

(19)



(10) **LT 2002 123 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **2002 123** (51) Int. Cl. (2006): **A61K 38/21**
A61P 19/00
(22) Paraiškos padavimo data: **2002 12 02** **A61P 25/00**
A61P 29/00
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2003 06 25** **A61P 31/00**
A61P 35/00
(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: — **A61P 37/00**
A61P 43/00
(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US01/41022** **C07K 14/435**
A61K 38/00
(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2001 06 18**
(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2002 12 02**
(30) Prioritetas: **60/212,046, 2000 06 16, US**
09/881,050, 2001 06 15, US
(71) Pareiškėjas:
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, , 13342 Berlin, DE
(72) Išradėjas:
Edward M. CROZE, US
Daryl FAULDS, US
T. Charis WAGNER, US
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Rita LAURINAVIČIŪTĖ, Gedimino pr. 45-6, LT-01109, Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Naujas interferonas išsėtinės sklerozės gydymui

- (57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su naujomis nukleorūgščių ir polipeptidų sekomis, kurios koduoja interferoną-beta-2 („IFN-β2“). Farmacinės kompozicijos, į kurias įeina farmaciškai priimtina pagalbinė medžiaga ir efektyvus kiekis žmogaus IFN-β2 polipeptido, jo biologiškai aktyvaus fragmento arba jo biologiškai aktyvaus darinio, tinka žmonių išsėtinės sklerozės gydymui.

NAUJAS INTERFERONAS IŠSĖTINĖS SKLEROZĖS GYDYMUI

Išradimo kilmė

Interferonai yra viduląsteliniai signaliniai baltymai, kurie vaidina svarbų vaidmenį įvairiuose biologiniuose procesuose, įskaitant, pvz., ląstelių proliferaciją ir imuninį atsaką.

Trumpas brėžinių aprašymas

Fig.1 parodyta žmogaus beta-2 interferono nukleotidų seka, įskaitant 5' ir 3' sekas.

Fig.2 parodyta žmogaus beta-2 interferono aminorūgščių seka. Parodyta IFN-β2 atviro skaitymo rėmėlio transliacija. Kursyvu parodyta signalinė seka, o dvi galimos N-glikozilinimo vietos bei cisteinai, galintys sudaryti disulfidinį ryšį, yra pabraukti ir paryškinti.

Fig.3. parodytos I tipo interferonų trimatės struktūros. Visi trys IFN turi bendrą 5 spiralių ryšulio struktūrinį elementą, būdingą žmogaus I tipo INF. Be to, IFN-β1b ir IFN-β2 yra tarpusavyje panašūs jų galimų N-glikozilinimo vietų ir numatytų disulfidinių ryšių padėtimi. Unikali C-galinė aminorūgščių seka yra tik IFN-β2.

Fig.4 yra baltymų sugretinimas, palyginantis žmogaus beta-2 interferoną su kitų tipų interferonais.

Fig.5 yra žmogaus I tipo ir II tipo IFN-β2 filogenetinis palyginimas. Remiantis cisteino išsilaikymo vaizdu, galimomis N-glikozilinimo vietomis ir filogenetine analize, IFN-β2 yra labiau giminingas IFN-β, nei bet kuris kitas interferonas.

Fig.6 parodytas nuo I tipo IFN priklausantis ISRE-luciferaze detektuojamas bandymas su žmogaus beta-2 interferonu.

Fig.7 parodyti IFN-β2 prisijungimo prie žmogaus I tipo interferono receptoriaus su anti-IFN-β2 polikloniniu antikūnu inhibavimo rezultatai.

Fig.8 (A ir B) parodytas interferonų poveikis į ląstelių proliferaciją.

Fig.9 pailiustruotas IFN- β 2 antiproliferacinis aktyvumas bandyme su žmogaus ląstelėmis.

Fig.10 parodytas interferonų priešvirusinis poveikis bandyme su žmogaus ląstelėmis.

Fig.11 parodyta konkurencija tarp IFN- α 2 ir IFN- β 2 dėl susirišimo su I tipo interferono receptoriumi.

Fig.12 yra žmogaus IFN- β 2 5' genominė nukleotidų seka.

Fig.13 yra nukleotidų seka, koduojanti žmogaus IFN- β 2 5' sritį.

Fig.14 yra IFN- β 2 5' polipeptido seka.

Fig.15 parodyta žmogaus fetalinių astrocytų antiproliferacinis atsakas į IFN- β 2. (A) yra fetalinė smegenų kultūra 1 be stimuliacijos, o (B) yra fetalinė smegenų kultūra 1 su EGF stimuliacija; (C) yra fetalinė smegenų kultūra 2 be stimuliacijos, o (D) yra fetalinė smegenų kultūra 2 su EGF stimuliacija.

Išradimo aprašymas

Buvo identifikuotos naujos nukleorūgštys, polipeptidinės sekos ir jų nukleorūgščių reguliatoriai, kurie koduoja beta-2 interferoną ("IFN- β 2") – viduląstelių signalinių polipeptidų klasę, kurie turi daugybę biologinių efektų, įskaitant, pvz., priešnavikinį poveikį, priešvirusinį poveikį ir imunoreguliacinį poveikį. Žr., pvz., Cirelli and Tying, *Clin. Immunother.* 3, 27-87, 1995. Šio išradimo interferoninis polipeptidas, jo fragmentai ir jo dariniai turi vieną arba daugiau iš toliau nurodytų biologinio aktyvumo variantų, įskaitant, bet neapsiribojant, IFN- β 2 bioaktyvumą ir IFN- β 2-specifinį imunogeninį aktyvumą.

"IFN- β 2 bioaktyvumas" reiškia, pvz., funkcinius efektus, tokius kaip pokyčius ląstelių membranose, anti-onkogeninį reguliavimą, priešnavikinį aktyvumą, priešvirusinį aktyvumą, ląstelių augimo inhibavimą arba augimo stabdymą, antiproliferaciją, limfocitų citotoksiškumo sustiprinimą, poveikį į imunoreguliaciją, tikslinių ląstelių diferenciacijos inhibavimą arba indukciją, makrofagų aktyvavimą, onkogenų slopinimą ir t.t.; imunologinius efektus, tokius kaip antikūnų susidarymo sumažinimą, ląstelės membranos komponentų padidinimą (didysis histosuderinamumo kompleksas, Fc receptoriai, β 2-mikroglobulinas), ląstelių tarpininkaujamo imuniškumo

moduliaciją, citokinų (pvz. interleukino) produkcijos padidinimą, citotoksinių T ląstelių poveikio padidinimą, makrofagų poveikio padidinimą ir natūralaus sunaikinimo padidinimą; poveikį į interferono receptoriaus, tokio kaip I tipo interferono receptoriaus, ypač jo IFNAR2c grandinės, surišimą ir tokio receptoriaus surišimo stimuliuojamus poveikius į ląsteles; aktyvaciją ir/arba asociaciją su viduląstelinėmis signalinėmis molekulėmis, tokiomis kaip Jak1, Tyk2, Stat1, Stat2, IRS-1, IRS-2, CrkL, CrkII, Vav ir t.t. ir kitus transkripcijos kryptimi veikiančius efektorius (pvz. MAPK). Žr. pvz., Platanias and Fish, *Exp. Hematology*, 27:1583-1592, 1999.

Terminas "antiproliferacinis aktyvumas" reiškia, kad šio išradimo IFN- β 2 inhibuoja ląstelių augimą arba sukelia apoptozę. Tai yra parodyta toliau duoduose pavyzdžiuose. Žr. taip pat fig.8, 9 ir 15. Pavyzdžiui, IFN- β 2 inhibuoja astrocitų proliferaciją smegenyse. Šis poveikis yra naudingas, pvz., gydant išsėtinę sklerozę, kadangi astrocitų proliferacija gali duoti neuronų uždegimus, kurie yra būdingi šiai ligai. Inhibuodamas astrocitų augimą, IFN- β 2 sumažina uždegimą ir palengvina ligą. Taigi, šis išradimas yra susijęs su išsėtinės sklerozės gydymo būdais, apimančiais skyrimą tokių IFN- β 2 kiekių, kurie veiksmingai inhibuoja astrocitų proliferaciją ir/arba sumažina uždegimą.

"IFN- β 2-specifinis imunogeninis aktyvumas" reiškia, pvz., kad IFN- β 2 polipeptidas išgauna imunologinį atsaką, kuris yra selektyvus arba kuris teikia pirmenybę IFN- β 2, pvz. imunologinį atsaką, kuris yra selektyvus žinduolio IFN- β 2. Taigi, antikūnų, T-ląstelių, makrofagų, B-ląstelių, dendritinių ląstelių ir t.t. stimuliavimas, pvz. aminorūgščių seka, pasirinkta iš žinduolio IFN- β 2, pvz. fig.2 parodytu IFN- β 2, yra specifinis imunogeninis aktyvumas. Šie atsakai gali būti išmatuoti įprastu būdu.

IFN- β 2 yra viso ilgio žinduolio polipeptidas, turintis aminorūgščių seką, kuri yra gaunama iš gamtinio šaltinio ir kuri pasižymi viena arba daugiau iš minėtų bioaktyvumo rūšių. Jis gali turėti fig.2 parodytą seką, turinčią atvirą skaitymo rėmelį, kuris prasideda iniciacijos kodonu ir baigiasi stop-kodonu. Jis apima gamtines normalias, gamtines mutantines ir gamtines polimorfines, įskaitant atskiros nukleotido polimorfizmus (SNP), ir t.t., sekas. Gamtiniais šaltiniais yra, pvz., gyvos ląstelės, pvz. gautos iš audinių arba viso organizmo,

išaugintos ląstelių linijos, įskaitant pirmines ir imortalizuotas ląstelių linijas, audinius iš biopsijos ir t.t.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su žinduolio IFN- β 2 fragmentais. Tinkamiausi yra "biologiškai aktyvūs" fragmentai. Terminas "biologiškai aktyvus" reiškia, kad polipeptidinis fragmentas pasižymi aktyvumu gyvoje sistemoje arba veikia į gyvos sistemos komponentus. Biologinio aktyvumo rūšys yra tokios, kaip paminėta aukščiau, pvz. IFN- β 2 bioaktyvumas ir IFN- β 2-specifinis imunogeninis aktyvumas. Fragmentai gali būti pagaminti bet koku norimu būdu, įskaitant cheminę sintezę, genų inžineriją, skaldymo produktus ir t.t. Biologiškai aktyvus IFN- β 2 fragmentas apima polipeptidus, kurie turi pašalintas arba modifikuotas aminorūgščių sekas baltymo arba karboksi-, arba amino-gale.

Geriau, kad nebūtų įtrauktos fig.12 ir 13 parodytos nukleorūgštys ir jų fragmentai. Geriau, kad nebūtų įtraukti fig.14 parodyti polipeptidai ir jų fragmentai. Tačiau polipeptidai, kurie turi tokias sekas, nėra išskiriami, pvz. viso ilgio IFN- β 2, polipeptidas, turintis du arba daugiau iš minėtų fragmentų, arba polipeptidas, turintis vieną iš minėtų fragmentų ir papildomas aminorūgščių sekas arba iš IFN- β 2, arba iš kito šaltinio.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su IFN- β 2, turinčiu išvestą aminorūgščių seką 1-208, kaip parodyta fig.2. Apskaičiuota jo molekulinė masė yra apie 23000 daltonų, o numatytas izoelektrinis taškas yra 8,1. Tai yra atsparus rūgštims baltymas, turintis maždaug 26000 daltonų molekulinę masę, kaip rodo SDS-PAGE matavimai. Neglikozilinta E.coli produkuota forma turi maždaug 20500 daltonų molekulinę masę. (Žr. toliau duotus pavyzdžius).

Kaip parodyta fig.2, jis turi numatytą signalinę seką iš aminorūgščių nuo -1 iki -21, dvi galimas N-glikozilinimo vietas prie aminorūgščių 74-77 ir 83-86 ir cisteino liekanas 32, 142 ir 154 padėtyse. Numatoma, kad disulfidinis ryšys susidarys tarp cisteino liekanų 32 ir 142 padėtyse. Jis turi A spiralę prie 7-24, B spiralę prie 55-69, C spiralę prie 83-95, D spiralę prie 118-134 ir E spiralę prie 143-158 padėtyse esančių aminorūgščių.

Subrendęs IFN- β 2 reiškia IFN- β 2, kuris neturi nuo -1 iki -21 aminorūgščių, kaip parodyta fig.2, ir kurio ilgis yra 187 aminorūgštys. Jis taip

pat turi unikalų 18 aminorūgščių pailginimą C-gale, lyginant jį su kitais žinomais interferonų tipais. Toks išplėtimas gali būti naudojamas kaip IFN- β 2 markeris ir nukleotido, ir aminorūgščių lygiu, ir gali būti sujungtas su heterologiniais polipeptidais.

Šio išradimo IFN- β 2 polipeptidas, pvz. turintis fig.2 parodytą aminorūgščių seką, gali būti analizuojamas bet koku tinkamu metodu, nustatant kitas struktūrines ir/arba funkcines polipeptido dalis, įskaitant membraną išplečiančias sritis, hidrofobines sritis. Pavyzdžiui, IFN- β 2 polipeptidas gali būti analizuojamas aprašytais, pvz. Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105, 1982; EMBL Protein Predict; Rost and Sander, *Proteins*, 19:55-72, 1994, metodais.

Kiti šio išradimo IFN- β 2 homologai įvairiais metodais gali būti gaunami iš žinduolinių ir nežinduolinių šaltinių. Pavyzdžiui, hibridizacija su oligonukleotidais (pvz. pradmenimis koduojančios srities amplifikacijai – 5'-ATG ATT ATC AAG CAC TTC TTT GGA-3' ir 5'-CTA CCT CGG GCT TCT AAA CTC TGT-3'). Pradmenys, naudojami ekspresijai *E.coli* – 5'-GGA ATT CCT ACT ACC TCG GGC TTC TAA-3' ir 5'-GCG CGC GCA TAT GCT AGA TTT GAA ACT GAT TAT-3'. Pradmenys viso ilgio žinomi sekai, įskaitant 5' ir 3' netransliuojamą genominę seką – 5'-TTT AGG TGA CAC TAT AGA AT-3' ir 5'-TAA AAT GGA TAD AAT ATA TAA-3' – gali būti naudojami homologams atrinkti, pvz. kaip aprašyta Sambrook et al., *Molecular Cloning*, Chapter 11, 1989. Tokie homologai gali turėti įvairius nukleotidų ir aminorūgščių sekos identiškumo ir panašumo į IFN- β 2 lygius. Žinduolių organizmais yra, pvz. graužikas, pelė, žiurkė, žiurkėnas, įvairios beždžionės, kiaulė, karvė, arklys, šuo, katė ir t.t. Nežinduoliniais organizmais yra, pvz. stuburiniai, bestuburiai, zebražuvės, viščiukai, drozofilos, *C. elegans*, *Xenopus*, mielės, tokios kaip *S. pombe*, *S. cerevisiae*, apvaliosios kirmėlės, prokariotai, augalai, *Arabidopsis*, *Crustacea*, *artemia*, virusai ir t.t. Tinkamų hibridizacijai nukleotidų atrinkimui gali būti naudojamas efektyvus metodas. Pavyzdžiui, IFN- β 2 būdingos sritys gali būti identifikuojamos lyginant šio išradimo IFN- β 2 su kitais IFN- β 2 tipais ir atrenkant tokias aminorūgščių sekas, kurios randamos tik pirmajame (t.y. nekonservatyvias arba "būdingas" IFN- β 2). Žr. pvz. fig.4, kurioje parodytos įvairių skirtingų interferonų tipų konservatyvios ir nekonservatyvios sritys. Gali

būti pasirinktos nekonservatyvios aminorūgščių sritys (pvz. KSLSP) ir remiantis tokiomis sekomis sukurti išsigimę mėginiai. Žr. taip pat Venkataraman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:3658-3663, 1999. Kitos specifinės (t.y. nekonservatyvios) ir/arba konservatyvios aminorūgščių sekos gali būti rastos įprastu būdu, pvz. tyrinėjant genų/baltymų duomenų bazę kompiuterinių programų BLAST rinkinio pagalba.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su IFN- β 2 būdingomis aminorūgščių sekomis, pvz. apibrėžta aminorūgščių seka, kuri yra randama konkrečioje fig.2 ir 4 parodytoje sekoje, bet jos nėra kituose interferonų tipuose. Tinkamiausiuose polipeptiduose yra bent maždaug aštuonios gretimos aminorūgštys, pvz. maždaug 9, 10, 12, 15, 20, 21, 22, 25, 30, 40, 50 ir t.t. [tokius polipeptidus gali įeiti, pvz., KHFFGTV, IIFQQRQV, KSLSP, FRANI, AEKLSGT, CLFFVFS ir QGRPLNDMKQELTTEFRSPR ir jų fragmentai. IFN- β 2 būdinga aminorūgščių seka arba jos dalis gali būti naudojamos pagaminti peptidams kaip antigenams, skirtiems jam būdingam imuniniam atsakui sukelti. Tokioje imunizacijoje gauti antikūnai gali būti naudojami kaip specifiniai zondai žinduolio IFN- β 2 baltymui diagnostiniams arba tyrimo tikslams, o taip pat ir kaip ekspresijos markeriai.

Kaip jau minėta, šio išradimo polipeptidai gali turėti įvairias IFN- β 2 aminorūgščių sekas (pvz. viso ilgio seką, t.y. turinčią starto ir stop-kodonus, kaip parodyta fig.1, subrendusią aminorūgščių seką (pvz. kurioje IFN- β 2 polipeptidas yra gaunamas kaip pirmtakas, kuris yra brandinamas į subrendusį polipeptidą, arba jo fragmentus)). Tinkamais fragmentais yra, pvz. fragmentai, apimantys arba susidedantys pagrindinai iš bet kurios iš aukščiau minėtų dalių ir specifinių arba konservatyvių aminorūgščių sekų, tokių kaip parodyta fig.2 ir 4.

Šio išradimo IFN- β 2 polipeptido fragmentas gali būti pasirinktas taip, kad jis turėtų būdingą biologinį aktyvumą, pvz. priešvirusinį, imunomoduliacinį, augimą mažinantį ir t.t. Toks aktyvumas gali būti nustatomas žinomais būdais. Žr. toliau. Šie peptidai taip pat gali būti identifikuojami ir pagaminami kaip aprašyta EP 496162.

Šio išradimo polipeptidas taip pat gali turėti 100 % arba mažesnę aminorūgščių sekos identiškumą su fig.2 pateikta aminorūgščių seka.

Tolimesnio aptarimo tikslams sekos identiškumas reiškia, kad tas pats nukleotidas arba aminorūgštis, kuris yra randamas fig. 1 ir 2 pateiktose sekose, yra randamas atitinkamoje lyginamos sekos(-ų) padėtyje. Polipeptidas, turintis mažesnę nei 100 % sekos identiškumą fig. 1 ir 2 parodytai aminorūgščių sekai, gali turėti įvairius pakeitimus gamtinėje aminorūgščių sekoje, įskaitant homologinius ir nehomologinius aminorūgščių pakeitimus. Homologinių aminorūgščių pakeitimų pavyzdžius žiūrėkite toliau. Vienodų ir homologinių liekanų suma, padalinta iš bendro sekos, su kuria yra lyginamas IFN- β 2 polipeptidas, liekanų skaičiaus yra lygi procentiniam sekos panašumui. Sekos identiškumo ir panašumo apskaičiavimo tikslams lyginamos sekos gali būti išdėstomos ir apskaičiuojamos pagal bet kurį iš pageidaujamų metodų, algoritmų, kompiuterinių programų ir t.t., įskaitant pvz., FASTA, BLASTA.

Polipeptidas, turintis mažesnę nei 100 % aminorūgščių sekos identiškumą fig.2 parodytai aminorūgščių sekai, gali turėti apie 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 88 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 % arba tik maždaug 53 % sekos identiškumą.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su polipeptidiniais IFN- β 2 mutantais, t.y. bet kokiais polipeptidais, kurie turi aminorūgščių seką, besiskiriančią nuo aminorūgščių sekos, gaunamos iš gamtinio šaltinio (žinduolio IFN- β 2 fragmentas nesiskiria aminorūgščių seka nuo gamtinio IFN- β 2, nors jis skiriasi aminorūgščių skaičiumi). Taigi, IFN- β 2 polipeptidiniai mutantai turi aminorūgščių pakeitimus, intarpus ir iškirpimus, įskaitant negamtines aminorūgštis.

Šio išradimo IFN- β 2 mutantai aminorūgščių sekoje taip pat gali būti pagaminti remiantis homologijos paieškomis genų duomenų bankuose, pvz. Genbank, EMBL. Sekos homologijos paieškos gali būti vykdomos naudojant įvairius būdus, įskaitant kompiuterinių programų BLAST šeimoje aprašytus algoritmus, Smith-Waterman algoritmą ir t.t. Mutacijos į seką gali būti įvedamos, identifikuojant ir sugretinant aminorūgštis su sritimi, kuri yra identiška ir/arba homologinė tarp polipeptidų, ir tada remiantis tokiu sugretinimu modifikuojant aminorūgštį. Pavyzdžiui, šio išradimo IFN- β 2, kaip parodyta fig.4, turi vienodas su įvairiais žinomais interferonais aminorūgščių

sekas. Šių polipeptidų konservatyviųjų aminorūgščių sekų sugretinimas gali identifikuoti liekanas, kurių modifikacijos, kaip būtų galima laukti, sumažins arba eliminuos IFN- β 2 biologinį aktyvumą, tokį kaip sugebėjimą susiristi su receptoriumi, ir t.t. Pavyzdžiui, kai sugretinimas atskleidžia konservatyvias dviejų arba daugiau dalių aminorūgštis, galima laukti, kad šių aminorūgščių pašalinimas arba pakeitimas duos priešingą poveikį biologiniam aktyvumui.

Aminorūgščių pakeitimą galima vykdyti pakeičiant vieną homologinę aminorūgštį kita. Homologinės aminorūgštys gali būti nustatytos remiantis šoninės grandinės dydžiu ir poliarumo laipsniu, įskaitant mažas nepolines: cisteiną, proliną, alaniną, treoniną; mažas polines: seriną, gliciną, aspartatą, asparaginą; dideles polines: glutamatą, glutaminą, liziną, argininą; vidutinio polingumo: tiroziną, histidiną, triptofaną; dideles nepolines: fenilalaniną, metioniną, leuciną, izoleuciną, valiną. Homologinės rūgštys taip pat gali būti sugrupuotos taip: neturinčios krūvio polinės R grupės - glicinas, serinas, treoninas, cisteinas, tirozinas, asparaginas, glutaminas; rūgštinės aminorūgštys (turinčios neigiamą krūvį) - asparto rūgštis ir glutamo rūgštis; bazinės aminorūgštys (turinčios teigiamą krūvį) - lizinas, argininas, histidinas. Homologinėmis aminorūgštimis taip pat gali būti rūgštys, aprašytos Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978 ir Argos, *EMBO J.*, 8, 779-785, 1989.

Gali būti pagaminti mutantai, kurie neturi poveikio į aktyvumą arba kurie sumažina arba padidina IFN- β 2 aktyvumą, lyginant su laukinio tipo interferonu. Mutacijos gali būti padarytos analogiškai kitiems IFN- β 2'ams, tokiems kaip fibroblastų interferonas (beta-1), ir alfa-interferonams. Pavyzdžiui, IFN- β 2 susiklosto į interferonui būdingus penkių spiralių ryšulius: A spiralę 7-24, B spiralę 55-69, C spiralę 83-95, D spiralę 118-134 ir E spiralę 143-158 aminorūgščių padėtyse. Šios spiralinės yra tarpusavyje surištos atsitiktinėmis spiralizuotomis arba kilpinėmis sritimis. Žr. fig.3. Mutacijos spiralinėse struktūrose gali būti padarytos analogiškai IFN- β 1 (fibroblastų), pvz. kaip aprašyta Runkel et al., *Biochemistry*, 39:2538-2551, 2000. Pavyzdžiui, A spiralės dalys, AB kilpa ir E spiralė dalyvauja receptoriaus surišime. Žr. taip pat Piehler and Schreiber, *J. Mol. Biol.*, 294:223-237, 1999.

Šio išradimo IFN- β 2, kaip ir fibroblastų interferonas, turi tris cisteino liekanas 32, 142 ir 154 aminorūgščių padėtyse. Cisteino liekanų 32 ir 142 padėtys yra panašios į cisteino liekanų padėtis, kurios, kaip žinoma, fibroblastų interferone sudaro disulfidinį ryšį. Analogiškai fibroblastų interferonui, 154 padėtyje esanti aminorūgštis gali būti pašalinta arba pakeista neutralia aminorūgštimi, tokia kaip glicinas, valinas, alaninas, leucinas, izoleucinas, tirozinas, fenilalaninas, histidinas, triptofanas, serinas, treoninas arba metioninas. Tinkamiausios yra serinas ir treoninas, kadangi jos yra chemiškai panašios į cisteiną. Nesuporuoto cisteino pašalinimas gali apsaugoti nuo netinkamo vidumolekulinių arba tarpmolekulinių disulfidinių ryšių susidarymo. Žr. pvz. U.S. Pat. No. 4,588,585. Mutacijos taip pat gali būti padarytos pagal U.S. Pat. Nos. 4,914,033, 5,545,723 ir 5,580,723. Žr. taip pat, pvz., Fish et al., *J. Interferon Res.*, 12:257-66, 1992; Fish et al., *J. Interferon Res.*, 9:97-114, 1989; DiMarco et al., *J. Interferon Res.*, 13:139, 1993; Mitsui et al., *Pharmacol. Therap.*, 58:93-132, 1993; Wang et al., *J. Immunol.*, 152:705-715, 1994.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su nukleorūgščių mutantais, koduojančiais tokius polipeptidinius mutantus. Taigi, šis išradimas yra susijęs su fig.1 parodyta nukleotidų seka, kur minėtos nukleorūgštys koduoja polipeptidą, ir aminorūgštys vienoje arba daugiau padėčių yra pakeistos arba pašalintos, arba ir pakeistos, ir pašalintos, o šios nukleorūgšties koduojamas polipeptidas turi biologinį aktyvumą, tokį kaip padidintą išgavimą iš bakterinės ląstelės, kai ekspresuojamas rekombinantiniu būdu, arba padidintą bioaktyvumą. Polipeptidinis mutantas ir jį atitinkanti koduojanti nukleotidų seka, gali turėti fig.2 parodytą aminorūgščių seka, išskyrus seka, kur vienoje arba daugiau padėčių yra pakeista homologinėmis aminorūgštimis, pvz. kur yra 1, 5, 10, 15 arba 20 pakeitimų. Modifikacijos poveikis į minėtus aktyvumus gali būti nustatyta žinomais aukščiau ir žemiau aprašytais būdais ir šios srities specialistams žinomais būdais.

Yra žinomi įvairūs IFN- β 2 tyrimo būdai. Pavyzdžiui, tinkamais testais yra: priešvirusiniai testai, tokie kaip CPE (pvz., U.S. Pat. No. 5,545,723 ir 4,914,033; toliau duodami pavyzdžiai); receptorių surišimas (pvz., U.S. Pat. No. 5,545,723 ir toliau duodami pavyzdžiai); STAT aktyvacija (pvz. toliau

duodami pavyzdžiai); IFN- β 2 atsakingų genų aktyvacija (pvz., už interferono stimuliavimą atsakingas elementas (ISRE) yra veiksmingai prijungtas prie reporterinio geno, tokio kaip liuciferazės, kaip parodyta toliau duodamuose pavyzdžiuose); I tipo receptoriaus fosforilinimas (toliau duodami pavyzdžiai); antiproliferacinis (U.S. Pat. No. 4,914,033, įvertinantis IFN- β 2 sugebėjimą inhibuoti ląstelių linijos replikaciją; toliau duodami pavyzdžiai); imunomoduliacinis (U.S. Pat. No. 4,914,033, nuo antikūnų priklausantis ląstelių citotoksiškumas; Noronba et al., *J. Neuroimmunol.*, 46:145-154, 1993, T-limfocitų ir jų IFN-gama ("IFN- γ ") gaminimo inhibavimas; eksperimentinis alerginis encefalomyelitas ("EAB") (pvz., Louboutin et al., *Acta Neurol. Scand.*, 88:97-99, 1993; Rott et al., *Eur. J. Immunol.*, 23:1745-1751, 1993; toliau duodami pavyzdžiai).

Šio išradimo IFN- β 2, jo fragmentai arba jo pakaitų turintys polipeptidai gali taip pat turėti įvairių modifikacijų, kurios apima lipidų modifikaciją, metilinimą, fosforilinimą, glikozilinimą, kovalentines modifikacijas (pvz. aminorūgšties R grupę), aminorūgšties pakeitimą, aminorūgšties išėmimą arba aminorūgšties pridėjimą. Polipeptido modifikavimas gali būti vykdomas įvairiais metodais, įskaitant rekombinantinį, sintetinį, cheminį ir t.t.

Šio išradimo polipeptidai (pvz. viso ilgio, jų fragmentai, jų mutantai) gali būti naudojami įvairiais būdais, pvz. testuose, kaip imunogenai antikūnams, kaip aprašyta toliau, kaip biologiškai aktyvūs agentai (pvz. turintys vieną arba daugiau su šio išradimo IFN- β 2 susijusių aktyvumo rūšių).

Šio išradimo IFN- β 2 koduotas polipeptidas, jo darinys arba jo fragmentas gali būti sujungtas su viena arba daugiau struktūrinių dalių, funkcinių dalių, detektuojamų dalių, antigeninių dalių ir/arba norimu dominančiu peptidu tam tikra tvarka, kurios nėra gamtoje, t.y. negamtine. Tokias ypatybes turintis polipeptidas yra chimerinis arba sulietas polipeptidas. Toks chimerinis polipeptidas gali būti pagamintas įvairiais metodais, įskaitant cheminį, sintezės, kvazi-sintezės ir/arba rekombinantinį metodus. Chimerinė nukleorūgštis, koduojanti chimerinį polipeptidą, gali turėti įvairias dalis arba norimus polipeptidus ištisiniame (pvz. su daugeliu N-galinių dalių stabilizavimui arba aktyvumo padidinimui) arba pertrauktame skaitymo rėmelyje, pvz. turinčiame iškirpimus, kirpimo vietas, stiprintuvus ir t.t.

Chimerinė nukleorūgštis gali būti pagaminama įvairiais metodais. Žr. pvz. U.S. Pat. No. 5,439,819. Dalis arba norimas peptidas gali turėti bet kokią norimą savybę, įskaitant biologinę funkciją, tokią kaip signalinė funkcija, augimo skatinimas, nutaikymas į ląstelę (pvz. signalinė seka, nutaikymo seka, tokia kaip nutaikymas į endoplazminį tinklą arba branduolį) ir t.t., struktūrinę funkciją, tokią kaip hidrofobinė, hidrofilinė, apimanti membraną ir t.t., receptoriaus-ligando funkcijas ir/arba detektavimo funkcijas, pvz., sujungtas su fermentu, fluorescuojančiu polipeptidu, žaliai fluorescuojančiu baltymu (Chalfie et al., *Science*, 263:802, 1994; Cheng et al., *Nature Biotechnology*, 14:606, 1996; Levy et al., *Nature Biotechnology*, 14:610, 1996) ir t.t. Dalimi taip pat gali būti imunoglobulinas, pvz., stabilumui padidinti, ir t.t., toks kaip sunkiosios, lengvosios grandinės imunoglobulinas, ir/arba Fc dalis arba tag sekos epitopas.

Be to, polipeptidas arba jo dalis gali būti naudojami kaip selektyvi žymė, kai jis yra įvedamas į šeimininko ląstelę. Pavyzdžiui, šio išradimo aminorūgščių seką koduojanti nukleorūgštis gali būti sulieta rėmelyje su norima koduojančia seka ir veikti kaip tag gryninimo, atrankos arba žymėjimo tikslams. Suliejimo sritis gali koduoti skaldymo vietą ekspresijai, išskyrimui, išgryninimui ir t.t. palengvinti.

Šio išradimo IFN- β 2 polipeptidas arba jo fragmentas taip pat gali būti sujungtas su kitais citokinais, tokiais kaip interferonai, pagaminant chimerinius arba hibridinius IFN- β 2'us. Tokie hibridiniai IFN- β 2'ai gali būti sudaryti su bet kokios klasės interferonu, įskaitant alfa, omega, gama, epsilon, trofoblastų, fetaliniu interferonu ir t.t. Gali būti padaryti hibridai (ir aukščiau aptarti mutantai), kurie turi sumažintą arba apribotą aktyvumą, lyginant su hibridais, iš kurių jie yra pagaminti, pvz. apribotą ląstelių augimo reguliavimo aktyvumą, priešvirusinį aktyvumą arba imunomoduliacinį aktyvumą. Apie hibridus tarp fibroblastų interferono ir alfa-interferono žr. pvz., U.S. Pat. No. 4,758,428, pvz. naudojant maždaug 47-187, 74-187, 1-73 ir t.t. fibroblastų interferono aminorūgštis.

Šio išradimo polipeptidas gali būti produkuojamas ekspresijos sistemoje, pvz. in vivo, in vitro, beląstelinėje, rekombinantinėje, ląstelių suliejimo ir t.t. Tokių sistemų suteiktos modifikacijos apima glikozilinimą,

aminorūgščių pakeitimą (pvz. keičiant kodono naudojimą), polipeptido brandinimą, tokį kaip skaldymas, atskėlimas, endopeptidazinis arba egzopeptidazinis aktyvumas, cheminių liekanų, įskaitant lipidus ir fosfatus, prijungimas ir t.t.

Šio išradimo polipeptidas gali būti išgaunamas iš gamtinių šaltinių, transformuotų šeimininko ląstelių (auginimo terpės arba ląstelių) įprastais būdais, pvz. kitiems interferonams ir kitiems rekombinantiniams baltymams naudojamais būdais, įskaitant ekstrakciją detergentais (pvz. nejoniniu detergentu, tritonu X-100, CHAPS, oktilgliukozidu, Igepal CA-630), fazine ekstrakcija, ekstrakcija n-butanoliu, nusodinimą amonio sulfatu arba etanoliu, ekstrakciją rūgštimi, anijonų arba katijonų mainų chromatografiją, chromatografiją per fosfoceliuliozę, sefadeksą, hidrofobinės sąveikos chromatografiją, chromatografiją per hidroksiapatitą, chromatografiją per lecitiną, gel-elektroforezę, giminingumo chromatografiją, SDS PAGE, chromatografiją per kontroliuojamų porų stiklą (CPG), antikūnų giminingumo chromatografiją, gel-filtraciją, chromatografiją per mėlynąją sefarozę, chromatografiją per fenil-agarozę, CPG ir chromatografiją su cinko chelatu (pvz., Heine and Billiau, *Methods in Enzymology*, 78 (Part A): 448-456, 1981), Cibaron Blue F3GA-agarozę ir HPLC (Kenny et al. *Methods in Enzymology*, 78 (Part A): 435-447, 1981). Žr. taip pat Innis and McCormick, *Methods in Enzymology*, 119:397-403, 1986; Dembinski and Sulkowski, *Preparative Biochemistry*, 16:175-186, 1986; Friesen et al., *Methods in Enzymology*, 78 (Part A): 433-435, 1981); Pestka et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 56:727-77, 1987. Jeigu reikia, gali būti naudojamos baltymo renatūracijos stadijos, kad būtų visiškai sutvarkoma subrendusio baltymo konfigūracija.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su nukleorūgštimis, tokiomis kaip DNR ir RNR, koduojančiomis šio išradimo IFN- β 2 polipeptidus ir jų fragmentus. IFN- β 2 nukleorūgštis arba jos fragmentas yra nukleorūgštis, turinti iš gamtinio šaltinio gaunamą nukleotidų seką. Todėl ji apima gamtines, normalias, gamtines mutantines ir gamtines polimorfines aleles (pvz., SNP) ir t.t. Gamtiniais šaltiniais yra, pvz., gyvos ląstelės, gaunamos iš audinių ir pilnų organizmų, auglių, auginamų ląstelių linijų, įskaitant pirmines ir imortalizuotas ląstelių linijas.

Šio išradimo nukleorūgštis seka gali turėti fig.1 parodytą pilną koduojančią seką, jos išsigimusias sekas arba jos fragmentus. Šio išradimo nukleorūgštis taip pat gali turėti nukleotidų seką, kuri yra 100 % komplementari, pvz. antiprasminė, bet kuriai aukščiau ir žemiau paminėtai nukleotidų sekai.

Šio išradimo nukleorūgštis, t.y. nukleotidų polimeras arba polinukleotidas, gali būti gaunama iš įvairiausių skirtingų šaltinių. Ji gali būti gaunama iš DNR arba RNR, tokios kaip poliadenilinta iRNR, pvz. išskirta iš audinių, ląstelių arba viso organizmo. Ši nukleorūgštis gali būti gauta tiesiogiai iš DNR arba RNR arba iš kDNR bibliotekos. Ši nukleorūgštis gali būti gaunama iš ląstelės arba audinio (pvz. iš embrioninių arba suaugusių širdies ląstelių arba audinių) tam tikroje išsivystymo stadijoje, turinčių norimą genotipą, fenotipą ir t.t.

Kaip minėta aukščiau aprašyto IFN- β 2 atveju, į nukleorūgštį, turinčią šio išradimo polipeptidą koduojančią nukleotidų seką, gali įeiti tik koduojanti seka, koduojanti seka ir papildomos koduojančios sekos (pvz. sekos, koduojančios lyderinį, sekrecinį, tikslinį, fermentinį, fluorescuojantį arba kitokį diagnostinį peptidus), koduojančios sekos ir nekoduojančios sekos, pvz. netransliuojamos sekos 5'- arba 3'-gale arba pasiskirstę koduojančioje sekoje, pvz. intronai. Nukleorūgštis, apimanti nukleotidų seką, koduojančią polipeptidą be pertraukimų, reiškia, kad nukleotidų seka turi IFN- β 2 aminorūgštis koduojančią seką, neturinčią nekoduojančių nukleotidų, pertraukiančių arba įsiterpiančių į koduojančią seką, t.y. neturi introno(-ų). Tokia nukleotidų seka gali būti aprašyta kaip susiliečianti seka. Genominė DNR, koduojanti žmogaus, pelės arba kitų žinduolių interferonus ir t.t., gali būti gaunama įprastu būdu.

Šio išradimo nukleorūgštis taip pat gali turėti ekspresijos kontrolės seką, veiksmingai prijungtą prie nukleorūgšties, kaip aprašyta aukščiau. Išsireiškimas "ekspresijos kontrolės seka" reiškia nukleorūgštis seka, kuri reguliuoja polipeptido, koduojamo nukleorūgšties, prie kurios ji yra veiksmingai prijungta, ekspresiją. Ekspresija gali būti reguliuojama iRNR arba polipeptido lygmenyje. Taigi, ekspresijos kontrolės seka apima su iRNR susijusius elementus ir su baltymu susijusius elementus. Tokiais elementais

yra promotoriai, stiprintuvai (virusiniai arba ląsteliniai), ribosomas jungiančios sekos, transkripcijos baigmės sekos ir t.t. Ekspresijos kontrolės seka yra veiksmingai prijungta prie nukleotidinės koduojančios sekos, kai ekspresijos kontrolės seka yra įvesta į tokią padėtį ir tokiu būdu, kad veiktų arba leistų gauti koduojančios sekos ekspresiją. Pavyzdžiui, kai promotorius yra prijungtas 5' prie koduojančios sekos, koduojančios sekos ekspresiją valdo promotorius. Ekspresijos kontrolės seka gali būti heterologinė arba endogeninė normaliam genui.

Šio išradimo nukleorūgštis gali būti pasirinkta remiantis nukleorūgščių hibridizacija. Dviejų viengrandinių nukleorūgščių preparatų sugebėjimas tarpusavyje hibridizuotis yra jų nukleotidų sekos komplementarumo, pvz. bazių susiporavimo tarp nukleotidų, tokių kaip A-T, G-C ir t.t., matas. Išradimas taip pat yra susijęs su nukleorūgštimis ir jų komplementais, kurie hibridizuojasi su nukleorūgštimi, turinčia fig. 1 pateiktą nukleotidų seką. Su pastarąja seka besihibridizuojanti nukleotidų seka turės komplementarią nukleorūgšties grandinę arba veiks kaip jos matrica esant polimerazės (t.y. tinkamą nukleorūgštį sintezuojančio fermento). Šis išradimas apima abi nukleorūgšties grandines, pvz. prasminę grandinę ir antiprasminę grandinę.

Gali būti pasirinktos hibridizacijos sąlygos, kad būtų atrenkamos nukleorūgštys, kurios turi norimą kiekį nukleotido komplementarumo fig.1 parodytai nukleotidų sekai. Geriau, kai su tokia seka galinti hibridizuotis nukleorūgštis turi, pvz., maždaug 85 %, dar geriau – 90 %, 92 %, o dar geriau – 95 %, 97 % arba 100 % komplementarumą tarp sekų. Šis išradimas ypatingai yra susijęs su nukleorūgščių sekomis, kurios hibridizuojasi su fig.1 parodyta nukleotidų seka nelabai arba labai griežtomis sąlygomis.

Nukleorūgštys, kurios hibridizuojasi su IFN- β 2 sekomis, gali būti pasirinktos įvairiais būdais. Pavyzdžiui, blotai (t.y. nukleorūgščių turinčios matricos), išdėstyti fragmentai ir kitos dominančių nukleorūgščių turinčios matricos gali būti inkubuojamos priešhibridizaciniame tirpale (6X SSC, 0,5 % SDS, 100 μ g/ml denatūruotos lašišos spermos DNR, 5X Denhardt'o tirpalo ir 50 % formamido) 30 °C temperatūroje per naktį, po to hibridizuojama su detektuojamų oligonukleotidų mėginiu (žr. toliau) hibridizacijos tirpale (pvz., 6X SSC, 0,5 % SDS, 100 μ g/ml denatūruotos lašišos spermos DNR ir 50 %

formamido) 42 °C temperatūroje per naktį pagal žinomas metodikas. Blotai gali būti plaunami griežtomis sąlygomis, kurios leidžia, pvz., mažesnę nei 5 % bp neatitikimą (pvz., plaunama du kartus 0,1X SSC ir 0,1 SDS 30 min. 65 °C temperatūroje), t.y. atrenkant sekas, turinčias 95 % arba didesnę sekų identiškumą. Kitas išradimo neapribojantis didelio griežtumo sąlygų pavyzdys yra plovimas 65 °C temperatūroje vandeniniu buferiu, turinčiu 30 mM NaCl ir 0,5 % SDS. Kitas didelio griežtumo sąlygų pavyzdys yra hibridizacija 7 % SDS, 0,5 M NaPO₄, pH 7, 1 mM EDTA 50 °C temperatūroje, pvz. per naktį, po to plaunant vieną arba du kartus 1 % SDS tirpalu 42 °C temperatūroje.

Tuo tarpu, kai didelio griežtumo plovimas gali duoti mažesnę nei 5 % porų neatitikimą, plovimas susilpnintomis arba švelniomis sąlygomis (pvz., plovimas du kartus 0,2x SSC ir 0,5 % SDS 30 min. 37 °C temperatūroje) gali duoti iki 20 % bazių porų neatitikimo. Kitas išradimo neapribojantis švelnių plovimo sąlygų pavyzdys yra galutinis plovimas 42 °C temperatūroje buferiu, turinčiu 30 mM NaCl ir 0,5 % SDS. Plovimas ir hibridizacija taip pat gali būti vykdomi kaip aprašyta Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 1989, Chapter 9.

Hibridizacija taip pat gali būti paremta hibrido, sudaryto tarp mėginio ir jo taikinio, lydymosi temperatūros (T_m) skaičiavimais, kaip aprašyta Sambrook et al. Paprastai T_m, kurioje trumpas oligonukleotidas (turintis 18 nukleotidų arba mažiau) atsilydys nuo jo tikslinės sekos, yra aprašoma tokia lygtimi: $T_m = (A \text{ ir } T \text{ skaičius}) \times 2 \text{ }^{\circ}\text{C} + (C \text{ ir } G \text{ skaičius}) \times 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Ilgesnėms molekulėms $T_m = 81,5 + 16,6 \log_{10}[\text{Na}^+] + 0,41 (\%GC) - 600/N$, kur [Na⁺] yra natrio jonų molinė koncentracija, %GC yra GC bazių porų procentas mėginyje, o N yra ilgis. Hibridizacija gali būti vykdoma esant keliems laipsniams žemiau šios temperatūros, norint nužtikrinti, kad mėginys ir taikiny s hibridizuotųsi. Daugiau neatitikimų galima gauti dar labiau mažinant temperatūrą.

Griežtos sąlygos gali būti pasirinktos, jeigu norima išskirti sekas ir jų komplementus, kurios turi, pvz., mažiausiai 95 %, 97 %, 98 %, 99 % nukleotidų komplementarumo tarp mėginio (pvz., IFN-β2 oligonukleotido) ir tikslinės nukleorūgšties.

Pagal šį išradimą, nukleorūgštis arba polipeptidas gali turėti vieną arba daugiau skirtumų fig.1 ir 2 parodytose nukleotidų arba aminorūgščių sekose.

Pokyčiai arba modifikacijos nukleotidų ir/arba aminorūgščių sekoje gali būti gaunami bet koku prieinamu metodu, įskaitant kryptingą arba atsitiktinę mutagenezę.

Pagal šį išradimą, žinduolio IFN- β 2, tokį kaip žmogaus IFN- β 2, koduojanti nukleorūgštis apima nukleotidus, kurie atsiranda gamtiniame gene, pvz., natūralusis polimorfizmas, normalios ir mutuotos alelės (nukleotidų arba aminorūgščių), mutacijos, kurios yra atrastos natūralioje žinduolių, tokių kaip žmonės, beždžionės, kiaulės, pelės, žiurkės arba triušiai, populiacijoje. Terminas "natūralus" reiškia, kad nukleorūgštis yra gaunama iš gamtinio šaltinio, pvz. gyvūno audinio arba ląstelių, kūno skysčių, audinių kultūrų ląstelių, teisminių mėginių. Natūraliai atsirandančios mutacijos gali būti nukleotidų sekos delecijos (pvz., nukirpti amino- arba karboksi-galai), pakeitimai, inversijos arba intarpai. Šie genai gali būti aptinkami ir išskiriami, panaudojant nukleorūgšties hibridizaciją būdais, kurie turėtų būti žinomi specialistams. Šio išradimo žinduolio IFN- β 2 koduojanti nukleotidų seka gali turėti kodonus, randamus gamtiniame gene, transkriptus arba kDNR, pavyzdžiui, tokius kaip parodyta fig.1, arba ji gali turėti išsigimusius kodonus, koduojančius tas pačias aminorūgščių sekas. Pavyzdžiui, būtų pageidautina pakeisti sekos kodonus, norint optimizuoti seką ekspresijai norimame šeimininke.

Šio išradimo nukleorūgštis gali apimti, pvz., DNR, RNR, sintetinę nukleorūgštį, peptidinę nukleorūgštį, modifikuotus nukleotidus arba mišinius. DNR gali būti dvigubos grandinės arba vienos grandinės. Nukleorūgštį sudarantys nukleotidai gali būti sujungti įvairiomis žinomomis jungtimis, pvz., esterio, sulfamato, sulfamido, fosfortioato, fosforamidato, metilfosfonato, karbamato ir t.t., priklausomai nuo norimo tikslo, pvz. atsparumas nukleazėms, tokioms kaip RNAzė H, pagerintas stabilumas in vivo ir t.t. Žr. pvz., U.S. Pat. No. 5,378,825.

Nukleorūgštyse gali būti padarytos įvairios modifikacijos, tokios, kaip detektuojamų žymių (avidino, biotino, radioaktyviųjų elementų), liekanų, kurios pagerina hibridizaciją, detekciją arba stabilumą, prijungimas. Nukleorūgštys taip pat gali būti prijungtos prie kieto pagrindo, pvz., nitroceliuliozės, magnetinių arba paramagnetinių mikrorutuliukų (pvz. kaip aprašyta U.S. Pat.

No. 5,411,863; U.S. Pat. No. 5,543,289; pavyzdžiui, turinčių feromagnetiko, supermagnetiko, paramagnetiko, superparamagnetiko, geležies oksido ir polisacharido), neilono, agarozės, diazotintos celiuliozės, lateksinių kietų mikrorutuliukų, poliakrilamidų ir t.t. norimu būdu. Žr. pvz. U.S. Pat. Nos. 5,470,967; 5,476,925; 5,478,893.

Kitas šio išradimo aspektas yra susijęs su oligonukleotidiniais arba nukleorūgščių zondais. Tokie oligonukleotidiniai arba nukleorūgščių zondai gali būti naudojami, pavyzdžiui, žinduolio IFN- β 2 nukleorūgščiai detektuoti, jos kiekiui nustatyti mėginyje arba išskirti iš mėginio, arba IFN- β 2 homologams identifikuoti. Tinkamiausiame įgyvendinimo variante nukleorūgštys gali būti naudojamos kaip oligonukleotidiniai zondai, pvz. PGS, diferenciniame išdėstyme, genų čipsams (pvz. Affymetrix GeneChips; U.S. Pat. No. 5,143,854; U.S. Pat. No. 5,424,186; U.S. Pat. no. 5,874,219; PCT WO 92/10092; {CT WO 90/15070) ir kituose prieinamuose metoduose. Detektavimas gali būti pageidautinas daugeliui įvairiausių tikslų, įskaitant tyrimus, diagnostiką ir teismo praktiką. Diagnostikos tikslams gali būti pageidautina nustatyti nukleorūgšties sekos buvimą mėginyje arba jos kiekį, kai mėginys yra gautas iš audinio, ląstelių, kūno skysčių ir t.t. Tinkamiausiame įgyvendinimo variante šis išradimas yra susijęs su nukleorūgšties detektavimo būdu, apimančiu tikslinės nukleorūgšties sąlytį tiriamajame mėginyje su oligonukleotidu sąlygomis, kuriose galima pasiekti hibridizaciją tarp tikslinės nukleorūgšties ir oligonukleotido, ir hibridizacijos nustatymą. Pagal šį išradimą oligonukleotidas taip pat gali būti naudojamas sintetinėje aminorūgščių amplifikacijoje, tokioje kaip PGS (pvz., Saiki et al., *Science*, 241:53, 1988; U.S. Pat. No. 4,683,202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, New York, 1990); diferenciniame išdėstyme (žr.pvz., Liang et al., *Nuc. Acids Res.*, 21:3269-3275, 1993; U.S. Pat. No. 5,599,672; WO 97/18454); linijinėje PGS arba kituose amplifikacijos metoduose.

Detektuoti galima derinyje su oligonukleotidais kitiems genams, pvz. genams, susijusiems su signalo perdavimu, augimu, vėžiu, apoptoze, arba bet kokiais aukščiau arba žemiau paminėtais genais. Oligonukleotidai taip pat gali būti naudojami mutacijoms nustatyti, pvz. naudojant neatitinkančios DNR

pataisymo technologiją, kaip aprašyta U.S. Pat. No. 5,683,877; U.S. Pat. No. 5,656,430; Wu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:8779-8783, 1992.

Šio išradimo oligonukleotidai gali turėti bet kokią nepertraukiamą fig. 1 parodytą nukleotidų seką arba jos komplementą, arba bet kurią iš aukščiau minėtų sekų arba jų komplementų. Tokie oligonukleotidai (nukleorūgštys) pagal šį išradimą gali būti bet kokio norimo ilgio, pvz. apie 10-200 nukleotidų, 12-100, 12-50, 12-25, 14-16, mažiausiai apie 15, mažiausiai apie 20, mažiausiai apie 25, mažiausiai apie 30 ir t.t. Tokiuose oligonukleotiduose gali būti negamtinių nukleotidų, pvz., inozino, AZT, 3TC ir t.t. Oligonukleotidai gali turėti 100 % identiškumą arba komplementarumą fig.1 parodytai sekai, arba jie gali turėti neatitinkančių viena kitą bazių porų arba pakeistų nukleotidų, pvz., 1, 2, 3, 4 arba 5 pakeistus nukleotidus. Pagal šį išradimą, oligonukleotidas gali būti rinkinyje, į kurį įeina ir norimas buferis (pvz., fosfatas, Tris ir t.t.), detektavimo kompozicijos ir t.t. Oligonukleotidas gali būti žymėtas radioaktyvia žyme arba nežymėtas, kas yra žinoma specialistams.

Kitas šio išradimo aspektas yra nukleotidų seka, kuri yra unikali žinduolio IFN- β 2. Unikalia IFN- β 2 seka laikoma apibrėžta nukleotidų seka, kuri atsiranda IFN- β 2, t.y. fig. 1 parodytos sekos, bet retais arba nedažniais atvejais kitos nukleorūgštys, ypačingai ne gyvūnų nukleorūgštys; geriausia yra žinduolių, tokių kaip žmogus, žiurkė, pelė ir t.t. nukleorūgštys. Unikalių nukleotidų sekų apima sekos arba jų komplementus, koduojančias aminorūgštis KHFFGTV, IIFQQRQV, KSLSP, FRANI, AEKLSGT, CLFFVFS ir QGRPLNDMKQELTTEFRSPR ir jų fragmentus, kaip parodyta fig.1. Tokios sekos gali būti naudojamos kaip zondai bet kuriame iš čia aprašytų metodų arba duotų literatūros šaltiniuose. Čia įeina ir prasminės, ir antiprasminės nukleotidų sekos. Unikali nukleorūgštis pagal šį išradimą gali būti nustatyta įprastu būdu. Tokią unikalią seką turinti nukleorūgštis gali būti naudojama kaip hibridizacijos zondas, pvz., žmogaus arba pelės IFN- β 2 buvimui nustatyti nukleorūgščių mišinį turinčiame mėginyje, pvz. Northern blote. Hibridizacija gali būti vykdoma labai griežtomis sąlygomis (žr. aukščiau) nukleorūgštims (ir jų komplementams, kurie turi koduojančią seką), turinčioms mažiausiai 95 % identiškumą (t.y. komplementarumą) su mėginiu, atrinkti, bet taip pat gali būti naudojamos ir mažiau griežtos sąlygos. Unikali IFN- β 2 nukleotidų seka gali

taip pat būti sulieta rėmelyje bet kuriame iš jo 5' arba 3' galų su įvairiomis patente paminėtomis nukleotidų sekomis, įskaitant kitų IFN- β 2 dalių koduojančias sekas, fermentus, GFP ir t.t., ekspresijos kontrolines sekas ir t.t.

Kaip jau minėta, hibridizacija gali būti vykdoma įvairiomis sąlygomis, priklausomai nuo norimo selektyvumo, pvz. kaip aprašyta Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 1989. Pavyzdžiui, šio išradimo konkrečiam IFN- β 2 aptikti oligonukleotidas gali būti hibridizuojamas su tiksline nukleorūgštimi sąlygomis, kuriomis oligonukleotidas hibridizuojasi tik su ja, pvz., kur oligonukleotidas yra 100 % komplementarus tikslinei nukleorūgščiai. Skirtingos sąlygos gali būti naudojamos tada, jei norima atrinkti nukleorūgštis, kurios turi mažesnį nei 100 % nukleotidų komplementarumą, mažiausiai apie, pvz., 99 %, 97 %, 96 %, 90 %, 86,4 %, 85 %, 70 %, 67 %.

Antiprasminė nukleorūgštis gali būti pagaminta iš šio išradimo nukleorūgšties, geriausia antiprasminė fig.1 duotai sekai. Antiprasminė nukleorūgštis gali būti naudojama įvairiuose būduose, tokiuose kaip IFN- β 2 ekspresijai reguliuoti arba moduluoti, pvz. jai inhibuoti, jos ekspresijai aptikti arba hibridizacijai in situ. Šie oligonukleotidai gali būti naudojami analogiškai U.S. Pat. No. 5,576,208. IFN- β 2 ekspresijos reguliavimo arba moduliavimo tikslams antiprasminis oligonukleotidas gali būti veiksmingai prijungtas prie ekspresijos kontrolės sekos.

IFN- β 2 inhibavimui oligonukleotidas gali būti skirtas atitinkamai prasminei pozicijai kDNR. Žr., pvz., J. Milligan et al., *Current Concepts in Antisense Drug Design*, *J. Med. Chem.* 36(14): 1923-1937, 1993; Helene and Toulme, *Biochim. Biophys. Acta*, 1049:99-125, 1990; Cohen, J.S., Ed., *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press: Boca Raton, Fla., 1987; Crooke, S., *Basic Principles of Antisense Therapeutics*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Jul. 1998. Tokie oligonukleotidai gali būti padaryti atspariais nukleazėms, pvz. naudojant chemines jungtis, aprašytas U.S. Pat. No. 6,040,296 arba aukščiau minėtuose literatūros šaltiniuose. Ląstelių kultūrose gali būti naudojami bendro maždaug 35 bp ilgio nukleotidai su katijoninėmis liposomomis jų įsisavinimui ląstelėse pagerinti, bet naudojimui in vivo geriausia skirti trumpesnius oligonukleotidus, pvz. 25 bp oligonukleotidus.

Šio išradimo nukleorūgštis gali būti žymėta bet koku norimu metodu. Nukleorūgštis gali būti žymėta naudojant radioaktyvias žymes, tokias kaip ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^3H arba ^{14}C , paminint keletą dažniausiai naudojamų žymių. Radioaktyvusis žymėjimas gali būti vykdomas bet koku metodu, kaip antai galinis žymėjimas 3' arba 5' gale, naudojant radiožymėtą nukleotidą, polinukleotidkinazę (su defosforiliniu fosfataze arba be jo) arba ligazę (priklausomai nuo norimo pažymėti galo). Taip pat gali būti naudojamas neradioaktyvus žymėjimas, sujungiant šio išradimo nukleorūgštį su imunologinių savybių turinčiomis liekanomis (antigenais, haptenais), suteikiant specifinį aktyvumą tam tikriems reagentams (ligandams), savybes, suteikiančias galimybę vykdyti detektuojamas fermentines reakcijas (fermentus arba kofermentus, fermentų substratus arba kitas medžiagas, dalyvaujančias fermentinėse reakcijose) arba charakteringas fizikines savybes, tokias kaip fluorescencija arba norimo bangos ilgio šviesos emisija arba sugertis, ir t.t.

Šio išradimo nukleorūgštis, įskaitant oligonukleotidus, antiprasminę nukleorūgštį ir t.t., gali būti naudojama IFN- β 2 ekspresijai aptikti ištisuose organuose, audiniuose, ląstelėse ir t.t., panaudojant įvairias metodikas, įskaitant Northern'o blotinę, PGS, in situ hibridizaciją, diferencinę išdėstymą, nukleorūgščių eilutes (pvz. "genų čipsus"), taškinius blotus ir t.t. Tokios nukleorūgštys gali būti ypatingai naudingos sutrikusiai ekspresijai aptikti, pvz., būdingai ląstelėms IFN- β 2 ekspresijai ir/arba jos subląsteliniams pokyčiams. IFN- β 2 kiekiai gali būti nustatyti atskirai arba derinyje su kitais genų produktais, ypatingai kito geno produktais, dalyvaujančiais citokinų produkavime.

Šio išradimo nukleorūgštis, priklausomai nuo norimo tikslo, gali būti ekspresuojama daugybėje įvairiausių sistemų (in vitro ir in vivo). Pavyzdžiui, nukleorūgštis gali būti įterpta į ekspresijos vektorių, įvesta į norimą šeimnininką ir auginama sąlygomis, kuriose gaunama šios nukleorūgšties koduojamo polipeptido ekspresija. Efektyvios sąlygos yra bet kokios auginimo sąlygos, kurios yra tinkamos, kad šeimnininko ląstelėje būtų pasiekiamas polipeptido produkavimas, įskaitant efektyvias temperatūras, pH, terpę, priedus terpei, kurioje yra auginamos šeimnininko ląstelės (pvz., priedus, kurie didina arba

indukuoja ekspresiją, tokius kaip butiratas arba metotreksatas, jeigu koduojanti nukleorūgštis yra greta dhfr geno), cikloheksimidą, ląstelių tankius, auginimo lėkštes ir t.t. Nukleorūgštis gali būti įvesta į ląstelę efektyviu metodu, įskaitant, pvz., DNR apnuoginimą, nusodinimą kalcio fosfatu, elektroporaciją, injekciją, DEAE-dekstrano tarpininkaujamą transfekciją, suliejimą su liposomomis, asociaciją su agentais, kurie padidina jų sunaudojimą ląstelėse, virusinę transfekciją. Ląstelė, į kurią buvo įvesta šio išradimo nukleorūgštis, yra transformuota šeimininko ląstelė. Ši nukleorūgštis gali būti priechromosominė arba integruota į šeimininko ląstelės chromosomą(-as). Ji gali būti stabili arba pereinama. Ekspresijos vektorius yra pasirinktas pagal jo suderinamumą su šeimininko ląstele. Šeimininko ląstelėmis yra žinduolių ląstelės, pvz. COS, CVI, BHK, CHO, HeLa, LTK, NIH 3T3, 293, PAE, žmogaus fibroblastai, žmogaus pirminės auglio ląstelės, sėklidės, neuroglija, neuronai, oligodendrocitai, astrocitai, neuroblastoma, glioma ir t.t., vabzdžių ląstelės, tokios kaip Sf9 (*S.frugipeda*) ir *Drosophila*, bakterijos, tokios kaip *E.coli*, *Streptococcus*, *Bacillus*, mielės, tokios kaip *Sacharomyces*, *S. cerevisiae*, grybų ląstelės, augalų ląstelės, embrioninės kamieninės ląstelės (pvz. žinduolio, tokio kaip pelės arba žmogaus), neuroninės kamieninės ląstelės, fibroblastai, raumenų ląstelės, širdies ląstelės ir T-ląstelės.

Ekspresijos kontrolės sekos yra panašiai pasirenkamos dėl suderinamumo su šeimininku ir norimam tikslui, pvz. dideliu kopijų skaičiumi, dideliems kiekiams, indukcijai, amplifikacijai, kontroliuojamai ekspresijai. Kitos sekos, kurios gali būti naudojamos, yra stiprinimo sekos, tokios kaip iš SV40, CMV, RSV, indukuojami promotoriai, ląstelių tipo specifiniai elementai, arba sekos, kurios duoda galimybę gauti selektyvią arba specifinę ląstelių ekspresiją. Promotoriai, kurie gali būti naudojami ekspresijai valdyti, yra pvz. endogeninis promotorius, ląstelės signalo perdavimo kelio kitų genų promotoriai, MMTV, SV40, trp, lac, tac arba T7 promotoriai bakteriniams šeimininkams; arba alfa faktorius, alkoholoksidazė arba PGH promotoriai mielėms. RNR transkriptams, tokiems kaip T7 arba SP6 gauti, gali būti naudojami RNR promotoriai. Žr. pvz. Melton et al., *Nucleic Acids Res.*, 12(8):7035-7056, 1984; Dunn and Studier, *J. Mol. Biol.*, 166:477-435, 1984; U.S. Pat. No. 5,891,639; Studier et al., *Gene Expression Technology, Methods in Enzymology*, 85:60-89, 1987.

Šio išradimo nukleorūgštis arba polipeptidas gali būti naudojami kaip dydžio markeriai nukleorūgščių arba baltymų elektroforezėje, chromatografijoje ir t.t. Apibrėžti restrikcijos fragmentai gali būti nustatomi skenuojant seką dėl restrikcijos vietų, skaičiuojant dydį ir vykdant atitinkamą restrikcinį skaldymą.

Šio išradimo IFN- β 2 polipeptidas ir nukleorūgštis gali būti "išskirti". Terminas "išskirtas" reiškia, kad jis yra tokioje formoje, kurioje jis nėra randamas jo pradinėje aplinkoje arba gamtoje, pvz., labiau koncentruotas, labiau išgrynintas, atskirtas nuo komponentų, esantis ląstelės, kurioje ekspresuojamas IFN- β 2 heterologinis genas, lizate. Kai IFN- β 2 yra ekspresuojamas kaip heterologinė nukleorūgštis transfekuotų ląstelių linijoje, šio išradimo nukleorūgštis yra įvedama į ląstelę aukščiau aprašytu būdu sąlygomis, kuriose yra ekspresuojama ši nukleorūgštis. Terminas "heterologinis" reiškia, kad nukleorūgštis buvo įvesta į ląstelių liniją "rankiniu" būdu. Nukleorūgšties įvedimas į ląstelių liniją yra aprašytas aukščiau. Transfekuota (arba transformuota) IFN- β 2 nukleorūgštį ekspresuojanti ląstelė gali būti lizuota kaip aprašyta pavyzdžiuose ir naudojama išradimo būde kaip lizatas (t.y. "išskirta") arba gali būti naudojama nepaliesta ląstelių linija.

Paprastai terminas "efektyvios sąlygos" reiškia, pvz. terpę, kurioje yra pasiekiamas norimas efektas. Tokia terpė yra, pvz., buferiai, oksidavimo agentai, redukcijos agentai, pH, kofaktoriai, temperatūra, jonų koncentracijos, tinkamas ląstelės amžius ir/arba fazė (tokia kaip konkreti ląstelės ciklo dalis arba konkreti fazė, kurioje ekspresuojami tam tikri genai), kurioje buvo naudojamos ląstelės, auginimo sąlygos (įskaitant substratą, deguonį, anglies dioksidą ir t.t.).

Šis išradimas taip pat yra susijęs su nukleorūgšties, koduojančios šio išradimo IFN- β 2, moduliavimo, geriausia inhibavimo, būdu, apimančiu: šio išradimo IFN- β 2 ekspresuojančios ląstelės suleidimą į kontaktą su tokiu kiekiu agento, tokio kaip antiprasminis oligonukleotidas arba antiprasminė IFN- β 2 RNR, kuris veiksmingai inhibuoja sekai specifiską minėtos nukleorūgšties ekspresiją.

Nukleorūgšties sekai specifinis inhibavimas paprastai gali būti vykdomas naudojant antiprasminę nukleorūgštį, tokią kaip antiprasminiai

oligonukleotidai arba RNR. Pavyzdžiui, gali būti sukurti antiprasminiai oligonukleotidai, tokie kaip fosfodiesteriniai arba fosforotioatiniai dezoksioligonukleotidai specifinėms IFN- β 2 RNR sritims, tokioms kaip translacijos iniciacijos vieta, ir po to gali būti įvesti į šiuos genus ekspresuojančias ląsteles tokiais kiekiais, kurie efektyviai inhibuoja jų ekspresiją. Paprastai antiprasminė nukleorūgštis yra nukleorūgštis, kuri yra komplementari prasminei arba koduojančiai duotos nukleorūgšties grandinei ir tokiu būdu taip pat yra komplementari ir todėl gali specifiškai hibridizuotis su šios nukleorūgšties iDNR transkriptais. Tinkamiausi antiprasminiai oligonukleotidai apima tikslinio geno 5' sritį, ypatingai iniciacijos kodoną turinčią sritį.

Norint padidinti stabilumą, įvedama nukleorūgštis gali būti modifikuojama, pvz., padaryta atspari ląstelės fermentams, oksidacijai, redukcijai, nukleazėms ir t.t., arba padidinamas jos patekimas į ląsteles. Gali būti naudojamos bet kokios tinkamos modifikacijos, įskaitant pvz., fosforotioatus, metilfosfonatus, fosfodiesterinį oligonukleotidą, prijungtą prie akridiną įterpiančio agento ir/arba hidrofobinės uodegos, psoraleno darinius, 2'-ribozės modifikacijas, pentozės cukraus darinius, azoto bazių darinius ir t.t. Apie antiprasminius oligonukleotidus, modifikacijas ir t.t., kurie gali būti naudojami šiame išradime, žr., pvz., U.S. Pat. No. 5,576,208, 5,744,362, 6,040,296 ir 6,046,319. Bendru atveju, patekimui į ląstelę ir/arba stabilumui padidinti šio išradimo antiprasminė nukleorūgštis gali apimti gamtinių nukleotidų, negamtinių nukleotidų monomerus ir jų derinius.

Antiprasminiai dariniai gali būti įvedami kaip plikos nukleorūgštys, kompleksuotos su kitais agentais arba įkapsuliuotos į juos, kas palengvia jų patekimą į ląstelę, įleidžiant į ląsteles arba bet kokiais tinkamais įvedimo būdais.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su šio išradimo IFN- β 2, tokio kaip žmogaus IFN- β 2, panaudojimo būdais gydymui būklių, sutrikimų, ligų ir t.t., kuriuose yra pageidaujamas IFN- β 2 aktyvumas. Tokie būdai apima šio išradimo IFN- β 2 efektyvaus kiekio skyrimą gydymo reikalingam šeimininkui vienam arba keletui tokių tikslų: antionkogeniniam reguliavimui, priešvėžiniam aktyvumui, priešvirusiniam aktyvumui, ląstelių augimo inhibavimui arba

augimo slopinimui, antiproliferacijai (pvz. IFN- β 2 kiekiai, kurie veiksmingai inhibuoja astrocitų proliferaciją), limfocitų citotoksiškumo sustiprinimui, imunoreguliaciniam aktyvumui, tikslinių ląstelių diferenciacijos indukavimui arba inhibavimui, makrofagų aktyvacijai, onkogenų negatyviajai reguliacijai ir t.t.; imunologiniams efektams, tokiems kaip antikūnų susidarymo sumažinimui, ląstelės membranos komponentų padidinimui (didysis histosuderinamumo kompleksas, Fc receptoriai, β 2-mikroglobulinas), ląstelių tarpininkaujamo imuniškumo moduliavimui, citokinų (pvz. interleukino) produkcijos padidinimui, citotoksinių T ląstelių efektų padidinimui, makrofagų efektų padidinimui ir natūralaus sunaikinimo padidinimui. IFN- β 2, pvz., gali būti skiriamas vėžio, autoimuninių sutrikimų ir virusinių infekcijų gydymui. [vairius sutrikimus, kurie gali būti gydomi šio išradimo IFN- β 2, žr. pvz., Cirelli and Tying, *Clin. Immunobother*, 3:27-87, 1995 ypatingai žr. alfa- ir beta-interferonų panaudojimo atvejus.

IFN- β 2 gali būti vartojamas kaip polipeptidas arba jis gali būti vartojamas kaip nukleorūgštis, pvz. genų terapijoje. Kai jis skiriamas nukleorūgšties pavidalu, jis gali būti pateikiamas bet kokia forma, kuri yra efektyvi ekspresijai gauti, pvz. kaip plika DNR, kaip vektorius (toks kaip virusinis vektorius, pvz. adenovirusas), sukomponuota liposomose arba kituose nešikliuose, mikropūslelėse ir t.t. Daugiau informacijos apie nukleorūgščių vartojimą, jų ekspresiją šeimininke ir t.t. žr. aukščiau.

Pagal šį išradimą gali būti gydoma bet kokia vėžio forma, pvz., kaklo intraepitelinė neoplazija ir kaklo vėžys (apie dozes, vartojimo būdus, režimus ir t.t. žr., pvz., DePalo et al., *Int. J. Tissue React.*, 6:523-527, 1984), melanoma ir metastazinė melanoma (apie dozes, vartojimo būdus, režimus ir t.t. žr., pvz., Beiteke et al., *Hautarzt*, 44:365-371, 1994), plaukuotųjų ląstelių leukemija, Kaposi sarkoma, pamatinių ląstelių karcinoma, žvyninių suragėjusių ląstelių karcinoma, inkstų ląstelių karcinoma, karcinoidiniai augliai, odos T ląstelių limfoma, ne-Hodžkino limfoma (apie kitas vėžio formas taip pat žr. Dorr, *Drugs*, 45(2):177-211, 1993).

Pagal šį išradimą taip pat gali būti gydomos autoimuninės ligos, pvz. išsėtinė sklerozė (apie dozes, vartojimo būdus, režimus ir t.t. žr., pvz., Yong et al., *Neurology*, 51:682-689, 1998), reumatinis artritas ir t.t. Išsėtinė sklerozė

(“MS”) yra autoimuninė liga, kuri patologiškai yra apibūdinama perivaskuliariniu ir periventrikuliniu uždegimu, sukeliančiu demielinimą, aksonų destruktiją ir po jos einančią gliozę. Chroniškų MS pažeidimų požymis yra demielinintos gliozinės plokštelės, susidariusios dėl vietinės astrocitų hipertrofijos ir hiperplazijos. Šios astocitinės plokštelės trukdo normaliam aksonų laidumui ir sudaro fizinį barjerą remielinimui. Todėl faktoriai, kurie inhibuoja astroцитus, yra naudingi terapijoje, ypač pradinėse ligos stadijose. Taigi IFN- β 2 sugebėjimas inhibuoti astroцитus yra ypač naudingas gydant MS.

Pagal šį išradimą taip pat gali būti gydomos virusinės ligos ir infekcijos, pvz. žmogaus papilomos virusas (apie dozes, vartojimo būdus, režimus ir t.t. žr., pvz., Puligheddu et al., *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, 9:161-162, 1988; Costa et al., *Cervix*, 6:203-212, 1988), smailagalė kondiloma (apie dozes, vartojimo būdus, režimus ir t.t. žr. Schonfeld et al., *Lancet*, 1:1038-1042, 1984), hepatitas B, C ir D, ŽIV ir t.t.

Terminas “įvedimas” reiškia, kad IFN- β 2 arba kitas veiklusis agentas yra paduodamas į taikinį, pvz., auglį, imuninę sistemą, smegenų pažeidimus (pvz. smegenų uždegimo vietą, tokią kaip išsėtinės sklerozės arba kitos smegenų uždegiminės būklės atveju stebimas vietas) ir t.t. IFN- β 2 gali būti paduodamas į bet kokį taikinį (pvz. in vivo, in vitro arba in situ), įskaitant ląsteles kultūroje ir pažeidimą, būklę arba ligą, kuriuos reikia gydyti, turinčius šeiminkus efektyviu būdu, tinkančiu aukščiau aprašytam poveikiui pasiekti, pvz. IFN- β 2 kompozicija gali būti suleidžiama tiesiai į taikinio vietą arba netoli jos. Ji taip pat gali būti įvedama vietiniu, enteriniu, parenteriniu, intraveniniu, intraraumeniniu, poodiniu, peroraliniu, nosiniu būdu, įvedama į smegenis, intraventrikuliniu būdu ir t.t., pvz. priklausomai nuo gydomos vietos padėties. IFN- β 2 taip pat gali būti įvedamas kaip nukleorūgštis ląstelėms sugerti. Nukleorūgšties įvedimo būdai apima aukščiau išvardintus būdus ir kitas įprastas šioje srityje metodikas.

Į taikinį įvedamas efektyvus IFN- β 2 kiekis. Efektyvūs kiekiai yra tokie kiekiai, kurie yra naudojami norimam efektui, pageidautina naudingam arba terapiniam efektui, pasiekti, pvz. kiekis, reikalingas astroцитų proliferacijai inhibuoti. Toks kiekis gali būti nustatomas įprastu būdu, pvz. atliekant dozės-

atsako eksperimentą, kuriame į taikinio ląsteles yra įvedamos kintamos dozės, nustatant efektyvų kiekį norimam tikslui pasiekti, pvz., priešvirusiniam efektui gauti, imunomoduliaciniam efektui gauti. Kiekiai gali būti parinkti remiantis įvairiais faktoriais, įskaitant aplinką, į kurią yra įvedamas IFN- β 2 (pvz. pacientas su išsėtine skleroze, gyvūnų modelis, audinio kultūros ląstelės ir t.t.), gydomų ląstelių vietą, paciento arba gydomo gyvūno amžių, sveikatos stovį, lytį ir masę, ir t.t. Tinkamais kiekiais yra, pvz. 1,6 MIU (milijonas tarptautinių vienetų pagal tarptautinį etaloninį standartą) ir 8 MIU, įvedant po oda kas kelintą dieną. Terminas "gydymas" reiškia bet kokią poveikį, kuris duoda būklės, ligos, sutrikimo ir t.t. pagerėjimą.

Efektyvus IFN- β 2 kiekis gali būti vartojamas su kitais veikliaisiais agentais, pvz. agentais vėžiui, virusams, MS, hepatitui ir kitoms būklėms, kurios gali būti gydomos IFN- β 2, gydyti. Tokiais agentais gali būti citotoksinis, priešvirusinis agentas, chemoterapinis agentas ir t.t.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su antikūnais, kurie specifiskai atpažįsta šio išradimo IFN- β 2. IFN- β 2 specifinis antikūnas reiškia, kad antikūnas atpažįsta apibrėžtas aminorūgščių sekas IFN- β 2 arba turinčias IFN- β 2, pvz. fig.2 parodytą seką. Taigi, specifinis antikūnas paprastai rišis su didesne trauka su aminorūgšties seka, t.y. su fig.2 randamu epitopu, nei su kitokiu epitopu(-ais), pvz. kaip nustatyta ir/arba išmatuota imunoblotų testu arba kitu įprastu imunotestu. Taigi, antikūnas, kuris yra specifinis žmogaus IFN- β 2 epitopui, tinka šio epitopo buvimui mėginyje, pvz. mėginyje audinio, turinčio žmogaus IFN- β 2 geno produktą, nustatyti, atskiriant jį nuo mėginių, kuriuose nėra tokio epitopo. Tinkamas antikūnas yra antikūnas unikaliam C-galiniam IFN- β 2, pvz. QGRPLNDMKQBLTTEFRSPR arba jo fragmentui. Tokie antikūnai yra naudingi, kaip aprašyta Santa Cruz Biotechnology, Inc., Research Product Catalog, ir gali būti atitinkamai sukomponuojami.

Antikūnai, pvz., polikloniniai, monokloniniai, rekombinantiniai, chimeriniai, humanizuoti, gali būti pagaminami bet koku norimu metodu. Žr. taip pat rekombinantinių imunoglobulinų bibliotekų skryningą (pvz., Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:3833-3837, 1989; Huse et al., *Science*, 256:1275-1281, 1989); limfocitų populiacijos stimuliavimą in vitro; Winter and Milstein, *Nature*, 349:293-299, 1991. Pavyzdžiui, monokloniniams antikūnams

pagaminti fig.2 parodytas polipeptidas gali būti įvedamas pelėms, ožkoms arba triušiams po oda ir/arba į pilvaplėvę su adjuvantu arba be jo, imant tokį kiekį, kad būtų išgaunamas imuninis atsakas. Antikūnai gali būti viengandininiai arba Fab fragmentai. Antikūnai gali būti IgM, IgG, subtipai, IgG2a, IgG1 ir t.t. Antikūnai ir imuniniai atsakai taip pat gali būti gaminami įvedant pliką DNR. Žr. pvz., U.S. Pat. Nos. 5,703,055; 5,589,466; 5,580,859.

Antikūnų indukcijai nereikia, kad interferonas arba jo fragmentai turėtų bioaktyvumą; tačiau jie turi turėti imunogeninį aktyvumą arba vieni, arba derinyje su nešikliu. Peptidai, skirti panaudoti IFN- β 2 specifiniams antikūnams indukuoti, gali turėti aminorūgščių seką, susidedančią iš mažiausiai 5 aminorūgščių, geriausia – mažiausiai 10 aminorūgščių. Trumpos aminorūgščių grandinės, pvz. penkios aminorūgštys, gali būti sujungtos su kito baltymo grandine, kaip antai sraigės limfos hemocianinu, arba kitu tinkamu nešikliu, ir chimerinė molekulė naudojama antikūnams gaminti. Antikūnams gaminti tinkamos IFN- β 2 sritys gali būti parenkamos empyriškai arba, pvz., gali būti analizuojama išvesta iš kDNR IFN- β 2 aminorūgščių seka, nustatant didelio imunogeniškumo sritis. Tinkamų epitopų atrinkimo analizė yra aprašyta, pvz., Ausubel, F.M. et al. (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2. John Wiley & Sons).

Tam tikri IFN- β 2 antikūnai yra tinkami priešpatologinių būklių ir chroniškų arba ūmių ligų, kurioms yra būdingi IFN- β 2 kiekių skirtumai arba pasiskirstymas, diagnozavimui. Diagnostiniai IFN- β 2 testai apima būdus, kuriuose yra naudojamas antikūnas ir žymė IFN- β 2 aptikti žmogaus (arba pelės, jeigu naudojama pelė, ir t.t.) kūno skysčiuose, audiniuose arba tokių audinių ekstraktuose. Antikūnai gali būti neutralizuojami ir naudojami IFN- β 2 aktyvumo testuose, pvz., kaip kontrolės interferono aktyvumui neutralizuoti.

Šio išradimo polipeptidai gali būti naudojami modifikuoti arba nemodifikuoti. Dažniausiai polipeptidai ir antikūnai bus žymimi sujungiant juos (kovalentiškai arba nekovalentiškai) su medžiaga, kuri duoda detektuojamą signalą. Daugybė žymių ir sujungimo metodikų yra žinoma ir aprašyta mokslinėje ir patentinėje literatūroje. Tinkamos žymės yra radionuklidai, fermentai, substratai, kofaktoriai, inhibitoriai, fluorescuojantys agentai, chemiluminescuojantys agentai, magnetinės dalelės ir pan. Tarp patentų,

kuriuose aprašytas tokių žymių panaudojimas, yra U.S. Pat. Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 ir 4,366,241.

Antikūnai ir kiti ligandai, kurie susiriša su IFN- β 2, gali būti naudojami įvairiais atvejais, įskaitant terapinę, diagnostinę ir pramoninę tyrimo priemones, pvz. nustatyti interferoninio polipeptido kiekiams gyvūnuose, audiniuose, ląstelėse ir t.t., nustatyti jo lokalizacijai ir/arba pasiskirstymui ląstelėje, jo grynimui arba polipeptidui, turinčiam jo dalį, jo funkcijos moduliavimui, Western'o blotuose, ELISA, imunonuosodinime, RIA ir t.t. Šis išradimas yra susijęs su tokiais testais, kompozicijomis ir rinkiniais jiems atlikti ir t.t. Naudojant šiuos ir kitus metodus, šio išradimo antikūnas gali būti naudojamas IFN- β 2 polipeptidui arba jo fragmentams aptikti įvairiuose mėginiuose, įskaitant audinius, ląsteles, kūno skystį, kraują, šlapimą, galvos ir stuburo smegenų skystį.

Be to, ligandai, kurie rišasi su šio išradimo IFN- β 2 polipeptidu arba jo dariniais, gali būti pagaminami, pvz., naudojant sintetinių peptidų bibliotekas arba aptamerus (pvz., Pitrun et al., U.S. Pat. No. 5,143,854; Geysen et al., *J. Immunol. Methods*, 102:259-274, 1987; Scott et al., *Science*, 249:386, 1990; Blackwell et al., *Science*, 250:1104, 1990; Tuerk et al., 1990, *Science*, 249:505).

Šis išradimas taip pat yra susijęs su IFN- β 2 polipeptidu, pagamintu pageidaujamu būdu, pvz. tokiu, kaip aprašyta U.S. Pat. No. 5,434,050. Gali būti naudojamas žymėtas polipeptidas, pvz., surišimo testuose, tokiuose kaip medžiagų, kurios rišasi arba prisijungia prie IFN- β 2, identifikavimui, IFN- β 2 judėjimui ląstelėje pasekti, in vitro, in vivo arba in situ sistemoje, ir t.t.

Nukleorūgštis, polipeptidas, antikūnas, IFN- β 2 ir t.t. gali būti išskirti. Terminas "išskirtas" reiškia, kad IFN- β 2 yra formoje, kuri yra nerandama jo autentiškoje aplinkoje arba gamtoje, pvz. yra labiau koncentruotas, labiau išgrynintas, atskirtas nuo komponentų ir t.t. Išskirta nukleorūgštis yra, pvz. nukleorūgštis, turinti IFN- β 2 seką, atskirta nuo chromosominės DNR, randamos gyvame gyvūne, pvz. kaip pilnas genas, transkriptas arba kDNR. Ši nukleorūgštis gali būti dalis vektoriaus arba įterpta į chromosomą (specifiškai nutaikyta į geną arba atsitiktinai įjungta padėtyje, kitoje nei jos normali padėtis) ir dar yra išskirta ta prasme, kad ji nėra tokioje formoje, kokioje ji yra

randama jos natūralioje aplinkoje. Šio išradimo nukleorūgštis arba polipeptidas taip pat gali būti iš esmės išgryninti. "Iš esmės išgrynintas" reiškia, kad nukleorūgštis arba polipeptidas yra atskirtas ir iš esmės neturi kitų nukleorūgščių arba polipeptidų, t.y. nukleorūgštis arba polipeptidas yra pirminė ir veikioji sudedamoji dalis.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su transgeniniu gyvūnu, pvz. žinduoliu-nežmogumi, tokiu kaip pelė, turinčiu IFN- β 2. Transgeniniai gyvūnai gali būti gaunami žinomais būdais, įskaitant, pvz. rekombinantinių genų probranduolinę injekciją į 1-ląstelės embriono probranduolį, įterpiant dirbtinę mielių chromosomą į embrionines kamienines ląsteles, genų taikinio metodais, embrioninių kamieninių ląstelių metodologiją. Žr. pvz., U.S. Pat. Nos. 4,736,866; 4,873,191; 4,873,316; 5,082,779; 5,304,489; 5,174,986; 5,175,384; 5,175,385; 5,221,778; Gordon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:7380-7384, 1980; Palmiter et al., *Cell*, 41:343-345, 1985; Palmiter et al., *Annu. Rev. Genet.*, 20:465-499, 1986; Askew et al., *Mol. Cell. Biol.*, 13:4115-4124, 1993; Games et al., *Nature*, 373:523-527, 1995; Valancius and Smithies, *Mol. Cell. Biol.*, 11:1402-1408, 1991; Stacey et al., *Mol. Cell. Biol.*, 14:1009-1016, 1994; Hasty et al., *Nature*, 350:243-246, 1995; Rubinstein et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2613-2617, 1993. Šio išradimo nukleorūgštis gali būti įvesta į bet kokį žinduolį-nežmogų, įskaitant pelę (Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1986), kiaulę (Hammer et al., *Nature*, 315:343-345, 1985), avį (Hammer et al., *Nature*, 315:343-345, 1985), galviją, žiurkę arba primatą. Žr. taip pat, pvz., Church, *Trends in Biotech.*, 5:13-19, 1987; Clark et al., *Trends in Biotech.*, 5:20-24, 1987) ir DePamphilis et al., *BioTechniques*, 6:662-680, 1988). Be to, pvz. įprastas transgenines žiurkes ir peles galima gauti iš prekybininkų. Tokie transgeniniai gyvūnai gali būti tinkami gyvūnų modeliai tirti IFN- β 2, kaip maistas gyvatei, kaip genetiniai markeriai kamieno kilmei aptikti (t.y. kur buvo įterptas IFN- β 2 arba jo fragmentas) ir t.t. Tokiuose transgeniniuose gyvūnuose taip pat gali būti kitų transgenų. Transgeniniai gyvūnai gali būti gauti ir naudojami pagal bet kokį tinkamą metodą.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su žinduolio ląstele, kurioje IFN- β 2 koduojančio geno ekspresija buvo „nokautuota“ arba nutraukta. Toks geno suardymas gali būti įgyvendintas efektyviais būdais, įskaitant, pvz. antiprasminį darinį arba įvedant į jį nukleotidų seką, kuri efektyviai slopina geno ekspresiją. Šia prasme naudojamas terminas „genas“ reiškia IFN- β 2 koduojančią seką, kaip ji yra chromosomoje ir turi jo promotoriaus seką ir kitas reguliavimo sritis.

Šis išradimas yra ypatingai susijęs su žinduoliu, turinčiu vieną arba daugiau ląstelių, kuriose šio geno ekspresija yra funkciškai inaktyvuota arba nutraukta. Funkcinė inaktyvacija arba nutraukimas reiškia, pvz. bent jau dalies polipeptido, koduojamo žinduolio vienos ląstelės, pasirinktų ląstelių arba visų ląstelių endogeninio IFN- β 2 geno, ekspresijos dalinį arba pilną sumažinimą. Terminas „nokautavimas“ yra geno funkcinio inaktyvavimo sinonimas.

Viename įgyvendinimo variante yra naudojama geno taikinio strategija, kuri palengvina norimos nukleotido sekos įvedimą į IFN- β 2 geną. Pageidautina, kad geno taikinio strategijoje būtų naudojama dviguba abipusė rekombinacija ir teigiamas atrankus markeris, padedantis įterpti nukleotidų seką į tikslinę nukleorūgštį. Geriausia, kai tikslinė nukleorūgštis yra genas, dar geriau – genas konkrečioje chromosomos vietoje. Norima nukleotidų seka yra įterpiama į geną tokiu būdu, kad genas būtų funkciškai suardytas, t.y. jo ekspresija yra dalinai arba pilnai sumažinta.

Viename šio išradimo aspekte atrankiam markeriui į numatytą IFN- β 2 geno padėtį įvesti yra naudojamas tikslinis vektorius. Ši padėtis yra atranki taip, kad įvedus atrankų markerį būtų gaunamas funkcinis geno suardymas. Tokiam tikslui tinkamiausias įgyvendinimo variantas yra rekombinantinė nukleorūgšties molekulė, turinti: (1) 5' nukleotidų seką, kuri duoda galimybę gauti homologinę rekombinaciją pirmoje numatytoje žinduolio IFN- β 2 geno padėtyje, veiksmingai prijungtą prie (2) pirmosios atrankios nukleotidų sekos, suteikiančios pirmą atrankią charakteristiką ląstelei, kurioje ji yra, 5' galo ir (3) 3' nukleotidų sekos, kuri duoda galimybę gauti homologinę rekombinaciją antroje numatytoje žinduolio IFN- β 2 geno padėtyje, pvz., IFN- β 2 genas, veiksmingai prijungtas prie pirmosios atrankios nukleotidų sekos 3' galo. Ši rekombinantinė nukleorūgšties molekulė duoda galimybę gauti homologinę

rekombinaciją žinduolio chromosomos numatytoje padėtyje. Tikslinio vektoriaus fragmentai taip pat įeina į šį išradimą, pvz., rekombinantinės nukleorūgšties molekulės, turinčios (1) ir (2) elementus arba (2) ir (3) elementus ir t.t.

Terminas "rekombinantinis" reiškia, pvz., nukleorūgšties molekulę, kuri buvo modifikuota žmogaus rankomis, pvz., turinčią nukleorūgšties fragmentus iš skirtingų šaltinių arba nukleorūgšties molekulę iš vieno šaltinio, kuris buvo sukurtas genų inžinerijos būdu. Taigi, nukleorūgšties molekulė yra rekombinantinė, pvz., todėl, kad joje yra nukleotidų sekos iš žinduolio IFN- β 2 geno ir atrankaus markerio geno. Molekulė yra taip pat rekombinantinė, kai ji turi sekas iš to paties geno, bet surikiuotas tokia tvarka, kokios nėra gamtoje, t.y. yra negamtinis išsidėstymas.

Homologinė rekombinacija reiškia procesą, kuriame nukleorūgšties molekulės su panašia genetinė informacija išsirikiuoja viena greta kitos ir apsieičia nukleotidų grandinėmis. Todėl rekombinantinės nukleorūgšties, kuri gali duoti homologinę rekombinaciją numatytoje tikslinės nukleorūgšties padėtyje, nukleotidų seka lemia nukleotidų seką, kuri palengvina nukleotidų grandinių mainus tarp rekombinantinės nukleorūgšties molekulės apibrėžtoje tikslinio geno, pvz. pelės IFN- β 2 geno, padėtyje. Efektyvi nukleotidų seka paprastai turi nukleotidų seką, kuri yra komplementari norimai tikslinės nukleorūgšties molekulėi (pvz. modifikuojamas geno lokusas), skatinančią nukleotido bazių porų susidarymą. Gali būti naudojama bet kokia nukleotidų seka, jei tik ji palengvina homologinę rekombinaciją tikslinės nukleorūgšties molekulės konkrečioje ir pasirinktoje padėtyje. Paprastai yra tikslinio efektyvumo eksponentinė priklausomybė nuo homologijos apimties arba ilgio tarp tikslinio vektoriaus ir tikslinio lokuso. Selekcija ir homologinei rekombinacijai efektyvių sekų panaudojimas yra aprašytas, pvz., Deng and Capecchi, *Mol. Cell. Biol.*, 12:3365-3371, 1992; Bollag et al., *Annu. Rev. Genet.*, 23:199-225, 1989; Waldman and Liskay, *Mol. Cell. Biol.*, 8:5350-5357, 1988.

Šio išradimo aspektas yra nuslopinti arba funkciškai nutraukti IFN- β 2 geno ekspresiją. Išsireiškimai "geno suardymas", "geno nutraukimas", "ekspresijos slopinimas", "geno slopinimas", "funkcinis geno inaktyvavimas"

arba "funkcinė geno inaktyvacija" reiškia tokią geno modifikaciją, kuri sumažina arba sutrukdo geno ir/arba jo produktų ekspresiją ląstelėje. Geno produktų ekspresija gali būti pilnai arba dalinai nuslopinta, pvz. sumažinta 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % arba daugiau. Funkciškai suardytas genas, pvz. funkciškai suardytas IFN- β 2 genas, apima modifikuotą geną, kuris ekspresuoja sutrumpintą polipeptidą, turintį mažesnę nei laukinio tipo geno koduojančią seką. Toks genas yra parodytas fig.1. Genas taip pat gali būti funkciškai suardytas paveikiant jo iRNR struktūrą tokiu būdu, kad būtų sukurama netransliuojama informacija, pvz. rėmelio poslinkis, stabilumo sumažinimas ir t.t.

Pagal šį išradimą IFN- β 2 genas yra modifikuotas tokiu būdu, kad būtų efektyviai slopinama atitinkamo geno produkto ekspresija. Taigi, pvz., funkciškai suardytas rekombinantinis IFN- β 2 genas neekspresuoja funkcinio IFN- β 2 polipeptido arba ekspresuoja tokius kiekius funkcinio IFN- β 2 polipeptido, kurie yra mažesni nei IFN- β 2 laukiniai kiekiai, pvz. sumažintus 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% arba daugiau. "Nefunkcinis" arba "funkciškai neaktyvus" IFN- β 2 polipeptidas reiškia kad, IFN- β 2 neturi vienos arba kelių IFN- β 2 bioaktyvumo atvejų. Genas gali būti modifikuotas bet kurioje iš efektyvių padėčių, pvz., stiprintujuose, promotoriuose, reguliacijos srityse, nekoduojančiose sekose, koduojančiose sekose, intronuose, egzonuose ir t.t., tokiu būdu, kad būtų sumažinta arba išvengta šio geno ekspresijos ląstelėje. Įterpimai į IFN- β 2 geno, pvz. pelės IFN- β 2 geno, sritį gali būti atliekami panaudojant homologinę rekombinaciją. Į IFN- β 2 promotorių ir/arba koduojančią sritį, ir/arba nekoduojančią sritį yra įvedama rekombinantinė nukleorūgšties molekulė, turinti geno homologijos sritis ir nukleotidų seką, koduojanti atrankų markerio geną, ir tokiu būdu funkciškai suardoma geno ekspresija. Tada šį nokautinį konstruklą įvedus į ląstelę, jis gali integruotis į genomą. Taigi, ląstelės progenai ekspresuos tik vieną funkcinę geno kopiją; kita kopija jau nebeekspresuos geno produkto arba ekspresuos jo sumažintą kiekį, kadangi dabar geno endogeninė nukleotidų seką yra pertraukta įvesta nukleotidų seką. Jeigu pageidaujama, funkcinis genas gali būti inaktyvuotas antroje analogiškoje stadijoje.

Homologinei rekombinacijai tinkanti nukleotidų seka gali būti veiksmingai prijungta prie nukleotido sekos, geriausia atrankaus markerio nukleotidų sekos, arba geno, kuris turi būti įterptas į norimą tikslinę nukleorūgštį.

Geriau, kai rekombinantinė nukleorūgštis yra įterpta į ląstelę su chromosomine DNR, kuri turi endogeninį geną, kurį reikia nokautuoti. Ląstelėje ši rekombinantinė nukleorūgšties molekulė gali susijungti per homologinę rekombinaciją su ląstelės DNR tokioje padėtyje, kad būtų sustabdoma arba pertraukiama geno, kurį reikia nokautuoti, transkripcija. Toks įterpimas paprastai atsiranda dėl homologinės rekombinacijos (pvz. tikslinio vektoriaus sričių, kurios yra homologinės arba komplementarios endogeninės DNR sekoms, hibridizuotoms tarpusavyje, kai tikslinis vektorius yra įterpiamas į ląstelę; šios sritys tada gali rekombinuotis taip, kad dalis tikslinio vektoriaus yra įterpiama į atitinkamą endogeninės DNR padėtį). Kaip jau minėta, viena ar daugiau nukleotido sekų gali būti įterptos į geną jo ekspresijai slopinti.

Pageidautina nustatyti įterptos nukleotidų sekos buvimą gene. Tai gali būti atliekama įvairiais būdais, įskaitant nukleorūgščių hibridizaciją, antikūno susirišimą su epitopu, kurį koduoja įterpta nukleorūgštis, arba parenkant įterptos sekos fenotipą. Taigi, tokia įterpta nukleorūgšties seka gali būti vadinama pirmąja atrankia nukleotidų seka. Geriausia, kai pirmoji atranki nukleotidų seka suteikia pirmąją atrinkimo charakteristiką ląstelėje, kurioje ji yra. Terminas "atrinkimo charakteristika" reiškia, pvz., charakteristiką, kuri yra išreikšta ląstelėje ir kuriai suteikiama pirmenybė prieš kitą arba kitas charakteristikas. Atrankia nukleotidų seka, taip pat žinoma kaip atrankus markerinis genas, gali būti bet kokia nukleorūgšties molekulė, kuri yra detektuojama arba nustatoma testais, kai ji yra įterpta į žinduolio genomine DNR. Atrinkimo charakteristika gali būti teigiama charakteristika, t.y. charakteristika, kurią išreiškia arba įgyja ląstelės ir kurios buvimas duoda galimybę atrinkti tokias ląsteles. Teigiama atrankos charakteristika gali suteikti galimybę ląstelei arba organizmui išgyventi, pvz., atsparumas antibiotikui, atsparumas ouabainui (genas ouabainui, atspariam natrio/kalio ATPazės baltymui). Teigiamos atrankos charakteristikų ir atitinkamų atrankos agentų pavyzdžiais yra, pvz., Neo ir G418 arba kanomicinas; Hyg ir higromicinas, hisD ir histidinolis; Gpt ir ksantinas; Ble ir bleomicinas; Hprr ir hipoksantinas. Žr., pvz., U.S. Pat. No: 5,464,764 ir

Capecchi, *Science*, 244:1288-1292, 1989. Atrankaus geno buvimas tikslinėje sekoje gali būti identifikuotas naudojant rišančius ligandus, kurie atpažįsta atrankaus geno produktą, pvz., polipeptidiniam produktui, kurį koduoja atrankus genas, identifikuoti gali būti naudojamas antikūnas, receptorinio polipeptido, kurį koduoja atrankus genas, ekspresijai identifikuoti gali būti naudojamas atitinkamas ligandas arba nustatant fermento, kurį koduoja atrankus genas, ekspresiją. Geriau, kai atrankus markerinis genas koduoja polipeptidą, kurio natūraliai žinduolyje nebūna.

Atrankus markerinis genas gali būti veiksmingai prijungtas prie jo nuosavo promotoriaus arba kito promotoriaus iš bet kokio šaltinio, kuris bus aktyvus arba gali būti lengvai aktyvuojamas ląstelėje, į kurią jis yra įvestas. Tačiau atrankus markerinis genas nereikalauja, kad būtų prijungtas jo nuosavas promotorius, nes jis gali būti transkribuotas naudojant geno, į kurį jis įterptas, promotorių. Atrankus markerinis genas gali turėti vieną arba daugiau sekų ekspresijai vykdyti ir/arba padėti, įskaitant, pvz., ribosomines atpažinimo sekas, stiprintojų sekas, sekas, kurios suteikia stabilumą polipeptidui arba RNR, ir/arba poliA seką, prijungtą prie jo 3' galo geno transkripcijai nutraukti.

Teigiamas atrankus markeris palengvina rekombinantų, kuriuose teigiamas atrankus markeris buvo įterptas homologinės rekombinacijos metodu, atrinkimą. Šio išradimo geno tikslinis vektorius taip pat gali turėti antrąją atrinkimo charakteristiką, koduojamą antrojo atrankaus geno, kad būtų dar labiau padedama atrinkti teisingus tikslinius rekombinantus. Neigiamas atrankos markeris duoda galimybę atrinkti ląsteles, kuriose atsirado tik nehomologinės rekombinacijos. Viename iš tinkamiausių įgyvendinimo variantų antrasis atrankaus markerio genas ląstelei, į kurią jis buvo įvestas, suteikia neigiamą atrankos charakteristiką. Tokia neigiama atrankos charakteristika gali būti įtaisyta į tikslinį vektorių tokiu būdu, kad ji gali būti naudojama atskirti atsitiktinės intergacijos atvejus nuo homologinės rekombinacijos. Terminas "neigiama atranka" reiškia atrankos charakteristiką, kurį, kai ją įgyja ląstelė, duoda gyvybingumo netekimą (t.y. ląstelei ji yra letali). Nukleozido analogas – gancikloviras – kuris daugiausia yra toksiškas ląstelėms, ekspresuojančioms HSVtk (paprastojo herpeso viruso timidinkinazę), gali būti naudojamas kaip neigiamas atrankos agentas, nes jis atrenka ląsteles, kurios neturi įterpto HSVtk atrankaus markerio. FIAU (1,2-

dezoksi-2-fluor-,alfa,-d-arabinofuranzil-5-joduracilas) taip pat gali būti naudojamas kaip atrankos agentas ląstelėms, neturinčioms HSVtk, atrinkti. Analogiškai gali būti naudojami kiti neigiami atrankos markeriai. Neigiamų atrinkimo charakteristikų ir atitinkamų agentų pavyzdžiais yra, pvz. paprastojo herpeso viruso timidinkinazė (HSV tk) ir acikloviras, gancikloviras arba FIAU; HpRT ir 6-tioguaninas arba 6-tioksantinas; difterito toksinas; ricino toksinas; citozindeaminazė ir 5-fluorcitozinas.

Neigiamas atrankus markeris paprastai yra išdėstomas geno-taikinio vektoriaus 5' arba 3' padėtyse rekombinogeninės homologijos sričių atžvilgiu taip, kad homologinių sričių dvigubo pakeitimo rekombinacija perneša teigiamą atrankų markerį į numatytą tikslinės nukleorūgšties padėtį, tačiau neperneša teigiamo atrankaus markerio. Pavyzdžiui, tk kasetė gali būti įvesta pelės geno 3' gale maždaug 150 bazių porų atstumu nuo 3' stop-kodono. Tiksliniame vektoriuje taip pat gali būti naudojamas daugiau nei vienas neigiamas atrankus markeris. Dviejų neigiamų atrankos vektorių išdėstymas, pavyzdžiui, vektoriaus-taikinio 5' ir 3' galuose dar labiau sustiprina atranką prieš tikslines ląsteles, kurios turi atsitiktinai sujungtą vektorių. Atsitiktinis sujungimas kartais duoda vektoriaus persitvarkymą, kuris prieš atsitiktinį vektoriaus sujungimą sukelia viso arba dalies neigiamo atrankaus markerio pašalinimą. Jeigu taip įvyksta, neigiamoji atranka negali būti naudojama ląstelėms, kurios turi per atsitiktinį sujungimą, o ne per homologinę rekombinaciją įterptą tikslinį vektorių, pašalinti. Daugiau nei vieno neigiamo atrankaus vektoriaus panaudojimas iš esmės sustiprina tikėtinumą, kad atsitiktinis sujungimas duos galimybę įvesti bent vieną iš neigiamų atrankių markerių. Tokiems tikslams neigiami atrankūs markeriai gali būti vienodi arba skirtingi.

Teigiamos-neigiamos atrankos schemas panaudojimas sumažina foninį lygį ląstelių, turinčių neteisingai integruotas tikslinių konstrukto sekas. Teigiamą-neigiamą atranką paprastai apima panaudojimą dviejų aktyvių atrankių markerių: (1) teigiamo atrankaus markerio (pvz., neo), kuris gali būti stabiliai ekspresuojamas po atsitiktinės integracijos arba homologinio tikslinio įvedimo, ir (2) neigiamo atrankaus markerio (pvz., tk), kuris gali būti stabiliai ekspresuojamas tik po atsitiktinės integracijos. Derinant ir teigiamą, ir neigiamą atranką, gali būti gaunamos efektyvios šeimininko ląstelės,

duodančios teisingai suderintus homologinės rekombinacijos rezultatus. Teigiamos-neigiamos atrankos schemas yra aprašytos, pvz. U.S. Pat. No. 5,464,764; WO 94/06908. Tačiau pripažįstama, kad šio išradimo įgyvendinimui nėra reikalinga vieno arba daugiau neigiamų atrankių markerių, pvz. gauti transgeniniam gyvūnui, kuriame IFN- β 2 genas yra funkciškai inaktyvuotas arba suardytas.

Šio išradimo rekombinantinė nukleorūgšties molekulė taip pat gali turėti savyje visą vektorių arba jo dalį. Vektorius yra, pvz., nukleorūgšties molekulė, kuri šeimininko ląstelėje gali dvigubėti autonomiškai, pvz., turinti replikacijos pradžią. Vektoriai gali tikti manipuliacijoms vykdyti, dauginti ir/arba gauti dideliems kiekiams rekombinantinės molekulės norimame šeimininke. Patyręs darbuotojas gali parinkti vektorių priklausomai nuo norimo tikslo, pvz. rekombinantinės molekulės dauginimui bakterijose, mielėse, vabzdžio arba žinduolio ląstelėse. Kaip pavyzdys yra pateikiami tokie vektoriai – bakteriniai: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, pD10, Phagescript, Φ X174, pBK Phagemid, pNH8A, pNH16a, pNH18Z, pNH46A (Stratagene); Bluescript KS⁺II (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia); eukariotiniai: PWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, PBPV, PMSG, pSVL (Pharmacia). Tačiau taip pat gali būti naudojamas bet koks kitas vektorius, pvz., plazmidės, virusai arba jų dalys, jei tik jie norimame šeimininke yra replikuojami ir gyvybingi. Į vektorius taip pat gali įeiti sekos, kurios suteikia galimybę jiems replikuotis šeimininke, kurio genomą reikia modifikuoti. Tokio vektoriaus panaudojimas gali išplėsti sąveikos laikotarpį, kurio metu gali įvykti replikacija, padidinant tikslinį efektyvumą. Geno tikslinio vektoriaus, kuris gali būti naudojamas šiame išradime, pavyzdys yra aprašytas Molecular Biology, ed. by Ausubel, F. M., et al., Unit 9.16, fig.9.16.1 (pNTK).

Pagal šio išradimo aspektą IFN- β 2 geno funkcija gali būti nutraukta arba nokautuota įterpiant į jį egzogeninę arba heterologinę seką, nutraukiančią jo funkciją. Pavyzdžiui, egzogeninė arba heterologinė seka gali būti įterpta į IFN- β 2 geno sritį prieš jo pirmąjį starto kodoną. Atrankią charakteristiką koduojanti nukleotido seka gali būti įterpta į IFN- β 2 geną panaudojant homologinę rekombinaciją tokiu būdu, kad ji būtų veiksmingai

prijungta prie IFN- β 2 geno endogeninio promotoriaus. Įvedus atrankaus markerio geną į norimą numatytą IFN- β 2 geno padėtį, atrankios charakteristikos ekspresiją valdo endogeninis IFN- β 2 geno promotorius, leidžiantis jį aptikti tokiose ląstelėse, į kurias jis yra integruotas.

Atrankaus markerio genas taip pat gali būti įjungtas padėtyse po IFN- β 2 geno pirmojo kodono pagal 3' kryptį. IFN- β 2 genas gali būti sujungtas ne skaitymo rėmelyje arba skaitymo rėmelyje su IFN- β 2 polipeptidu taip, kad būtų padaromas sulietas polipeptidas, kuris yra mažiau aktyvus nei normalus produktas. Detektuojant tik tas ląsteles, kurios ekspresuoja šią charakteristiką, gali būti atrinktos ląstelės, kurios turi norimoje padėtyje integruotą seką. Patogus būdas tokiai selekcijai atlikti yra atsparumo antibiotikui panaudojimas. Toliau duodamuose pavyzdžiuose atrankia charakteristika yra naudojamas atsparumas neomicinui. Ląstelės, auginamos esant toksiškoms neomicino koncentracijoms, paprastai turi žūti. Atsparumo neomicinui geno įgijimas homologinės rekombinacijos būdu apsaugo ląsteles nuo letalinio poveikio ir tokiu būdu palengvina selekciją.

IFN- β 2 genas yra nokautuojamas arba funkciškai suardomas per integraciją. Atrankaus geno įterpimas prieš IFN- β 2 koduojančią seką efektyviai izoliuoja jį nuo promotoriaus sekos ir jo ekspresiją padaro negalima. Jeigu atrankus genas turi transkripcijos terminatorių, geno transkripcija naudojant IFN- β 2 promotorių užsibaigs tuoj pat po jo ir retai duos IFN- β 2 koduojančios sekos transkripciją. IFN- β 2 genas taip pat gali būti nokautuojamas panaudojant deleciją be pakeitimo, tokią kaip dalies geno kryptinga delecija. Išimtos sritys gali būti geno reguliuojančių sričių koduojančios sritys.

IFN- β 2 genas gali būti modifikuotas bet kokioje norimoje padėtyje. Jis gali būti modifikuotas taip, kad būtų produkuojamas sutrumpintas IFN- β 2 polipeptidas, pasižymintis viena arba keliomis pilno IFN- β 2 polipeptido aktyvumo rūšimis. Pageidaujant, iš rekombinantinio geno gali būti pašalintos kai kurios dalys. Pavyzdyje pelės IFN- β 2 geno neomicino kasete pakeisti egzoniškai funkciškai jį inaktyvuoja. Po to neomicino kasetė gali būti išimta iš IFN- β 2 geno, pvz., naudojant rekombinazijų sistemą. Sekoms iš rekombinantinio geno pašalinti ypač tinkama yra Cre-lox vietai būdinga rekombinantinė sistema.

Norint naudoti Cre-lox sistemą, rekombinazės atpažinimo vietas yra integruojamos į chromosomą kartu su atrankiu genu, kad po to būtų palengvintas jo pašalinimas. Patarimus, kaip naudoti rekombinazines pašalinimo sistemas, galima rasti, pvz., U.S. Pat. Nos. 5,626,159, 5,527,695 ir 5,434,066. Žr. taip pat Orban, P.C., et al., "Tissue- and Site-Specific DNA Recombination in Transgenic Mice", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6861-6865, 1992; O'Gorman, S. et al., "Recombinase-Mediated Gene Activation in Site-Specific Integration in Mammalian Cells", *Science*, 251:1351-1355, 1991; Sauer, B., et al., "Cre-stimulated recombination at loxP-Containing DNR sequences placed into the mammalian genome", *Nucl. Acids Res.*, 17(1):147-161, 1989.

Dėl kitų nukleorūgščių aspektų duodamos nuorodos į standartinius molekulinės biologijos vadovėlius. Žr., pvz., Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Sciences Publishing, Inc., New York, 1986; Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IL Press, 1985; Sambrook et al., *Molecular Cloning*, CSH Press, 1989; Howe, *Gene Cloning and Manipulation*, Cambridge, University Press, 1995.

PAVYZDŽIAI

IFN-β2 ekspresija ir gryninimas. Išgrynintas IFN-β2 buvo palygintas su IFN-β1b SDS-PAGE metodu. IFN-β2 turi 26 kDa stebimą molekulinę masę, kaip nustatyta SDS-PAGE metodu, o IFN-β1b turi maždaug 20,5 kDa stebimą molekulinę masę.

Metodika: Buvo sukurti PGS pradmenys (5'-GGA ATT CCT ACT ACC TCG GGC TTC TAA-3' ir 5'-GCG CGC GCA TAT GCT AGA TTT GAA ACT GAT TAT-3') amplifikacijai IFN-β2 koduojančios srities (minus signalinė seka) iš žmogaus genominės DNR preparato tolimesniam įjungimui į IPTG indukuojamą pet5a ekspresijos vektorių (Promega corp.). Po indukcijos, IFN-β2 buvo išskirtas iš E.coli inkluzijos kūnelių ir solubilizuotas, naudojant Zwittergent 3-14 (Russel-Harde et al., *J. Interferon Cytokine Res.*, 15, 31-37, 1995). Panaudojant jonų mainų chromatografiją, o po to molekulinę sietų chromatografiją, IFN-β2 buvo išskirtas iš šių inkluzijos kūnelių. IFN-β2

atitinkanti 26 kDa juosta buvo išplauta iš SDS-PAGE gelio ir analizuota panaudojant baltymų sekvenavimą nuo N-galo. Pirmosios 10 aminorūgščių atitinka IFN- β 2 aminorūgštis. Be to, buvo atliktas skaldymas bromcianu, gaunant keletą fragmentų, kurie buvo sekvenuoti, ir rasta, kad jie turi numatyto baltymo sekas, kas rodo, kad visas baltymas buvo sėkmingai ekspresuotas ir išgrynintas.

Nuo interferono priklausančios ISRE-liuciferazės reporterio aktyvacija IFN- β 2. T98G ląstelės buvo transfekuotos plazmide, turinčia ISRE-liuciferazės konstrukta, ir buvo išskirtas stabilus klonas, ekspresuojantis šį konstrukta. Buvo paskleista 3×10^4 ląstelių, laikoma per naktį ir pridėdama nurodytų koncentracijų IFN- β 2 tirpalo. Po 4 valandų tikrinamas ląstelių liuciferazinis aktyvumas, naudojant liuciferazės rinkinį, kaip aprašyta rinkinio instrukcijoje (Promega Cat. #E1501). IFN- β 2 specifiskai aktyvavo nuo interferono priklausančią ISRE reporterį. Žr. fig.6. Naudojant šį testą, IFN- β 2 rodė funkcinės savybes, panašias į IFN- β 1b.

IFN- β 2 susirišimo su žmogaus I tipo interferono receptoriumi inhibavimas anti-IFN- β 2-pelės polikloniniu antikūnu. Buvo sintezuotas peptidas, atitinkantis IFN- β 2 unikalią C-galo sritį (KLSKQGRPLNDMKQELTTEFR), sujungtas su KLH, ir panaudotas Swiss-Webster pelėms imunizuoti, atliekant iš viso keturias imunizacijas per du mėnesius. Po imunizavimo buvo surinktas serumas ir parodyta, kad jame yra antikūnų, kurie specifiskai rišasi su IFN- β 2. Be to, anti-IFN- β 2 serumas blokavo nuo IFN priklausančio ISRE-liuciferazės reporterio indukciją IFN- β 2. Naudojant šį testą, IFN- β 2 rodė funkcinės savybes, panašias į IFN- β 1b.

Metodika: 3×10^4 ląstelių buvo paskleistos nakčiai, pridėta 20 ng IFN- β 2 arba su anti-IFN- β 2 serumu, arba su normaliu pelės serumu ir po keturių valandų tirta, ar yra indukuotos liuciferazės, naudojant liuciferazės testavimo rinkinį ir standartinę metodiką iš Promega Corp. Žr. fig.7.

IFN- β 1b ir IFN- β 2 poveikis į žmogaus HT1080 ląstelių proliferaciją. IFN- β 1b ir IFN- β 2 turi antiproliferacinį poveikį ir į HT1080, ir į HT1080IFNAR2c

ląsteles. Tai matyti iš abiejų Alamaro mėlio testo panelių (fig. 8A ir B), bei apžiūrinėjant. Antiproliferacinis poveikis koreliuojasi su receptorių skaičiaus padidėjimu, kas matyti iš padidėjusio poveikio HT1080IFNAR2c ląstelėms, kurios turi penkis kartus didesnį skaičių IFN surišimo vietų, lyginant su HT1080 ląstelėmis. Naudojant šį testą, IFN- β 2 rodė funkcines savybes, panašias į IFN- β 1b.

Metodika: HT1080IFNAR2c ląstelės yra HT1080 ląstelės, kurios papildomai ekspresuoja IFNAR2c. Šios ląstelės turi penkis kartus didesnį IFN surišimo vietų skaičių nei kilminės HT1080 ląstelės. $2-5 \times 10^4$ ląstelių buvo paskleista nakčiai ir arba nestimuluota, arba stimuliuota 1 $\mu\text{g/ml}$, 500 ng/ml, 200 ng/ml arba 50 ng/ml IFN- β 2. HT1080 ląstelės gi buvo stimuliuotos 1 $\mu\text{g/ml}$, 500 ng/ml arba 200 ng/ml IFN- β , o HT1080IFNAR2c ląstelės buvo stimuliuotos 1 $\mu\text{g/ml}$, 500 ng/ml, 200 ng/ml arba 50 ng/ml IFN- β . Ląstelių proliferacijai matuoti buvo naudojamas Alamaro mėlis (U.S. Patent No. 5,501,959) naudojant standartinę metodiką, ir laikas nuo laiko buvo fotografuojamos atitinkamos sritys. Interferono turinti terpė buvo keičiama kiekvieną dieną. Visi bandymai buvo pakartoti tris kartus. Žr. fig.8.

IFN- β 2 antiproliferacinis poveikis į žmogaus HT1080 ląsteles, išmatuotas trumpalaikio $^3\text{[H]}$ -timidino įsiterpimo būdu. $^3\text{[H]}$ -timidino įsiterpimas buvo matuotas praėjus 48 valandoms po IFN- β 2 (dryžutas stulpelis) arba kontrolinio buferio (tamsus stulpelis) pridėjimo. $^3\text{[H]}$ -timidino įsiterpimas yra pateiktas kaip imp. per minutę/ 10^6 ląstelių. Duomenys (fig.9) rodo vidutines $n = 3$ reikšmes, o skirtumai tarp pakartojimų yra mažesni nei 15 %. IFN- β 2 žymiai mažino timidino įsiterpimą, pvz. maždaug 80 %. Naudojant šį testą, IFN- β 2 rodė funkcines savybes, panašias į IFN- β 1b.

Metodika: Ląstelės buvo pasėtos 24 duobučių ląstelių auginimo plokštelėje (po 2×10^4 ląstelių/duobutei), inkubuotos per naktį ir po to stimuliuotos IFN- β 2 (1 $\mu\text{g/ml}$) 24 valandas. Tada ląstelės buvo inkubuotos pilnoje terpėje, turinčioje $^3\text{[H]}$ -timidino ([metil- ^3H]-timidinas, specifinis aktyvumas = 40-60 Ci/mmol, Amersham Life Science) ir surinktos po 24 valandų. Ląstelės buvo plaunamos druskos turinčiu fosfatinu buferiu (PBS), po to 10 % trichloracto rūgštimi (TCA) ir 100 % etanoliumi. Prieš nustatant

įsiterpusį radioaktyvumą, ląstelės buvo soliubilizuotos 1M kalio hidrokside ir sumaišytos su Ecolume scinciliaciniu skysčiu.

I tipo IFN receptoriaus aktyvavimas IFN- β 2. IFN- β 2 indukavo žmogaus I tipo IFN receptoriaus IFNAR2c receptoriaus grandinės tirozino fosforilinimą. Ląstelės buvo arba nestimuluotos, arba stimuliuotos žmogaus IFN- α 2, IFN- β 1b arba IFN- β 2 (1000-2000 santykinų vienetų/ 10^6 ląstelių 15 minučių). Fosforilinimas buvo stebėtas tada, kai yra interferono, bet ne tada, kai nėra interferono. Naudojant šį testą, IFN- β 2 rodė funkcinės savybes, panašias į IFN- β 1b.

Metodika: IFNAR2c ekspresuojančios Daudi ląstelės (5×10^7 ląstelių) buvo solubilizuotos lizavimo buferyje (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, turinčiame 1 % Nonidet-40 (t/t) (NP-40), 150 mM natrio chlorido, 1 mM EDTA, 2,5 % glicerolio (t/t), 1,0 mM natrio fluorida, 1,0 mM natrio ortovanadato, 1,0 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), 0,5 μ g/ml leupeptino ir 5,0 μ g/ml tripsino inhibitoriaus) 30 min. 4 °C temperatūroje, ir netirpi medžiaga nucentrifuguota. Imunonusodinimui į kiekvieną mėginį buvo pridėta IFNAR2c antiserumo (+) arba neigiamo kontrolinio antiserumo (-), inkubuota per naktį, sumaišyta su Protein-G agaroze (Boehringer-Mannheim) ir išskirstyta SDS-PAGE metodu (10 % Novex geliai). Baltymai buvo perkelti ant polivinilidendifluorido filtrų (Pro-Blot) ir inkubuoti blokavimo buferyje (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, turinčiame 0,1 % Tween 20 (t/t), 150 mM natrio chlorido, 1 mM EDTA, 1,0 mM natrio fluorida, 1,0 mM natrio ortovanadato, 1,0 mM PMSF, 0,5 0,5 μ g/ml leupeptino ir 5,0 μ g/ml tripsino inhibitoriaus) per naktį 4 °C temperatūroje, inkubuoti su anti-fosfotirozino antikūnu (ab PY99, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA) ir plauti blokavimo buferiu. Po perplovimo membrana buvo inkubuota su specifiniu antru antikūnu (praskiedimas 1:1000), sujungtu su krienų peroksidaze (HPR) 1 val., plauta 3 kartus blokavimo buferiu ir išryškinta naudojant chemiluminescencinį detektavimo metodą (Pierce).

STAT1 ir STAT2 aktyvacija Daudi ląstelėse stimuliuojant IFN- β 2.

Daudi ląstelės buvo stimuliuotos IFN- β 1b arba IFN- β 2 (1000-2000 santykinų vienetų/ 10^6 ląstelių) 15 minučių, soliubilizuotos lizavimo buferyje ir buvo

imunonusodintos STAT1 ir STAT2. Po imunonusodinimo buvo tirtas STAT1 ir STAT2 tirozino fosforilinimas, naudojant fosfotirozinui specifinį antikūną, abiem IFN tipams. Naudojant šį testą, IFN- β 2 rodė funkcines savybes, panašias į IFN- β 1b.

Metodika: Daudi ląstelės (1×10^7 ląstelių) buvo solubilizuotos lizavimo buferyje (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, turinčiame 1 % Nonidet-40 (t/t) (NP-40), 150 mM natrio chlorido, 1 mM EDTA, 2,5 % glicerolio (t/t), 1,0 mM natrio fluorida, 1,0 mM natrio ortovanadato, 1,0 mM fenilmetilsulfonilfluorida (PMSF), 0,5 μ g/ml leupeptino ir 5,0 μ g/ml tripsino inhibitoriaus) 30 min. 4 °C temperatūroje, ir netirpi medžiaga nucentrifuguota. Imunonusodinimui į kiekvieną mėginį buvo pridėta STAT1 ir 2 antikūnų (atitinkamai Stat1 p91 ir Stat2 (C-20), Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA), inkubuota per naktį, sumaišyta su Protein-G agaroze (Boehringer-Mannheim) ir išskirstyta SDS-PAGE metodu (10 % Novex geliai). Baltymai buvo perkelti ant polivinilidendifluorida filtrų (Pro-Blot) ir inkubuoti blokavimo buferyje (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, turinčiame 0,1 % Tween 20 (t/t), 150 mM natrio chlorido, 1 mM EDTA, 1,0 mM natrio fluorida, 1,0 mM natrio ortovanadato, 1,0 mM PMSF, 0,5 0,5 μ g/ml leupeptino ir 5,0 μ g/ml tripsino inhibitoriaus) per naktį 4 °C temperatūroje, inkubuoti su anti-fosfotirozino antikūnu (PY99, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA) ir plauti blokavimo buferiu. Po perplovimo membrana buvo inkubuota su specifiniu antru antikūnu (praskiedimas 1:1000), sujungtu su krienų peroksidaze (HPR) 1 val., plauta 3 kartus blokavimo buferiu ir išryškinta naudojant chemiliuminescencinį detektavimo metodą (Pierce).

IFN- β 1b ir IFN- β 2 priešvirusinis aktyvumas. Žmogaus WISH ląstelės buvo stimuliuotos arba IFN- β 1b, arba IFN- β 2, po to infekuotos pūslelinio stomatito virusu (VSV). Virusio citopatinis poveikis (CPE) buvo matuojamas naudojant redokso dažą Alamaro mėlį. IFN- β 2, atitinkantys priešvirusinio aktyvumo vienetai atidėti ant X-ašies. Buvo nustatyta, kad IFN- β 2 specifinis priešvirusinis aktyvumas yra $4,0-8,0 \times 10^4$ tarptautinių vienetų ("IU") miligramui. Žr. fig.10. Naudojant šį testą, IFN- β 2 rodė funkcines savybes, panašias į IFN- β 1b.

Metodika: WISH ląstelės (30000 ląstelių/duobutei) buvo sudėtos į 96 duobučių Falcon mikrotitro plokšteles ir paliktos prisijungti per naktį. Ląstelės buvo stimuliuotos IFN-β1b (1000 IU pirmoje duobutėje; specifinis aktyvumas = $2,5 \times 10^7$ IU/ml) arba IFN-β2 (1 μg pirmoje duobutėje), praskiestos 1:1 per plokštelę, laikomos šešias valandas, po to pridedama VSV (7×10^3 plokšteles sudarančių vienetų/duobutei (PFU)) ir laikoma 18 valandų. Po inkubavimo terpė pašalinama ir į kiekvieną duobutą pridedama po 100 μl Alamaro mėlio (Biosource International) (gamintojų pateiktas tirpalas praskiedžiamas 1:10 terpe). Po 30-60 minučių inkubavimo 37 °C temperatūroje, CPE nustatomas matuojant sugertį esant 600 nm bangos ilgiui.

IFN-β2 konkuruoja su IFN-α2 dėl susirišimo su I tipo IFN receptoriais ant HT1080 ląstelių. 1×10^6 HT1080 ląstelių buvo inkubuotos 90 minučių su 15 ng/ml ^{32}P -žymėto IFN-α2 (Pestka Biomedical #51100) pilnoje ląstelių auginimo terpėje (10 % FBS, DMEM). Po inkubavimo ląstelės buvo perplautos du kartus auginimo terpe, soliubilizuotos 1 % SDS, sumaišytos su scinciliaciniu skysčiu ir skaičiuotas radioaktyvumas. 15 μg/ml IFN-β2 nukonkuravo daugiau nei 90 % prie HT1080 prijungto žymėto IFN-β2. Bandymai buvo atlikti tris kartus ir standartinis nukrypimas buvo mažesnis nei 10 %. Žr. fig.11.

Konkurencinis IFN-β2 prisijungimas prie I tipo IFN receptoriaus ant Daudi ląstelių. Konkurencinio ligando surišimo testai buvo atlikti su fosforilinta IFN-α2 forma. Ligandas fosforilintas (60-62 μCi/μg specifiniai aktyvumai) pagal Croze E., et al., *J. Biol. Chem.*, 271:33165-33168, 1996 aprašymą. Surišimo duomenys buvo analizuoti pagal Scatchard, G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51, 660-672, 1965 aprašymą. Nespecifinis surišimas buvo nustatytas esant nežymėto IFN 100 kartų pertekliui. Įvairių IFNų konkurencinis surišimas buvo nustatytas inkubuojant vis didėjančius kiekius nežymėtų IFN-α2, IFN-β1b arba IFN-β2 su pastoviu kiekiu fosforilinto IFN-α2. Naudojant šį testą, IFN-β2 rodė funkcinės savybes, panašias į IFN-β1b.

I tipo IFN receptoriaus IFN- β būdingas prijungimas. IFN- β 1b sąveikauja su I tipo IFN receptoriumi būdu, kuris skiriasi nuo IFN- α 2. Naudojant šį testą, IFN- β 2 rodo funkcinės savybės panašias į IFN- β 1b.

Metodika: Ląstelės (1×10^8) yra stimuliuojamos IFNais, imant jų $200 \text{ IU}/10^4$ ląstelių koncentracijas, 37°C temperatūroje 15 minučių CO_2 inkubatoriuje. Po to ląstelės greitai surenkamos 4°C temperatūroje centrifuguojant ($3000 \times g$, 3 minutes) ir tuoj pat soliubilizuojamos ledu atšaldytame lizavimo buferyje (100 mM Tris, pH 8,0, turinčiame 150 mM NaCl, 10 % glicerolio (t/t), 1 % NP-40 (t/t), 1 mM ortovanadato, 1 mM natrio pirofosfato, 1,0 mM natrio fluorida, 1,0 mM EDTA, 1 mM fenilmetilsulfonilfluorida, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptino ir 5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tripsino inhibitoriaus). Šis lizatas centrifuguojamas ($16000 \times g$, 30 minučių) 4°C temperatūroje ir surenkamas nuopilas. Ląstelių lizatai imunonusodinami naudojant anti-IFNAR1 antikūnus, kaip aprašyta Croze, E., et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 33165-33168, 1996, arba IFNAR2.2 triušio polikloniniais antiserumais (10 μl antiserumo/ 10^8 ląstelių), po to analizuojama SDS-PAGE metodu, naudojant Novex 8 % Tris-glicino gelius. Po elektroforezės baltymai perkeliama į polivinilidenfluorida (PVDF) filtrus (Pro-Blot) ir blokuojami 20 mM Tris, pH 8,0, turinčiu 150 mM NaCl, 1 mM ortovanadato, 1 mM natrio pirofosfato, 1,0 mM natrio fluorida, 1 mM PMSF ir 0,1 % Tween 20 per naktį kambario temperatūroje. Po to filtrai inkubuojami su antikūnais prieš IFNAR1 (40H2, 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, kaip aprašyta Croze, E., et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 33165-33168, 1996), arba IFNAR2.2 (10 μl antiserumo/10 ml blokavimo buferio) 2-3 valandas kambario temperatūroje, po to plaunama 10 minučių blokavimo buferiu. Tada perplauti filtrai inkubuojami su atitinkamu konjugotu su krienų peroksidaze (HRP) antru antikūnu 2-3 valandas kambario temperatūroje, plaunami ir ryškinami naudojant chemiliuminescenciją (Enhanced Chemiluminescence Detection Kit, Pierce).

Geriausios genų indukcijos, naudojant įvairių klasių interferonus, nustatymas. Auginamose ląstelėse interferonai indukuoja įvairius persiklojančius genų rinkinius. Daudi arba HT1080 ląstelės yra stimuliuojamos arba žmogaus IFN- α 2 ($1000 \text{ IU}/10^6$ ląstelių), IFN- β 1b ($1000 \text{ IU}/10^6$ ląstelių),

IFN- γ (1000 IU/10⁶ ląstelių), arba IFN- β 2 (1000 IU/10⁶ ląstelių) 17 valandų, visos nucentrifuguotos ląstelės surenkamos ir pateikiamos TaqMan® analizei, kaip aprašyta TaqMan® Gold RT-PCR Protocol Manual, Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation P/N 402876 Rev. A 1997. Genų ekspresijos RNazės apsaugos testams ląstelės yra stimuliuojamos ir surenkamos kaip aprašyta Sandhya R. et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 22878-22884, 1996. Genai, kuriuos labiausiai indukavo IFN- β 1b, yra normalizuoti pagal ISG6-16 (geno, kurį vienodai indukavo IFN- α ir IFN- β) ekspresiją. Naudojant šį testą, IFN- β 2 rodė funkcinės savybes, panašias į IFN- β 1b.

Žmogaus fetalinių astrocitų antiproliferacija, kaip atsakas į IFN- β 2.

Astroцитai duoda įnašą į MS pažeidimų atsiradimą ir čia mes parodėme, kad IFN- β 2 inhibuoja žmogaus fetalinių astrocitų proliferaciją in vitro. Šie duomenys duoda pagrindo manyti, kad IFN- β 2 gali veikti kaip astrocitų proliferacijos augimo faktorius ir todėl apsaugoti nuo reaktingų gliotinių pažeidimų MS atveju. Naudojant šį testą, IFN- β 2 rodė funkcinės savybes, panašias į IFN- β 1b.

Metodikos:

(A) *Astroglijų kultūrų paruošimas:* Astrocитаis praturtintos kultūros iš embrioninių žmogaus smegenų buvo paruoštos iš dviejų skirtingų 17-22 savaičių amžiaus embriono smegenų. Audiniai buvo gauti iš Advanced Bioscience Resource Inc. po legalaus terapinio aborto. Pašalinus smegenų dangalus, smegenys buvo išpjauti ir išskaldyti į vieną ląstelių suspensiją atsargiai pipetuojant, o po to perleisti per sietus. Ląstelės vėl suspenduojamos Iscove terpėje, turinčioje 10 % FCS esant antibiotikų mišiniui iš penicilino, streptomicino ir fungizono, o mikroglijos buvo pašalinamos kasdien visą savaitę panaudojant diferencinės adhezijos metodiką. Tada buvo auginami astroцитai mažiausiai 8-10 savaičių ir maitinami du kartus per savaitę. Mikroglijų priemaišos, neuronai ir oligodendrocitų palikuonys negali išgyventi šio ilgo auginimo sąlygomis. Šio laikotarpio gale kultūros buvo dažomos GFAP O4 ir nestino antikūnais, ir buvo patvirtinta, kad yra daugiau nei 95 % grynų astrocitų. Kultūros buvo užšaldytos skystame N₂ iki jų naudojimo proliferacijos teste.

(B) *Proliferacijos testas*: Prieš naudojant proliferacijos teste, astrocitai buvo išimti iš sušaldytos žaliavos ir auginami aukščiau aprašytoje terpėje mažiausiai du kartus persėjant prieš naudojant juos proliferacijos teste. Ląstelės buvo paskleistos 96 duobučių plokštelėse, imant 2×10^4 ląstelių/ml su 10 ng/ml EGF (R&D Systems) arba be jo. Testas buvo atliktas mažai serumo turinčioje terpėje (2 % FCS). Kultūros buvo veikiamos IFN- β 2 (1 mg/ml pagrindinis tirpalas) arba buferio kontrole, esant nurodytiems praskiedimams. Po 4 inkubavimo dienų kultūros buvo inkubuojamos per naktį su ^3H -timidinu, ir prieš surenkant ląsteles plokštelės buvo užšaldytos.

IFN- β 2 aktyvumas išsėtinės sklerozės graužikų modeliuose.

Išsėtinės sklerozės gyvūnų modeliu yra plačiai naudojamas eksperimentinis alerginis encefalomyelitas (EAE) (Swanborg, G., *Semin. Immunopathol.*, 77, 4-13, 1995; Martin, R. and McFarland, H., *Springer Semin. Immunopathol.*, 18, 1-24, 1996). IFN- β 1b rodo in vivo efektyvumą šiuose tinkamuose MS modeliuose. Naudojant šiuos modelius, IFN- β 2 rodė funkcinės savybės, panašias į IFN- β 1b.

Metodikos:

(A) *Pasyviai perduodamas eksperimentinis alerginis encefalomyelitas bandyme su SJL pelėmis*:

Gyvūnai ir medžiagos: 8 savaitių amžiaus SJL pelės (Jackson Laboratories); RPMI 1640 su L-glutaminu ir 25 mM HEPES, 1X, nufiltruotas per 0,1 mikrono filtrą (Life Technologies, Cat #11140-050); 2-merkaptoetanolis, 1000, $5,5 \times 10^{-2}$ M D-PBS'e (Life Technologies, Cat #21985-023); penicilinas/streptomicinas, 10000 U/ μg mililitrui (Bio-Whittaker, Cat #17-602E); Hank'o subalansuotas druskų tirpalas, 1X, nufiltruotas per 0,1 mikrono filtrą (Life Technologies, Cat #24020-117);

Eksperimentas: 8 savaitių amžiaus SJL pelių patelės imunizuojamos 0,1 ml poodine injekcija (padalinama tarp uodegos pradžios ir nugaros vidurio), kurioje yra 150 μg proteolipidinio baltymo ("PLP") pilname Froindo adjuvante ("CFA") su 200 μg M. tuberculosis H37Ra (sutrintos). Po 11 dienų iš pelės išpjaujamos kaklo, žasto ir kirkšnies limfmazgių ląstelės ir auginamos imant 6×10^6 ląstelių/ml tokioje terpėje (į 450 ml RPMI 1640 su L-glutaminu

plius HEPES), pridedama 50 ml FBS, 0,455 ml 2-merkaptoetanolio, 5,0 ml Pen/Strep ir 5,0 ml neesminių aminorūgščių. Į ląsteles pridedama PLP, gaunant galutinę 50 µg/ml koncentraciją). Ląstelės inkubuojamos 72 valandas 37 °C temperatūroje, esant 7 % CO₂. Ląstelės surenkamos ir perplaunamos 2 kartus HBSS. Limfmazgių ląstelių gyvybingumas įvertinamas iš tripano mėlio išskyrimo. Limfmazgių ląstelių koncentracija padaroma 4x10⁷ ląstelių mililitre. 2x10⁷ limfmazgių ląstelių suleidžiama į pilvaplėvę (dozės tūris = 0,5 ml) vienai pelei, imant nenaudotas 8 savaičių amžiaus SJL peles. Pelės sveriamos ir įvertinamos balais kiekvieną dieną. IFN-β2 ir IFN-β1b įvedamas reikiamu būdu. Klinikinis įvertinimas (EAE balas/simptomai): 0/normali; 1/mažai judanti uodega; 2/sunkiai išsitiesia; 3/nepilnas vienos arba abiejų užpakalinių galūnių paralyžius; 4/pilnas vienos arba abiejų užpakalinių galūnių paralyžius; 5/nejudanti, begaištanti arba nugaišusi.

(B) Ūmus eksperimentinis alerginis encefalomyelitas bandyme su Liuiso žiurkėmis:

Gyvūnai ir medžiagos: Liuiso žiurkių patelės (Charles River), imunizuotos 8 savaičių amžiaus; stuburo smegenų homogenato paruošimas (iš Hartley jūrų kiaulyčių patinėlių, Simonsen Labs, Gilroy): 500-700 g jūros kiaulytės numarinamos CO₂. Naudojant aštrias kaulų žirkles perpjaunami stuburo slanksteliai ir išimamos stuburo smegenys, perplaunamos fiziologiniu tirpalu, vieną kartą nuspaudžiamos sugeriamu popieriumi ir laikomos -80 °C temperatūroje iki naudojimo. Po to stuburo smegenys pasveriamos ir homogenizuojamos su fiziologiniu tirpalu pagaminant 1 g/ml fiziologinio tirpalo koncentraciją; antigeno emulsija: jūrų kiaulyčių stuburo smegenų homogenatas sumaišomas 1:1 su CFA (Difco, Detroit, Michigan) su 1 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (sutrintos grūstuvėlio). Į kiekvieną užpakalinės galūnės padą suleidžiama po 0,05 ml, iš viso 0,1 ml pelei.

Eksperimentas: žiurkės imunizuojamos vienkartinė boliuso injekcija pirmą eksperimento dieną. Žiurkės sveriamos ir įvertinamos balais kiekvieną dieną. IFN-β2 ir IFN-β1b įvedamas reikiamu būdu. Klinikinis įvertinimas (EAE balas/simptomai): 0/normali; 1/mažai judanti uodega; 2/nepilnas vienos arba abiejų užpakalinių galūnių paralyžius; 3/pilnas vienos užpakalinės galūnės paralyžius arba abi užpakalinės galūnės gali judėti, bet negali pajudinti kūno;

4/pilnas abiejų užpakalinių galūnių paralyžius; 5/pilnas užpakalinių galūnių paralyžius ir vienos arba abiejų priekinių galūnių silpnumas, begaištanti arba nugaišusi.

Čia duotas aprašymas yra pilnos apimties. Tačiau aprašyme duoti konkretūs jo įgyvendinimo variantai turi būti aiškinami tik kaip iliustraciniai ir jokių būdu neriboja likusios aprašymo dalies. Ištisi visų aukščiau pacituotų paraiškų, patentų ir publikacijų aprašymai čia yra pridedami pilnos apimties kaip literatūros šaltiniai.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Farmacinė kompozicija, tinkanti žinduolių išsėtinei sklerozei gydyti, besiskirianti tuo, kad į ją įeina farmaciškai priimtina pagalbinė medžiaga ir terapiškai efektyvus kiekis fig.2 parodyto žmogaus IFN-β2 polipeptido, jo biologiškai aktyvaus fragmento arba jo biologiškai aktyvaus darinio.
2. Farmacinė kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad jos reikalingas žinduolis yra žmogus.
3. Farmacinė kompozicija, turinti farmaciškai priimtinos pagalbinės medžiagos ir terapiškai efektyvų kiekį fig.2 parodyto žmogaus IFN-β2 polipeptido, jo biologiškai aktyvaus fragmento arba jo biologiškai aktyvaus darinio, skirta panaudoti žinduolių išsėtinės sklerozės gydymui, įvedant ją jos reikalingam žinduoliui.
4. Farmacinė kompozicija pagal 3 punktą, besiskirianti tuo, kad jos reikalingas žinduolis yra žmogus.
5. Farmacinė kompozicija, tinkanti žinduolių išsėtinei sklerozei gydyti, besiskirianti tuo, kad į ją įeina farmaciškai priimtina pagalbinė medžiaga ir terapiškai efektyvus kiekis žmogaus IFN-β2 polipeptido, jo biologiškai aktyvaus fragmento arba jo biologiškai aktyvaus darinio.
6. Farmacinė kompozicija, turinti farmaciškai priimtinos pagalbinės medžiagos ir terapiškai efektyvų kiekį žmogaus IFN-β2 polipeptido, jo biologiškai aktyvaus fragmento arba jo biologiškai aktyvaus darinio, skirta panaudoti žinduolių išsėtinės sklerozės gydymui, įvedant ją jos reikalingam žinduoliui.

1 tttagggtgac actatagaat actcaagctt gactaaatat ttagaaagca catttgtgttc
61 agtgaaactt tgtatataat gaatagaata ataaagatt atgttggatg actagtctgt
121 aattgcctca aggaagcat acaatgaata agttattttg gtacttcctc aaaatagcca
181 acacaatagg gaaatggaga aaatgtactc tgaacaccat gaaaaggga cctgaaaatc
241 taatgtgtaa acttggagaa atgacattag aaacgaaa gacacactctt
301 caaaataatc tgagatgcat gaaaggcaaa cattcactag agctggaatt tccctaagtc
361 tatgcaggga taagtagcat atttgacctt caccatgatt atcaagcact tctttggaac
421 tgtgttgggtg ctgctggcct ctaccactat cttctctcta gatttgaaac tgattatctt
481 ccagcaaaaga caagtgaatc aagaaagttt aaaactcttg aataagttgc aaaccttgtc
541 aattcagcag tgtctaccac acaggaaaaa ctttctgctt cctcagaagt ctttgagtcc
601 tcagcagtac caaaaaggac acactctggc cattctccat gagatgcttc agcagatctt
661 cagcctcttc agggcaaaata tttctctgga tggttgggag gaaaaccaca cggagaaaat
721 cctcattcaa ctcatcaac agctagaata cctagaagca ctcatgggac tggaaagcaga
781 gaagctaagt ggtactttgg ttagtgataa ccttagatta caagttaaaa tgtacttcg
841 aaggatccat gattacctgg aaaaccagga ctacagcacc tgtgctggg ccattgtcca
901 agtagaaatc agccgatgtc tgttctttgt gttcagtctc acagaaaaac tgagcaaaaca
961 aggaagaccc ttgaacgaca tgaagcaaga gcttactaca gagtttagaa gcccgaggta
1021 ggtggaggga ctagaggact tctccagaca tgattcttca tagagtggta atacaattta
1081 tagtacaatc acattgcttt gattttgtgt atatatatat ttatctgtgt tttaaagattg
1141 tgcataatga ccacaattgt ttttattttg taatgtggct ttatatatto tatccatttt
1201 a

FIG. 1

MIKHFFGTVLVLLASTTIFSLDLKLIIFQQRQVNQESLKLNLKQLTSLIQQCLPH
RKNFLLPKSLSPQQYQKGHTLAILHEMLQQIFSLFRANISLDGWEENHTEK
FLIQLHQQLEYLEALMGLEAEKLSGTLGSDNLRLOVKMYFRRIHDYLENQD
YSTCAWAIVQVEISRCLFFVFSLTEKLSKQGRPLNDMKQELTTEFRSPR

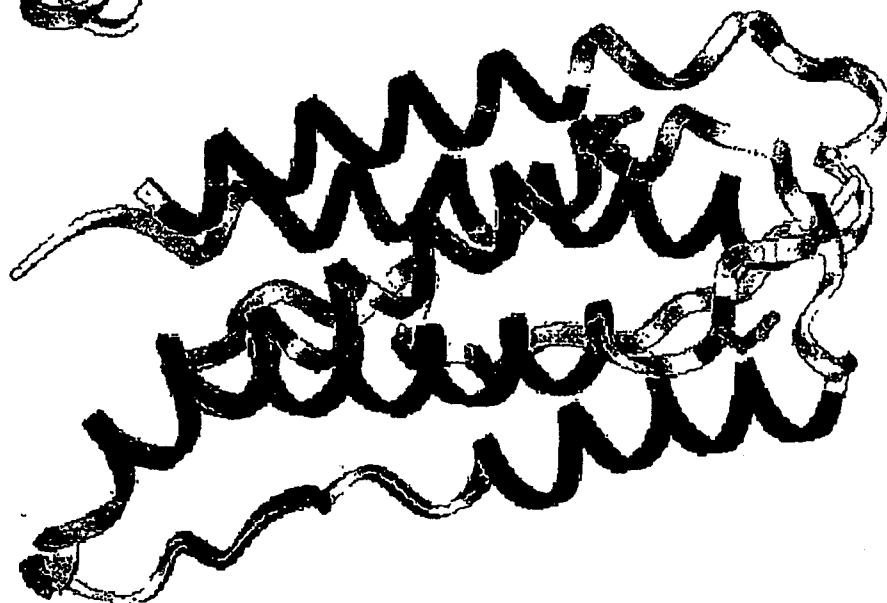
FIG. 2



IFN α



IFN β



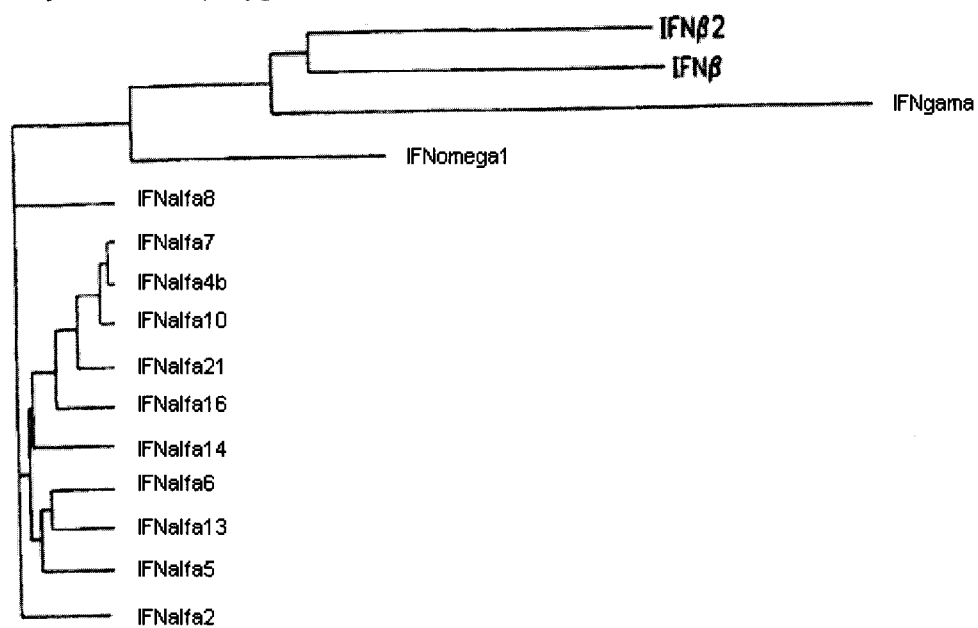
IFN β 2

FIG. 3

	1		70
IFNB2	(1)	MI IKHFGT VLVLLASTTIFSLDLKLIIFQQRQVNVQESLKLNLKQ-TLSIQQCLPHRKNFLLPQKSLSP	
IFNB	(1)	MTNKCLLQIALLLCTSTTALSMSYNLLGFLQSSNFQCKLLWQLNGRLEY--CLKDRHNFDIPEEIKQL	
IFNalfa8	(1)	MALTFYLLVALVLSYKSFSSLGCDLPQTHS-LGNRRALILLAQMR-RISPFSCCLKDRHDFEFPQEEFDD	
IFNalfa7	(1)	MARSFSLMVVLVLSYKSLGCDLPQTHS-LGNRRALILLAQMR-RISPFSCCLKDRHDFEFPQEEFDD	
IFNalfa6	(1)	MALPFALLMALVVLSCSSCSLDCDLPQTHS-LGHRRTMMLLAQMR-RISLFSCLKDRHDFRFPQEEFDD	
IFNalfa5	(1)	MALPFVLLMALVVLNCKSLGCDLPQTHS-LGNRRALILLAQMR-RISPFSCCLKDRHDFRFPQEEFDD	
IFNalfa4b	(1)	MALSFSLLMAVLVLSYKSLGCDLPQTHS-LGNRRALILLAQMR-RISHFSCCLKDRHDFRFPQEEFDD	
IFNalfa21	(1)	MALSFSLLMAVLVLSYKSLGCDLPQTHS-LGNRRALILLAQMR-RISPFSCCLKDRHDFRFPQEEFDD	
IFNalfa2	(1)	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVGCCLPQTHS-LGSRRTLMMLLAQMR-RISLFSCLKDRHDFRFPQEEFDD	
IFNalfa16	(1)	MALSFSLLMAVLVLSYKSLGCDLPQTHS-LGNRRALILLAQMR-RISHFSCCLKDRHDFRFPQEEFDD	
IFNalfa14	(1)	MALPFALLMALVVLSCSSCSLGCNLSQTHS-LGNRRALILLAQMR-RISPFSCCLKDRHDFRFPQEEFDD	
IFNalfa13	(1)	MALPFALLMALVVLSCSSCSLGCCLPETHS-LGNRRALILLAQMR-RISPFSCCLKDRHDFRFPQEEFDD	
IFNalfa10	(1)	MALSFSLLMAVLVLSYKSLGCDLPQTHS-LGNRRALILLAQMR-RISPFSCCLKDRHDFRFPQEEFDD	
IFNomega1	(1)	MALLFPLLAALVMTSYSPVGLGCDLPQTHS-LGSRRTLMMLLAQMR-RISLFSCLKDRHDFRFPQEEFDD	
IFNgama	(1)	MKYT-SYILAFQLCTVLSGLGCYCPDPYVKE-----AENLKYPFNAG-----H--SDVADNGTLF--LGILK	
Konsensas	(1)	MAL F LLMALLVLS KS CSLGCDLPQTHS L NRR L LLAQM RISPFSCCLKDRHDF FFPQEEFDD	
	71		140
IFNB2	(70)	QQYQKGHTIAILHEMLQQIFSLFRANISLDGWEENHTEKFLIQLHQQLEYLEALMGLEAEKLSCTLGSDN	
IFNB	(69)	QQFQKEDAAITTYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLM	
IFNalfa8	(69)	KQFQKAQAISVLHEMIQQTFFNLSTKDSAAALDETLDEPHYELDQQLNDLES CVMQEVGVIESPLMYED	
IFNalfa7	(69)	HQFQKTQAISVLHEMIQQTFFNLSTEDSSAAWEQSLEKPFSTELYQQLNDLEACVQEVGVIESPLMYED	
IFNalfa6	(69)	NQFQKAQAISVLHEMIQQTFFNLSTKDSAAWDEKLLDKLYTELYQQLNDLEACVQEVGVIESPLMYED	
IFNalfa5	(69)	NQFQKAQAISVLHEMIQQTFFNLSTKDSAAWDETLDDKFTTELYQQLNDLEACVQEVGVIESPLMYED	
IFNalfa4b	(69)	HQFQKTQAISVLHEMIQQTFFNLSTEDSSAAWEQSLEKPFSTELYQQLNDLEACVQEVGVIESPLMYED	
IFNalfa21	(69)	NQFQKAQAISVLHEMIQQTFFNLSTKDSAAWDEKLLDKFTTELYQQLNDLEACVQEVGVIESPLMYED	
IFNalfa2	(68)	NQFQKAETIPVLHEMIQQTFFNLSTKDSAAWDETLDDKFTTELYQQLNDLEACVQEVGVIESPLMYED	
IFNalfa16	(69)	NQFQKAQAISAPHEMIQQTFFNLSTKDSAAWDETLDDKFTTELYQQLNDLEACVQEVGVIESPLMYED	
IFNalfa14	(69)	NQFQKAQAISVLHEMIQQTFFNLSTKDSAAWDETLLEKFTTELYQQLNDLEACVQEVGVIESPLMYED	
IFNalfa13	(69)	NQFQKAPPAISVLHEMIQQTFFNLSTKDSAAWDETLDDKFTTELYQQLNDLEACVQEVGVIESPLMYED	
IFNalfa10	(69)	NQFQKAQAISVLHEMIQQTFFNLSTEDSSAAWEQSLEKPFSTELYQQLNDLEACVQEVGVIESPLMYED	
IFNomega1	(69)	SQLQKAHVMSVLHEMLQQIFSLFHTERSAAWNMTLLDQLHTGLHQLQLHLETCLLQVVGEGESAGAISS	
IFNgama	(58)	NWKEESDRKIMQSIVSFPYFKLPKNFKD-----DQS-IQKSVETIKEDMN-VKFPNSNKKKRDDEKLTNY	
Konsensas	(71)	NQFQKAQAISVLHEMIQQTFFNLSTKDSAAWDE LLDKF TELYQQLNDLEACV QEVGVIESPLMYED	
	141		210
IFNB2	(140)	LRLQVKMYFRRIHDYLE-NQDYSTCAWAIVQVEISRCLFFVPSLTKLSKQGRPLNDMKQELTTEFRSPR	
IFNB	(139)	SSLHLKRYGRIILHYLK-AKEYSHCAWTIVRVEILRNPFYFINELTGYLEN-----	
IFNalfa8	(139)	SILAVRKYFQRITLYLT-EKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSNLQKRLRSKE-----	
IFNalfa7	(139)	FILAVRKYFQRITLYLM-EKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSPSTNLKGLRRKD-----	
IFNalfa6	(139)	SILAVRKYFQRITLYLT-EKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSSSNLQERLRKE-----	
IFNalfa5	(139)	SILTVRKYFQRITLYLT-EKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSNLQERLRKE-----	
IFNalfa4b	(139)	SILAVRKYFQRITLYLT-EKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD-----	
IFNalfa21	(139)	SILAVRKYFQRITLYLT-EKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSKIFQERLRKE-----	
IFNalfa2	(138)	SILAVRKYFQRITLYLK-EKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQERLRKE-----	
IFNalfa16	(139)	SILAVRKYFQRITLYLM-EKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSPSTNLQKGLRRKD-----	
IFNalfa14	(139)	SILAVRKYFQRITLYLM-EKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSPSTNLQKGLRRKD-----	
IFNalfa13	(139)	SILAVRKYFQRITLYLT-EKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRKE-----	
IFNalfa10	(139)	SILAVRKYFQRITLYLI-EKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQKGLRRKD-----	
IFNomega1	(139)	PALTLLRYFQGIIVYLK-EKKYSDCAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQERLRKE-----	
IFNgama	(122)	SVTDLVQRKAIHELIVMAELSPAAGTKGR-----KRSQML----FRGRASQ-----	
Konsensas	(141)	SILAVRKYFQRITLYL EKKYSPCAWEVVRAEIMRSFS STNLQ RLRRK	

FIG. 4

Baltymo kiekio palyginimas



Nukleotido kiekio palyginimas

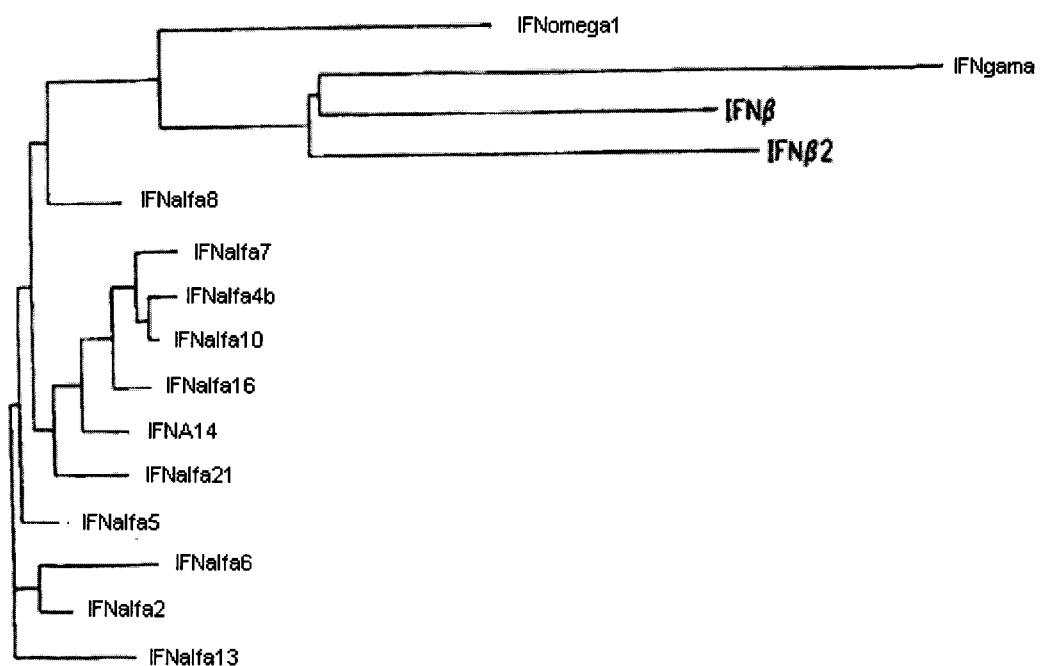


FIG. 5

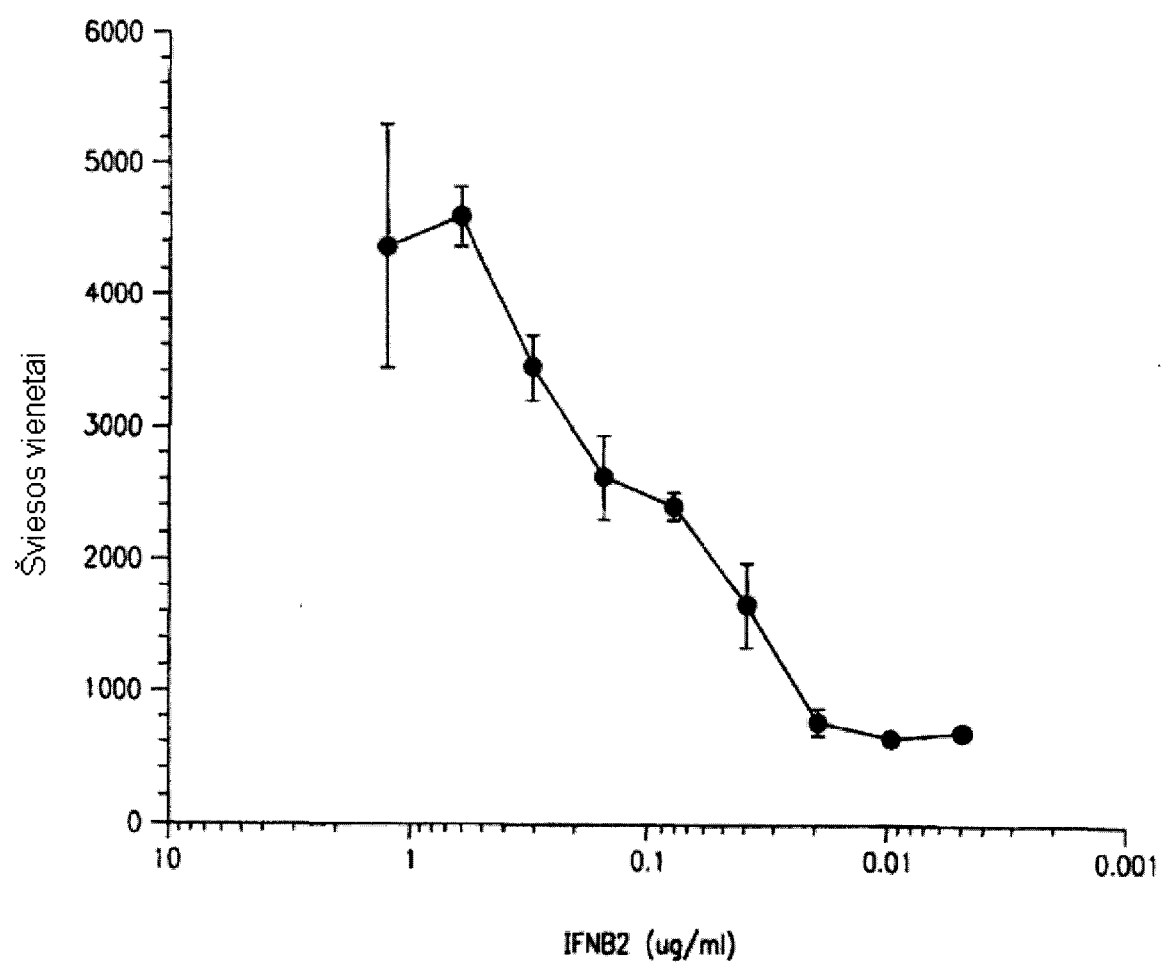


FIG. 6

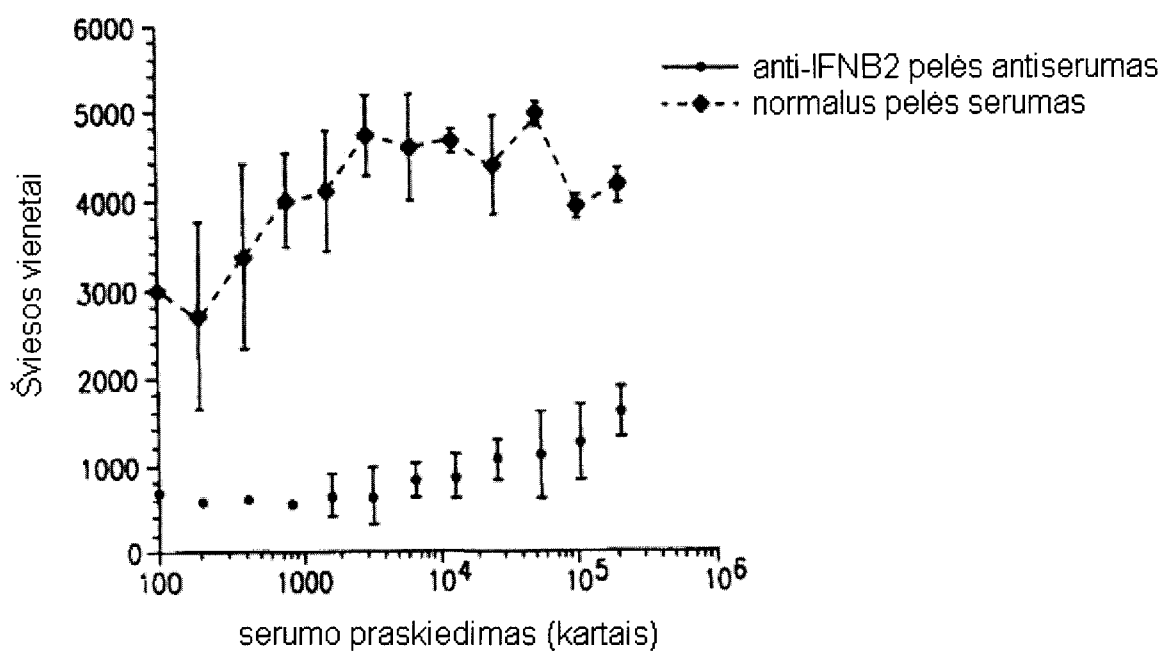


FIG. 7

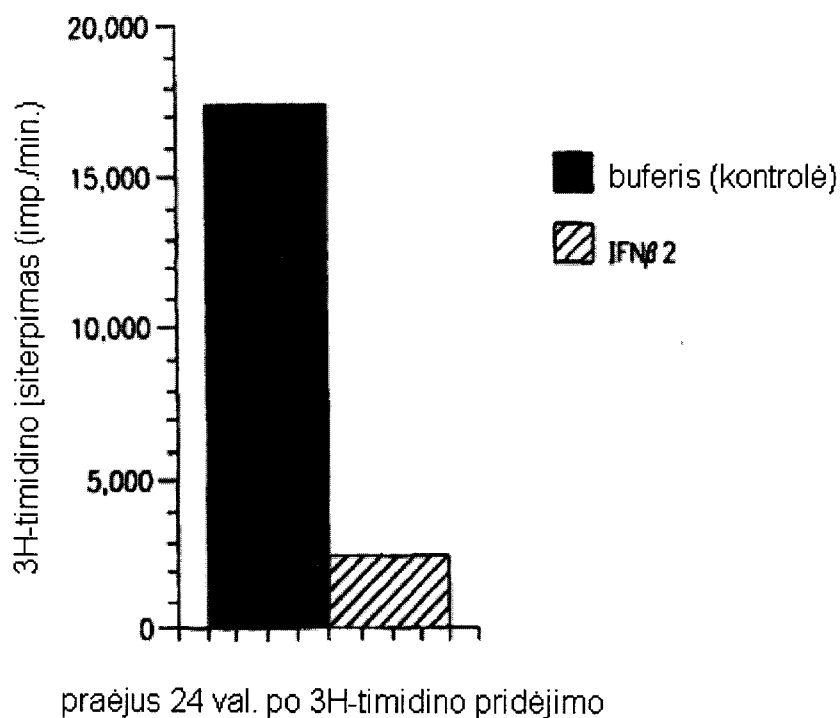


FIG. 9

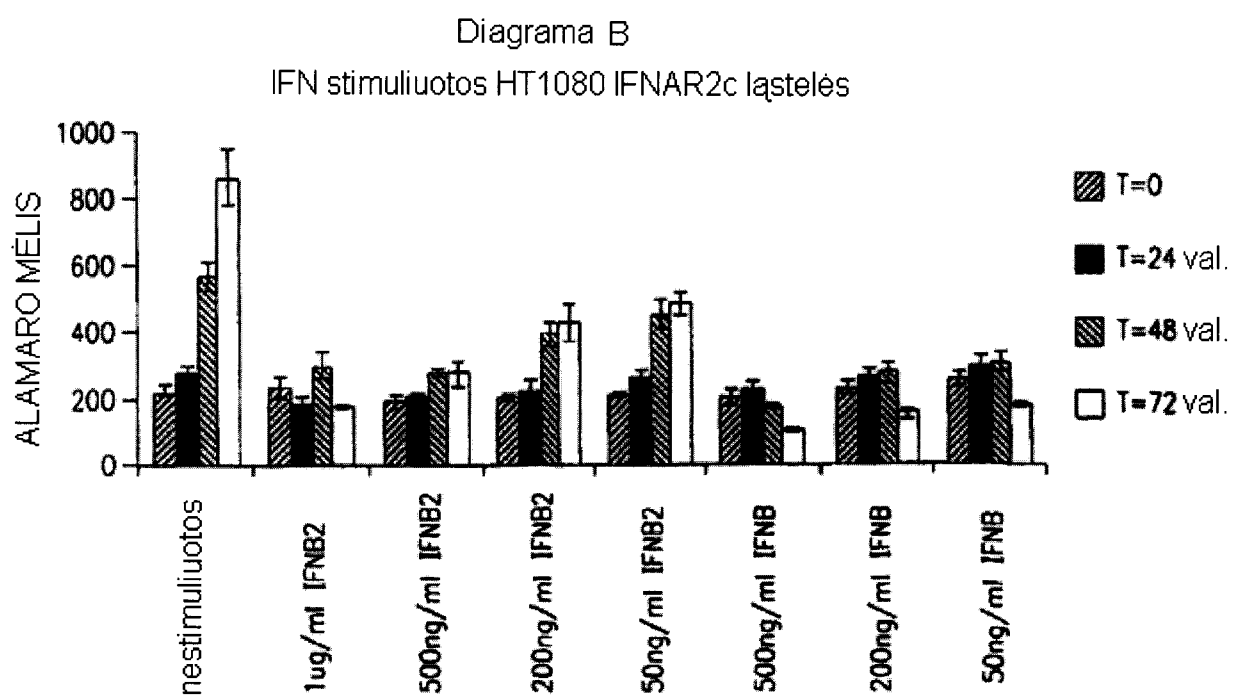
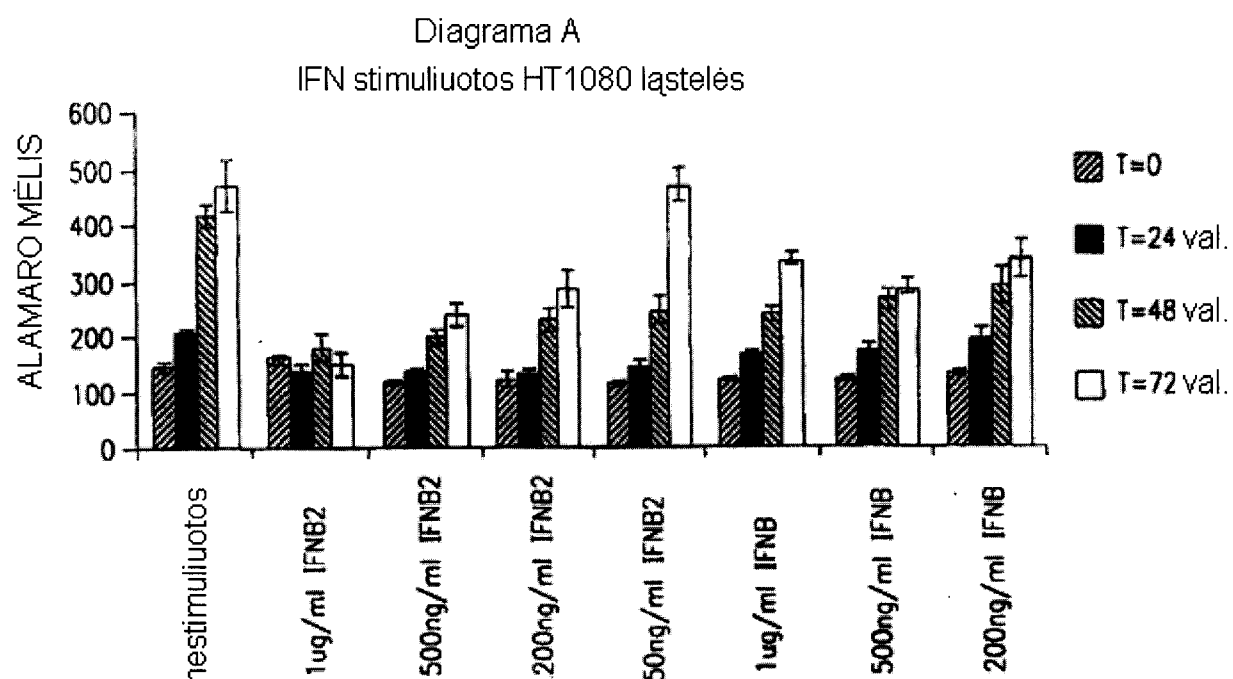


FIG. 8

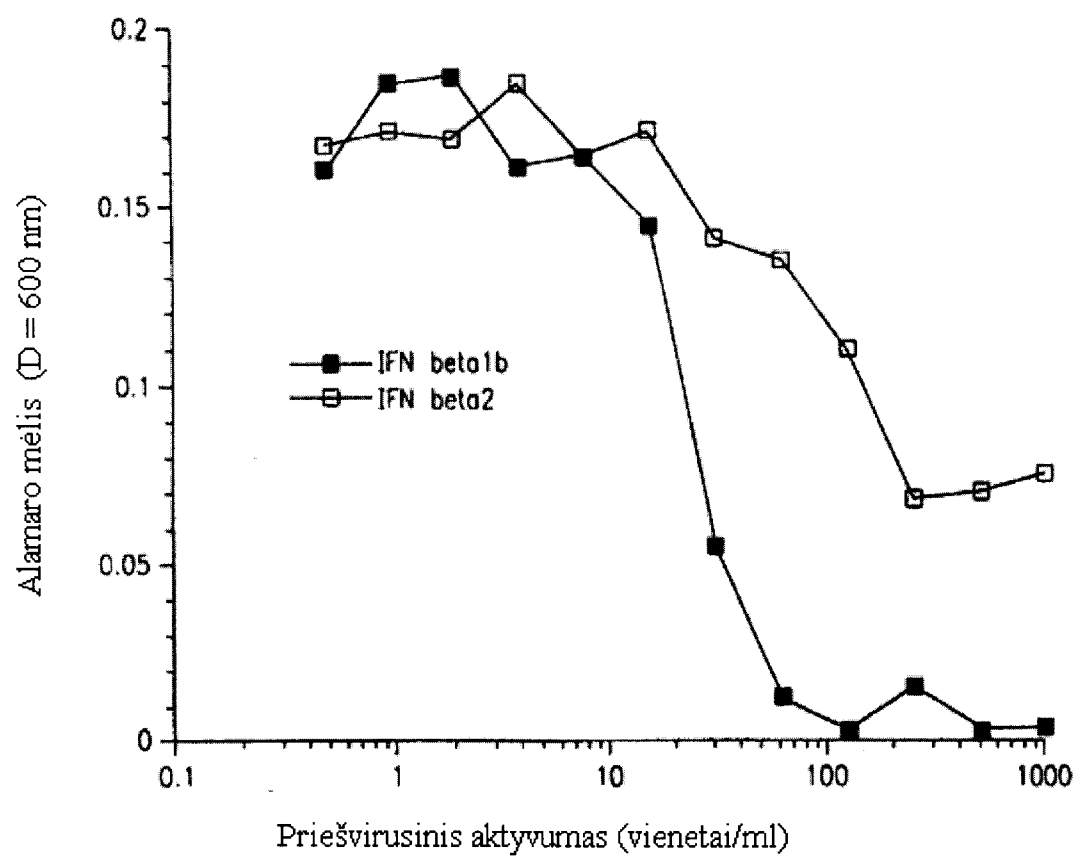


FIG. 10

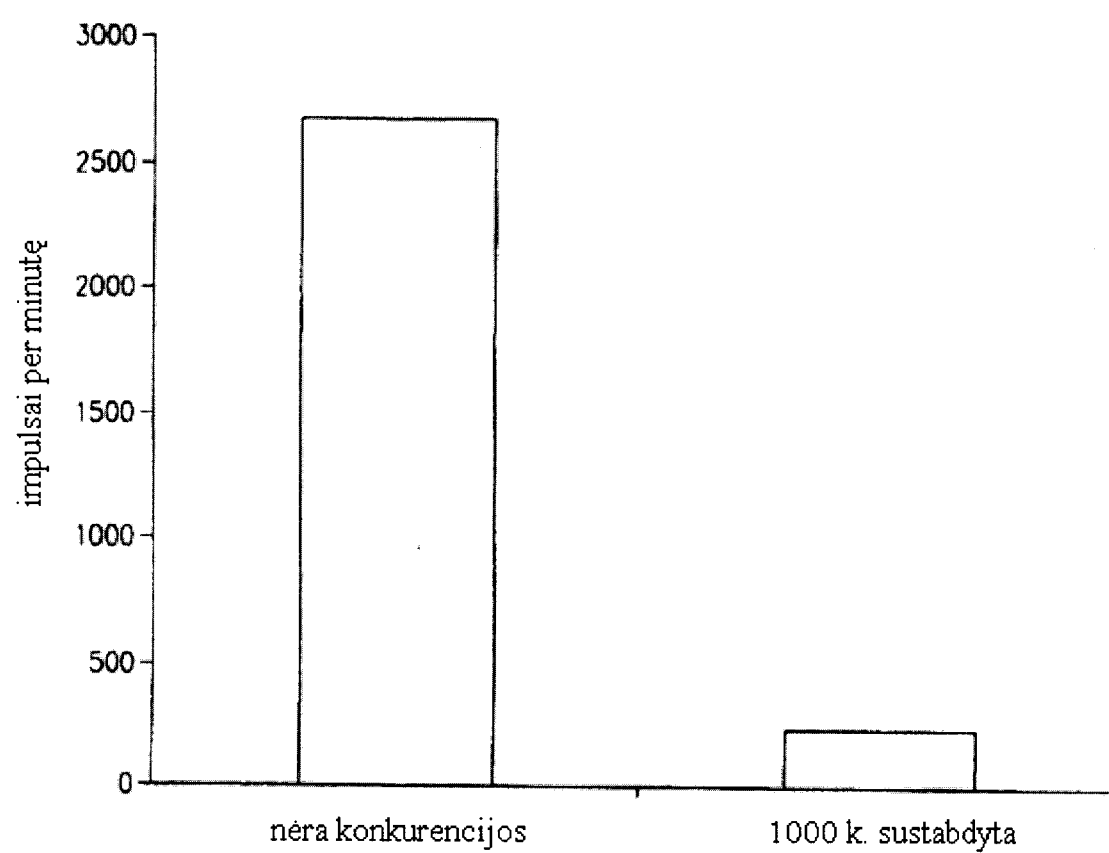


FIG. 11

1 tttaggtgac actatagaat actcaagctt gactaaatat ttagaaagca catttgtttc
61 agtgaaactt tgtatataat gaatagaata ataaaagatt atgttgatg actagtctgt
121 aattgcctca aggaaagcat acaatgaata agttattttg gtacttcctc aaaatagcca
181 acacaatagg gaaatggaga aaatgtactc tgaacacccat gaaaaggga cctgaaaatc
241 taatgtgtaa acttggagaa atgacattag aaacgaaag ctacaaaaga gaacactctt
301 caaaaataatc tgagatgcat gaaaggcaaa cattcactag agctgggaatt tccctaagtc
361 tatgcaggga taagtagcat atttgacctt cacc

FIG. 12

361
421 tggttggtg ctgctggcct ctaccactat ctctctcta gattgaaac tgattatctt
481 ccagcaaaga caagtgaatc aagaaagttt aaaactcttg aataagttgc aaaccttgtc
541 aattcagcag tgtctaccac acaggaaaaa cttcttgctt cctcagaagt ctttgagtcc
601 ttaactgtac caaaaaggac acactctggc cattcttcat gagatgct
atgatt atcaagcact tctttggaac

FIG. 13

MIKHFFGTVLVLLASTTIFSLDLKLIIFQQRQVNQESLKNLKLQTL SIQ
QCLPHRKNFLLPQKSLSP

FIG. 14

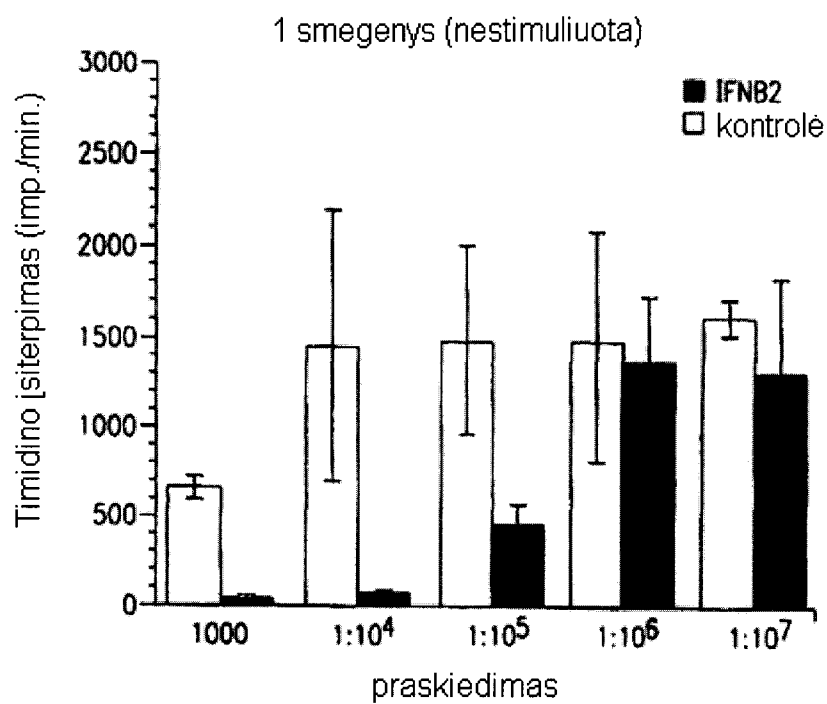


FIG. 15A

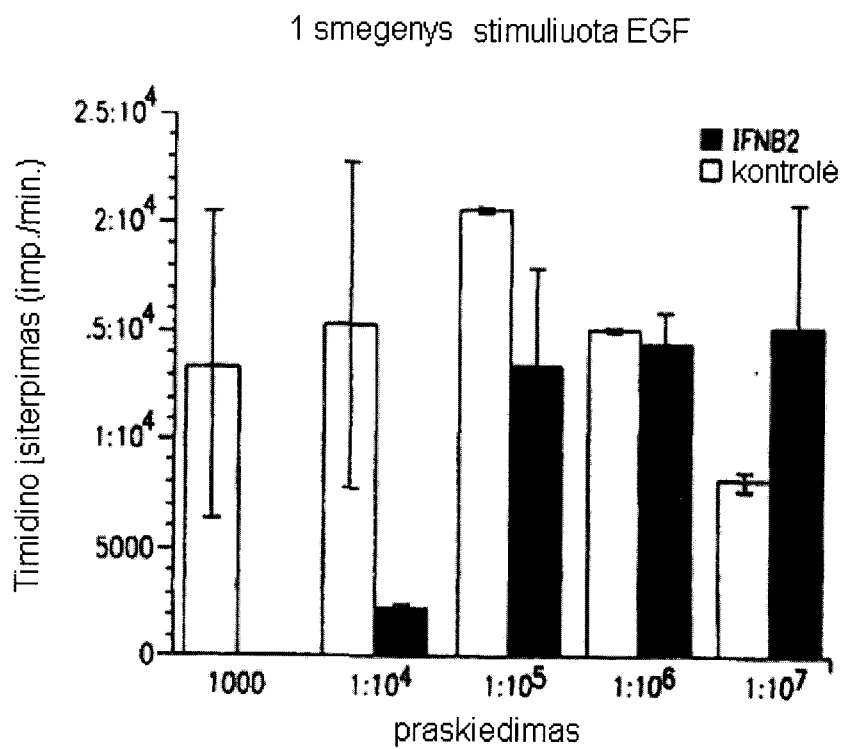


FIG. 15B

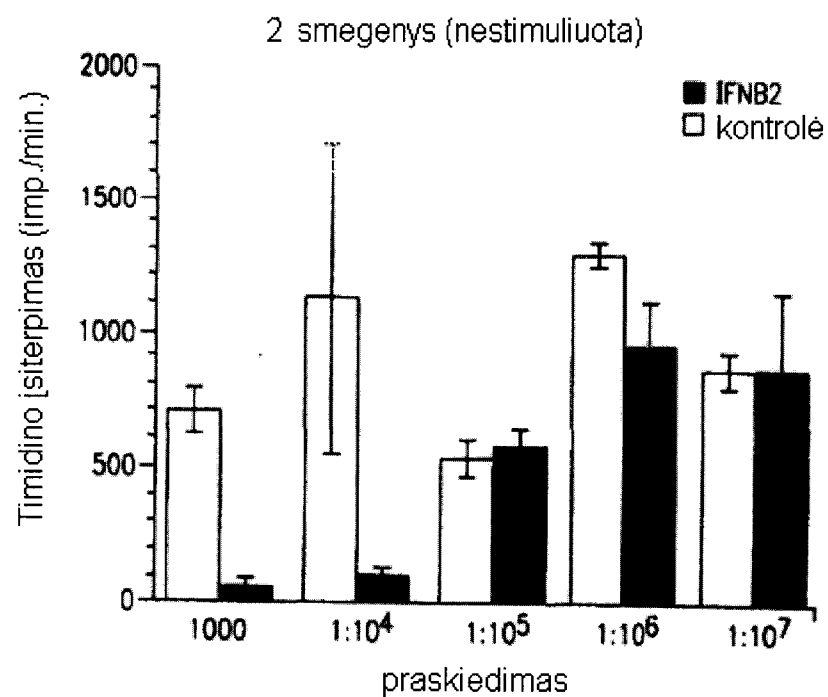


FIG. 15C

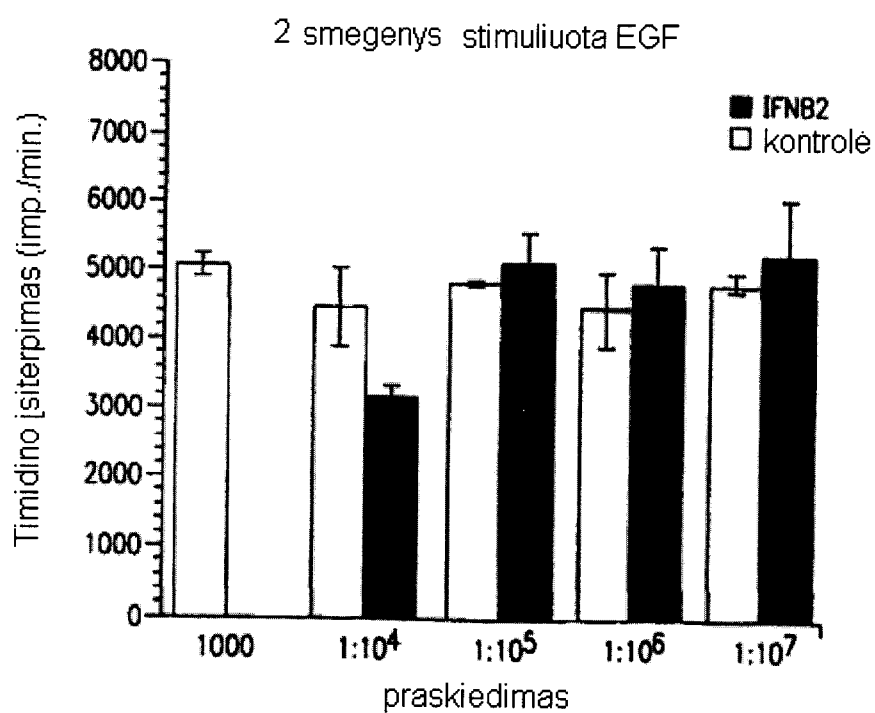


FIG. 15D