3 IU/ml, s EC₅₀ 0,13 IU/ml (obrázok 1). Štandard divého typu vykazuje inhibíciu vírusu s EC₅₀ 1,4 IU/ml.

Tieto výsledky demonštrujú, že výsledkom pegylácie modifikovaného interferónového polypeptidu je konjugát s úplnou protivírusovou aktivitou.

Príklad 14

Protilátková neutralizácia glykozylovaného variantu

Protilátková neutralizácia divého typu a glykozylovaného IFN- β variantového proteínu, Q49N+Q51T+F111N+R113T, sa testovala použitím ISRE neutralizačného testu. Interferónový β proteín divého typu a variantový interferónový β proteín (v päťnásobných riedeniach vychádzajúc z 12500 IU/ml) sa inkubovali s polyklonálnou králičou anti-interferónovou β protilátkou (PBL Biomedical Laboratories) v koncentráciách 0,40 a 200 ng/ml.

V prítomnosti 200 ng/ml polyklonálneho králičieho antiséra sa aktivita divého typu interferónového β proteínu znížila 11,8 krát, zatiaľ čo aktivita glykozylovaného interferónového β variantu sa znížila len 3,0 krát. Takže stupeň rozoznávania interferónového β variantu protilátkou bol znížený o 75 % úrovne wt, pozri tabuľku 1 nižšie. Tieto výsledky demonštrujú, že rozoznávanie glykozylovaného mutantného

interferónu β polyklonálnymi protilátkami vyvíjanými zvieratami, ktoré boli imunizované divým typom ľudského interferónu β , je značne redukované. Takže prostredníctvom modifikácií urobených vo variantovej molekule bol odstránený/zatienený veľký počet imunogénnych epitopov v divom type ľudského interferónu β .

Tabuľka 1

Konc. protilátky (ng/ml)	Proteín	EC50	Násobok inhibície	Redukcia protilátkovej neutralizácie
0	wt	0,00039	-	-
	variant	0,00020	-	-
40	wt	0,00190	4,8	-
	variant	0,00020	1,0	79 %
200	wt	0,00461	11,8	-
	variant	0,0059	3,0	75 %

Príklad 15

Konštrukcia a expresia interferónových β molekúl s modifikovaným N-koncom

N-koncovo modifikované varianty interferónu β sa konštruovali ako je opísané v predchádzajúcich príkladoch.

Na konštrukciu expresného plazmidu pre interferónový β variant INFB S(-1)A+M1Q sa použili nasledujúce primery:

CBProFpr110:

AAC TGG ATC CAG CCA CCA TGA CCA ACA AGT GCC TGC TCC AGA TCG
CCC TGC TCC TGT GCT TCA GCA CCA CGG CCC TAG CCC AGA GCT AC
(sekv. č. 37) a *CBProFpr42* (sekv. č. 26).

Na konštrukciu expresného plazmidu pre interferónový variant $INF\beta$ S(-1)AQ (označenie substitúcie S zvyšku umiestneného v polohe (-1) s A a Q zvyškom) sa použili nasledujúce primery:

CBProFpr109:

AAC TGG ATC CAG CCA CCA TGA CCA ACA AGT GCC TGC TCC AGA TCG
CCC TGC TCC TGT GCT TCA GCA CCA CGG CCC TAG CCC AGA TGA GCT
AC (sekv. č. 38) a *CBProFpr42* (sekv. č. 26).

Na testovanie aktivity týchto variantov sa zodpovedajúce plazmidy pF154 a pF163 transfekovali do CHO K1 buniek použitím Lipofectamine 2000 (Life Technologies, USA) ako transfekčného reakčného činidla. Supernatanty sa odobrali 24 hodín po transfekcii a testovali sa v primárnom teste aktivity a v ELISA teste ako je opísané v časti Materiály a metódy. Získali sa nasledujúce výsledky:

INF\beta S-1A + M1Q (pF154):

Aktivita: 106410 IU/ml
ELISA: 333 ng/ml
Špecifická aktivita: $3,2 \times 10^8$ IU/mg

INF\beta S-1AQ (pF163):

Aktivita: 90634 IU/ml
ELISA: 193 ng/ml
Špecifická aktivita: $4,7 \times 10^8$ IU/mg

Tieto molekuly sú rovnako aktívne ako divý typ ľudského interferónu β .

Príklad 16

Príprava pegylovaných $IFN-\beta$ variantov

50 mikrolitrov 0,3 mg/ml roztoku rekombinantného ľudského $IFN-\beta$ polypeptidu obsahujúceho mutácie Q49N+Q51T+K19R+K45R+K123R v 50mM Na-acetáte, 35% etylénglykole, pH 5,5 sa zmiešalo s 10 μ l 0,5M Na-fosfátu, pH 8,0 a 20 μ l 50mM Na-fosfátu, 0,1M NaCl, 30% etylénglykolu, pH 8,0 obsahujúcimi 0,02 mg/ml SPA-mPEG (*N*-sukcinimidylpropionát-metoxypolyetylénglykol). To zodpovedá 10 molárnemu nadbytku SPA-mPEG voči $IFN-\beta$.

Po pol hodine pri laboratórnej teplote a s miernym premiešavaním sa reakcia zastavila pridaním 5 μ l 20mM glycínu, pH 8,0. V tomto štádiu reakčná zmes obsahovala zmes nemodifikovanej, ako aj pegylovanej formy rekombinantného ľudského IFN- β .

In vitro testovanie použitím primárneho skriningového testu demonštrovalo, že pegylovaný materiál si zachoval 40% aktivitu v porovnaní s nemodifikovaným rekombinantným ľudským IFN- β .

V inom experimente sa 50 μ l 0,14 mg/ml roztoku rekombinantného ľudského IFN- β polypeptidu obsahujúceho mutácie Q49N+Q51T v 50mM Na-acetáte, 35% etylénglykole, pH 5,5 zmiešalo s 10 μ l 0,5M Na-fosfátu, pH 8,0 a 20 μ l 50mM Na-fosfátu, 0,1M NaCl, 30% etylénglykolu, pH 8,0 obsahujúcimi 0,03 mg/ml SPA-mPEG. To zodpovedá 10 molárnemu nadbytku SPA-mPEG voči IFN- β .

Po pol hodine pri laboratórnej teplote a s miernym premiešavaním sa reakcia zastavila pridaním 5 μ l 20mM glycínu, pH 8,0. V tomto štádiu reakčná zmes obsahovala zmes nemodifikovanej, ako aj pegylovanej formy rekombinantného ľudského IFN- β .

In vitro testovanie použitím primárneho skriningového testu demonštrovalo, že pegylovaný materiál si zachoval 20% aktivitu v porovnaní s nemodifikovaným rekombinantným ľudským IFN- β .

Zoznam sekvencií

<110> Maxygen ApS

<120> Nové molekuly podobné interferónu β

<130> 2wo2

<140>

<141>

<160> 38

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 840

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
acattctaac tgcaaccttt cgaagccttt gctctggcac aacaggtagt aggcgacact 60
gttcgtggtg tcaacatgac caacaagtgt ctccctccaaa ttgctctcct gttgtgcttc 120
tccactacag ctctttccat gagctacaac ttgcttggat tcctacaaag aagcagcaat 180
tttcagtgtc agaagctcct gtggcaattg aatgggaggc ttgaatactg cctcaaggac 240
aggatgaact ttgacatccc tgaggagatt aagcagctgc agcagttcca gaaggaggac 300
gccgattga ccatctatga gatgctccag aacatctttg ctattttcag acaagattca 360
tctagcactg gctggaatga gactattggt gagaacctcc tggctaattg ctatcatcag 420
ataaaccatc tgaagacagt cctggaagaa aaactggaga aagaagattt caccagggga 480
aaactcatga gcagtctgca cctgaaaaga tattatggga ggattctgca ttacctgaag 540
gccaaggagt acagtcactg tgcctggacc atagtcagag tggaaatcct aaggaacttt 600
tacttcatta acagacttac aggttacctc cgaaactgaa gatctcctag cctgtgcttc 660
tgggactgga caattgcttc aagcattcct caaccagcag atgctgttta agtgactgat 720
ggctaattgta ctgcatatga aaggacacta gaagattttg aaatttttat taaattatga 780
gttattttta tttatttaaa ttttattttg gaaaataaat tatttttggt gcaaaagtca 840
```

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

<210> 3

<211> 70

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 3

ggctagcgtt taaacttaag cttegccacc atgaccaaca agtgcctgct ccagatcgcc 60
ctgctcctgt 70

<210> 4

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 4

acaacctgct eggcttctg cagaggagt cgaacttcca gtgccagaag ctctgtggc 60
agctgaacgg 70

<210> 5

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 5

gaacttcgac atccccgagg aatcaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc 60
tctgaccatc 70

<210> 6

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 6

```
ttccgccagg actccagctc caccggttgg aacgagacca tcgtggagaa cctgctggcc 60
aacgtgtacc                                         70
```

<210> 7

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 7

```
aggagaagct ggagaaggag gacttcaccc gcggcaagct gatgagctcc ctgcacctga 60
agcgctacta                                         70
```

<210> 8

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 8

```
ggagtacagc cactgcgcct ggaccatcgt acgcgtggag atcctgcgca acttctactt 60
catcaaccgc                                         70
```

<210> 9

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 9

```
caccacactg gactagtgga tccttatcag ttgcgcaggt agccggtcag gcggttgatg 60
aagtagaagt 70
```

<210> 10

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 10

```
aggcgcagtg gctgtactcc ttggccttca ggtagtgcag gatgcggcca tagtagcgct 60
tcaggtgcag 70
```

<210> 11

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 11

ctccttctcc agcttctcct ccagcacggt cttcaggtgg ttgatctggt ggtacacggt 60
ggccagcagg 70

<210> 12

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 12

gagctggagt cctggcggaa gatggcgaag atgttctgca gcatctcgta gatggtcaga 60
gcggcgctct 70

<210> 13

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 13

cctcggggat gtcgaagttc atcctgtcct tcaggcagta ctccagggcg cgttcagct 60
gccacaggag 70

<210> 14

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 14

caggaagccg agcaggttgt agctcatcga tagggccgtg gtgctgaagc acaggagcag 60
ggcgatctgg 70

<210> 15

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 15

ctgctccaga tgcacctgct cctgtgcttc agcaccacgg ccctatcgat gaagcaccag 60
caccagcatc 70

<210> 16

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 16

cactgcttac tggcttatcg aaattaatac gactcactat agggagaccc aagctggcta 60
gcgtttaaac 70

<210> 17

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 17

```
caggaagccg agcagggttg agctcatctg ttggtgttga tgggtggtgct gatgctggtg 60
ctggtgettc 70
```

<210> 18

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 18

```
agcagggcga tctggagcag gcacttggtg gtcattggtg cgaagcttaa gtttaaacgc 60
tagccagctt 70
```

<210> 19

<211> 40

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 19

```
ccgtcagatc ctaggctagc ttattgcggt agtttatcac 40
```

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 20

gagctcggta ccaagctttt aagagctgta at

32

<210> 21

<211> 77

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 21

gctgaacggg cgctggagt actgcctgaa ggacaggatg aacttcgaca tccccgagga 60
aatccgccag ctgcagc 77

<210> 22

<211> 35

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 22

tctccacgcg tacgatggtc caggegcagt ggctg

35

<210> 23

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 23

caccacactg gactagtgga tccttatcag ttgcgcaggt agccggtcag gcggttgatg 60

aagtagaagt 70

<210> 24

<211> 31

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 24

catcagcttg ccggtggtgt tgcctcctt c

31

<210> 25

<211> 31

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 25

gaaggaggac aacaccaccg gcaagctgat g

31

<210> 26

<211> 40

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 26

cacactggac tagtaagctt ttatcagttg cgcaggtagc

40

<210> 27

<211> 47

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 27

gaggagttcg aacttccagt gccagcgctt cctgtggcag ctgaacg

47

<210> 28

<211> 29

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 28

cgcggatcca tatgaccaac aagtgcctg

29

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 29

cgcggatect tatcagttgc gcag

24

<210> 30

<211> 33

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 30

tttaaactgg atccagccac catgaccaac aag

33

<210> 31

<211> 63

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 31

cggccatagt agcgcttcag gtgcagggag ctcatcagct tgccggtggt gttgtcctcc 60
ttc 63

<210> 32

<211> 63

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 32

gaaggaggac aacaccaccg gcaagctgat gagctccctg cacctgaagc gctactatgg 60
ccg 63

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 33

ggcgtcctcc ttggtgaagt tctgcagctg 30

<210> 34

<211> 39

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 34

atatatccca agcttttatc agttgcgag gtagccggt

39

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Umejá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 35

cagctgcaga acttcaccaa ggaggacgcc

30

<210> 36

<211> 70

<212> DNA

<213> Umejá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 36

cgcggatcca gccaccatga ccaacaagtg cctg

34

<210> 37

<211> 89

<212> DNA

<213> Umejá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 37

aactggatcc agccaccatg accaacaagt gcctgctcca gatcgccctg ctctgtgct 60
tcagcaccac ggcctagcc cagagctac 89

<210> 38

<211> 70

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 38

aactggatcc agccaccatg accaacaagt gcctgctcca gatcgccctg ctctgtgct 60
tcagcaccac ggcctagcc cagatgagct ac 92

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β a obsahujúci aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť kovalentne pripojenú na interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným a aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre uvedenú prvú nepolypeptidovú časť.

2. Konjugát podľa nároku 1, v ktorom je prvá nepolypeptidová časť vybraná zo skupiny obsahujúcej polymérnu molekulu, lipofilnú zlúčeninu, sacharidovú časť a organické derivatizačné činidlo.

3. Konjugát podľa nároku 1 alebo 2, v ktorom je prvou nepolypeptidovou časťou polymér, výhodne lineárny alebo rozvetvený polyetylén glykol.

4. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, v ktorom je prvá nepolypeptidová časť vybraná zo skupiny obsahujúcej polymérnu molekulu majúcu lyzínový zvyšok, zvyšok kyseliny asparágovej, kyseliny glutámovej alebo cysteínový zvyšok ako pripájaciu skupinu.

5. Konjugát podľa nároku 4, v ktorom je prvou nepolypeptidovou časťou polymérna molekula majúca lyzín ako pripájaciu skupinu.

6. Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β a obsahujúci aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť konjugovanú s aspoň jedným lyzínovým zvyškom interferónového β polypeptidu, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným lyzínovým zvyškom.

7. Konjugát podľa nároku 6, v ktorom je odstránený aminokyselinový zvyšok (zvyšky) vybraný zo skupiny obsahujúcej K19, K33, K45, K52 a K123, výhodne K19, K33, K45 a K123 a najvýhodnejšie K19, K45 a K123.

8. Konjugát podľa nároku 7, v ktorom bol lyzínový zvyšok (zvyšky) substituovaný arginínovým alebo glutamínovým zvyškom.

9. Konjugát podľa ktoréhokolvek z nárokov 5 až 8, v ktorom interferónový β polypeptid obsahuje jednu z nasledujúcich sád mutácií:

K19R+K45R+K123R;

K19Q+K45R+K123R;

K19R+K45Q+K123R;

K19R+K45R+K123Q;

K19Q+K45Q+K123R;

K19R+K45Q+K123Q;

K19Q+K45R+K123Q;

K19Q+K45Q+K123Q;

K45R+K123R;

K45Q+K123R;

K45Q+K123Q;

K45R+K123Q;

K19R+K123R;

K19Q+K123R;

K19R+K123Q;

K19Q+K123Q;

K19R+K45R;

K19Q+K45R;

K19R+K45Q;

K19Q+K45Q;

K52R+K134R;

K99R+K136R;

K33R+K105R+K136R;

K52R+K108R+K134R;

K99R+K115R+K136R;

K19R+K33R+K45R+K123R;

K19R+K45R+K52R+K123R;

K19R+K33R+K45R+K52R+K123R alebo

K19R+K45R+K52R+K99R+K123R.

10. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 5 až 9, v ktorom je lyzínový zvyšok začlenený v polohe, v ktorej sa v rodičovskom interferóne β nachádza na povrchu vystavený aminokyselinový zvyšok.

11. Konjugát podľa nároku 10, v ktorom interferónový β polypeptid obsahuje aspoň jednu substitúciu vybranú zo skupiny pozostávajúcej z N4K, R11K, G26K, R27K, Q48K, Q49K, R71K, D73K, S75K, E85K, A89K, Y92K, H93K, F111K, R113K, L116K, R124K, G127K a Y155K.

12. Konjugát podľa nároku 11, v ktorom je substitúcia vybraná zo skupiny obsahujúcej Q49K a F111K.

13. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 5 až 12 obsahujúci aspoň dva začlenené lyzínové zvyšky.

14. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 10 až 13, v ktorom interferónový β polypeptid zahŕňa aj aspoň jeden odstránený lyzínový zvyšok, výhodne lyzínový zvyšok určený v ktoromkoľvek z nárokov 7 až 9.

15. Konjugát podľa nároku 14, ktorý obsahuje jednu z nasledujúcich sád mutácií:

K19R+K45R+F111K+K123R;

K19R+K45R+Q49K+F111K+K123R;

K19R+K45R+Q49K+K123R;

K19R+K45R+F111K;

K19R+K45R+Q49K+F111K;
K19R+Q49K+K123R;
K19R+Q49K+F111K+K123R;
K45Q+F111K+K123Q;
K45R+Q49K+K123R alebo
K45R+Q49K+F111K+K123R.

16. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 3 až 15, v ktorom je polymérna molekula vybraná zo skupiny obsahujúcej SS-PEG, NPC-PEG, aldehyd-PEG, mPEG-SPA, PEG-SCM a mPEG-BTC.

17. Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β a obsahujúci aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť konjugovanú s aspoň jedným cysteínovým zvyškom interferónového β polypeptidu, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným cysteínovým zvyškom do polohy vybranej zo skupiny, ktorá obsahuje F8, L9, R11, S12, F15, Q16, Q18, L20, W22, L28, L32, M36, P41, T58, Q64, N65, F67, I83, E85, N86, A89, N90, Y92, H93, H97, T100, L102, E103, L106, M117, L120, H121, R124, G127, R128, L130, H131, H140, I145, R147, V148, E149, R152, Y155 a F156.

18. Konjugát podľa nároku 17, v ktorom interferónový β polypeptid zahŕňa aj odstránený cysteínový zvyšok, výhodne C17.

19. Konjugát podľa nároku 17 alebo 18, v ktorom interferónový β polypeptid obsahuje mutácie C17S a/alebo N80C, výhodne C17S+N80C.

20. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 17 až 19, v ktorom je prvou nepolypeptidovou časťou polymérna molekula.

21. Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β a obsahujúci aspoň jednu prvú nepolypeptidovú časť majúcu kyselinovú skupinu ako pripájaciu skupinu, ktorá je

konjugovaná s aspoň jedným zvyškom kyseliny asparágovej alebo kyseliny glutámovej interferónového β polypeptidu, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným zvyškom kyseliny asparágovej alebo kyseliny glutámovej.

22. Konjugát podľa nároku 21, v ktorom sa aspoň jeden aminokyselinový zvyšok nachádza v polohe, v ktorej sa v rodičovskej interferónovej β molekule nachádza na povrchu vystavený aminokyselinový zvyšok.

23. Konjugát podľa nároku 21 alebo 22, ktorý obsahuje aspoň dva začlenené zvyšky kyseliny asparágovej alebo kyseliny glutámovej.

24. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 21 až 23, ktorý obsahuje aspoň dve prvé nepolypeptidové časti.

25. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 21 až 24, v ktorom je prvou nepolypeptidovou časťou polymérna molekula.

26. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 25, ktorý obsahuje druhú nepolypeptidovú časť.

27. Konjugát podľa nároku 26, v ktorom je druhou nepolypeptidovou časťou sacharidová časť, výhodne N-pripojená sacharidová časť.

28. Konjugát podľa nároku 27, v ktorom aminokyselinová sekvencia interferónového β polypeptidu ďalej obsahuje aspoň jedno začlenené a/alebo aspoň jedno odstránené *in vivo* glykozylačné miesto.

29. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 26 až 28, v ktorom polypeptid zahŕňa aspoň jeden odstránený aminokyselinový zvyšok obsahujúci pripájajúcu

skupinu pre prvú nepolypeptidovú časť a aspoň jeden začlenený aminokyselinový zvyšok obsahujúci pripájaciu skupinu pre druhú nepolypeptidovú časť.

30. Konjugát podľa nároku 29, v ktorom aminokyselinová sekvencia interferónového β polypeptidu zahŕňa aspoň dva odstránené aminokyselinové zvyšky obsahujúce pripájaciu skupinu pre prvú nepolypeptidovú časť a aspoň jeden začlenený aminokyselinový zvyšok obsahujúci pripájaciu skupinu pre druhú nepolypeptidovú časť.

31. Konjugát podľa nároku 28 alebo 30, v ktorom je prvou nepolypeptidovou časťou polymérna molekula majúca lyzín ako pripájaciu skupinu.

32. Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β a obsahujúci aspoň jednu polymérnu molekulu a aspoň jednu sacharidovú časť kovalentne pripojenú na interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β

a) aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre polymérnu molekulu a

b) aspoň jedným začleneným a/alebo aspoň jedným odstráneným aminokyselinovým zvyškom obsahujúcim pripájaciu skupinu pre sacharidovú časť,

s podmienkou, že ak je pripájacou skupinou pre polymérnu molekulu cysteínový zvyšok a sacharidovou časťou je N-pripojená sacharidová časť, cysteínový zvyšok nie je začlenený takým spôsobom, aby bolo poškodené N-glykozylačné miesto.

33. Konjugát podľa nároku 32, v ktorom má polymérna molekula ako pripájaciu skupinu lyzín.

34. Konjugát podľa nároku 33, v ktorom polypeptid zahŕňa aspoň jeden odstránený aminokyselinový zvyšok obsahujúci pripájaciu skupinu pre prvú nepolypeptidovú časť a aspoň jeden začlenený aminokyselinový zvyšok obsahujúci pripájaciu skupinu pre druhú nepolypeptidovú časť.

35. Konjugát podľa ktoréhokofvek z nárokov 26 až 34, v ktorom interferónový β polypeptid obsahuje jednu z nasledujúcich sád mutácií:

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

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

K19R+K45R+Q49N+Q51T+K123R.

36. Konjugát podľa ktoréhokofvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 35, v ktorom interferónový β polypeptid obsahuje modifikovaný N-koniec, ktorý nie je dostupný na konjugáciu s nepolypeptidovou časťou.

37. Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β a obsahujúci interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným začleneným glykozylačným miestom, pričom konjugát ďalej obsahuje aspoň jednu nepegylovanú sacharidovú časť pripojenú na začlenené glykozylačné miesto.

38. Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β a obsahujúci interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β v tom, že glykozylačné miesto sa začlenilo alebo odstránilo prostredníctvom začlenenia alebo odstránenia aminokyselinového zvyšku (zvyškov) tvoriaceho časť glykozylačného miesta v polohe, v ktorej sa v divom type ľudského interferónu β nachádza na povrchu vystavený aminokyselinový zvyšok.

39. Konjugát podľa nároku 37 alebo 38, v ktorom interferónový β polypeptid obsahuje aspoň jednu mutáciu vybranú zo skupiny zahŕňajúcej S2N+N4T, L9N+R11T, R11N, S12N+N14T, F15N+C17S, Q16N+Q18T, K19N+L21T, Q23N+H25T, G26N+L28T, R27N+E29T, L28N+Y30T, D39T, K45N+L47T, Q46N+Q48T, Q48N+F50T, Q49N+Q51T, Q51N+E53T, R71N+D73T, Q72N, D73N, S75N, S76N+G78T, L88T, Y92T, N93N+I95T, L98T, E103N+K105T, E104N+L106T, E107N+E109T, K108N+D110T, D110N, F111N+R113T alebo L116N.

40. Konjugát podľa nároku 39, v ktorom interferónový β polypeptid obsahuje jednu z nasledujúcich sád mutácií: Q49N+Q51T; Q49N+Q51T+F111N+R113T alebo Q49N+Q51T+R71N+D73T+F111N+R113T.

41. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 37 až 40, v ktorom sa aminokyselinová sekvencia líši aj odstráneným glykozylačným miestom, najmä N-glykozylačným miestom.

42. Konjugát vykazujúci aktivitu interferónu β a obsahujúci sacharidovú časť kovalentne pripojenú na interferónový β polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia sa líši od sekvencie divého typu ľudského interferónu β aspoň jedným odstráneným glykozylačným miestom.

43. Konjugát podľa nároku 41 alebo 42, v ktorom je N-glykozylačné miesto odstránené mutáciou N80C.

44. Konjugát podľa nároku 42 alebo 43, v ktorom interferónový β polypeptid obsahuje aspoň jednu z mutácií opísaných v nároku 38.

45. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 44, v ktorom interferónový β polypeptid ďalej obsahuje aspoň jednu substitúciu v polohe M1, C17, N80 alebo V101, najmä jednu zo substitúcií M1del, M1K alebo C17S.

46. Nukleotidová sekvencia kódujúca interferónový β polypeptidovú časť konjugátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 45.

47. Expresný vektor obsahujúci nukleotidovú sekvenciu podľa nároku 46.

48. Hostiteľská bunka obsahujúca nukleotidovú sekvenciu podľa nároku 46 alebo expresný vektor podľa nároku 47.

49. Hostiteľská bunka podľa nároku 48, ktorou je CHO, BHK, HEK293 bunka alebo SF9 bunka.

50. Spôsob prípravy interferónového β polypeptidu so zníženou imuno-génnosťou a/alebo predĺženým funkčným *in vivo* polčasom rozpadu a/alebo sérovým polčasom rozpadu, ako medziproduktu pri výrobe konjugátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 45, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa zavedenie aminokyselinového zvyšku tvoriaceho pripájajúcu skupinu pre prvú nepolypeptidovú časť do polohy vystavenej na povrchu proteínu, ktorá neobsahuje takú skupinu, a odstránenie aminokyselinového zvyšku tvoriaceho pripájajúcu skupinu pre prvú nepolypeptidovú časť a konjugovanie výsledného polypeptidu s prvou nepolypeptidovou časťou.

51. Spôsob podľa nároku 50, vyznačujúci sa tým, že nepolypeptidová časť je vybraná zo skupiny obsahujúcej polymérnu molekulu, sacharidovú časť, lipofilnú skupinu a organické derivatizačné činidlo.

52. Spôsob prípravy konjugátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 45, vyznačujúci sa tým, že interferónový β polypeptid reaguje s molekulou, s ktorou sa má konjugovať, v podmienkach vedúcich ku konjugácii a konjugát sa izoluje.

53. Farmaceutický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 45 a b) farmaceuticky prijateľné riedidlo, nosič alebo adjuvans.

54. Konjugát podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 45 na použité na liečenie ochorení, najmä sklerózy multiplex.

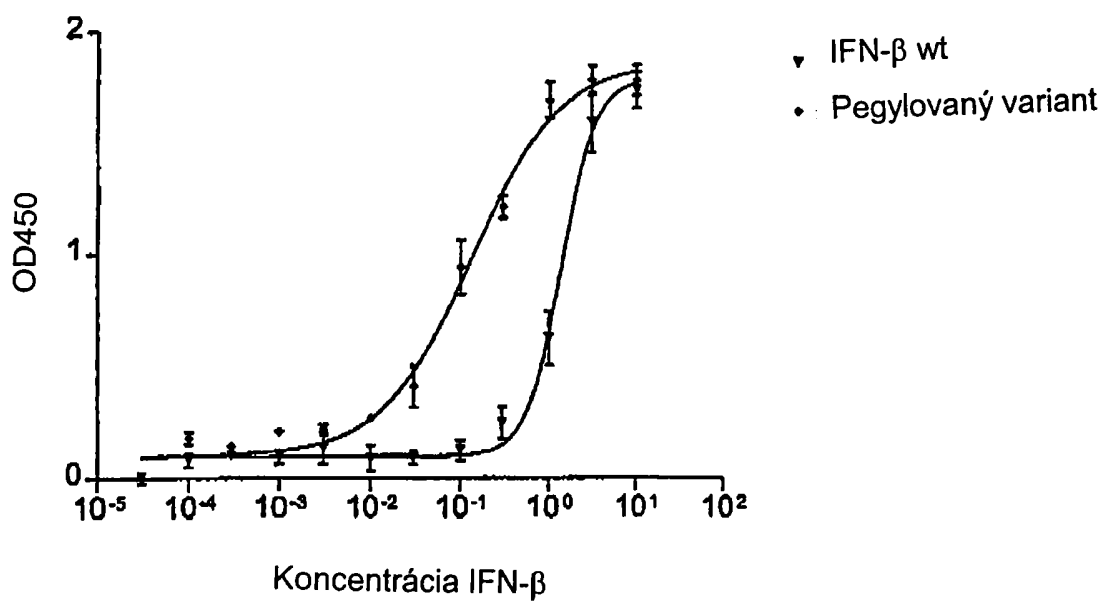
55. Použitie konjugátu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 45 na výrobu lieku na liečenie chorôb, najmä sklerózy multiplex.

56. Použitie konjugátu podľa ktoréhokolvek z nárokov 1 až 45 v kombinácii s inými interferónovými β prípravkami, ktoré vyvolávajú u cicavca cirkuláciu protilátok proti interferónu β 1a a/alebo 1b, na výrobu lieku na liečenie chorôb u cicavca.

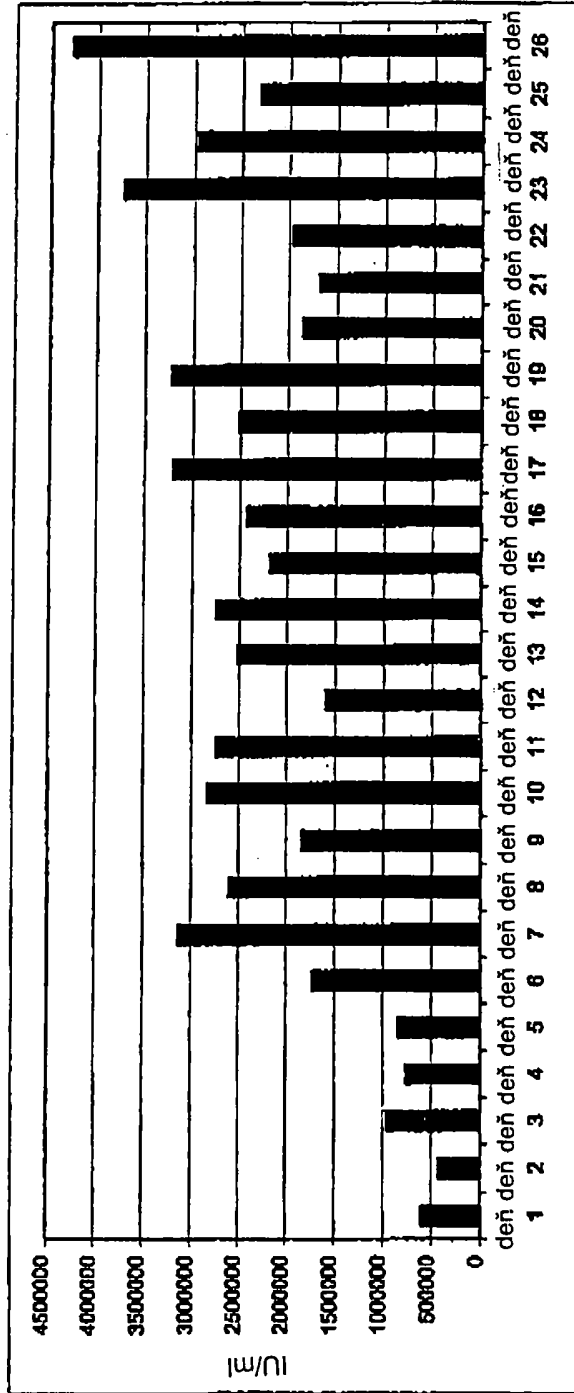
57. Zmes bunkovej kultúry, vyznačujúca sa tým, že obsahuje a) hostiteľskú bunku transformovanú nukleotidovou sekvenciou kódujúcou polypeptid vykazujúci aktivitu interferónu β a b) médium obsahujúce uvedený polypeptid produkovaný prostredníctvom expresie nukleotidovej sekvencie, pričom zloženie kultúry je priamo výsledkom sekrécie polypeptidu z hostiteľskej bunky a množstvo uvedeného polypeptidu je aspoň 800000 IU/ml média, najmä v rozsahu 800000 IU/ml až 3500000 IU/ml média.

58. Zmes bunkovej kultúry podľa nároku 57, vyznačujúca sa tým, že hostiteľskou bunkou je hostiteľská bunka podľa nároku 48 alebo 49.

1/2



Obr. 1



Obr. 2