

(19)



(10) **LT 2003 016 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **2003 016** (51) Int. Cl. (2006): **A61K 45/00**
A61K 35/66
(22) Paraiškos padavimo data: **2003 02 17** **A61K 38/00**
A61K 38/17
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2003 10 27** **A61K 38/21**
A61K 38/22
(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: — **A61K 48/00**
A61P 7/00
(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US01/41412** **A61P 9/00**
A61P 35/00
(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2001 07 26** **A61P 43/00**
(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2003 02 17**
(30) Prioritetas: **60/220.844, 2000 07 26, US**
09/912.252, 2001 07 25, US
(71) Pareiškėjas:
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, 13342 Berlin, DE
(72) Išradėjas:
Ed CROZE, US
David VOGEL, US
Dean RUSSELL-HARDE, US
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
—

- (54) Pavadinimas:
Interferono 2c receptoriaus polipeptidinės grandinės panaudojimas I tipo interferonų augimo slopinimo poveikiams sustiprinti
(57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su I tipo interferono (IFN) augimo slopinimo poveikių į tikslines ląstelių populiacijos ląsteles sustiprinimo būdu, apimančiu funkcinį IFNAR2c receptorių ant modifikuotų ląstelių paviršiaus tikslinėje ląstelių populiacijoje skaičiaus padidinimą ir tada šių modifikuotų ląstelių veikimą terapiškai efektyviu kiekiu I tipo IFN arba veikimą endogeniškai produkuotu IFN.

INTERFERONO 2c RECEPTORIAUS POLIPEPTIDINĖS GRANDINĖS PANAUDOJIMAS I TIPO INTERFERONŲ AUGIMO SLOPINIMO POVEIKIAMS SUSTIPRINTI

Išradimo kilmė

Interferonai, kurie iš pradžių buvo aprašyti kaip faktoriai, sutrukdantys atsirasti virusinėms infekcijoms, buvo plačiai tyrinėjami nuo pat jų atradimo 1957 metais. Dabartiniu metu interferonai (IFN) yra pripažinti bendra dalimi organizmo gynybinės sistemos, ir jie yra sėkmingai naudojami kaip terapiniai agentai įvairių žmogaus ligų gydymui. Interferonai yra skirstomi į dvi klases, pavadintas I arba II tipo interferonais. I tipo IFN apima giminingų baltymų šeimą (IFN α , IFN β , IFN ω , IFN τ ir IFN δ), o II tipo IFN susideda iš vieno baltymo (IFN γ), kuris turi ribotą homologiją su I tipo IFN.

Yra žinoma, kad du receptoriniai baltymai – IFNAR1 ir IFNAR2 - dalyvauja surišant I tipo IFN.

Išradimo aprašymas

Šis išradimas yra susijęs su efektorinių ligandų poveikio sustiprinimo būdais, didinant funkcinų receptorių skaičių receptoriniams ligandams ant ląstelės paviršiaus. Čia vartojamas terminas "didinant funkcinų receptorių skaičių" reiškia bet kokią funkcinų receptorių ekspresijos apimtį, viršijančią apimtį, kurią paprastai ekspresuoja ląstelė. Taigi, tokį padidinimą galima gauti didinant bendrą skaičių receptorinių baltymų ant ląstelės paviršiaus arba pakeičiant nefunkcinį receptorinį baltymą funkciniu receptoriniu baltymu, kaip antai panaudojant mutagenezę. Čia naudojamas terminas "poveikio sustiprinimas" reiškia bet kokį efektorinio ligando efektų sustiprinimą.

Vienu aspektu šis išradimas yra susijęs su efektorinio ligando ant tikslinių ląstelių populiacijos, apimančios auglio ląsteles, poveikio sustiprinimo būdu, didinant funkcinų receptorių skaičių efektoriniams ligandams ant modifikuotų ląstelių ląstelės paviršiaus tikslinėje ląstelių populiacijoje ir tada

veikiant modifikuotas ląsteles terapiškai efektyviu kiekiu efektorinio ligando. Čia naudojamas terminas "tikslinė ląstelių populiacija" gali apimti vieną arba daugiau ląstelių, o "modifikuotos ląstelės tikslinėje ląstelių populiacijoje" gali apimti vieną arba daugiau tikslinės ląstelių populiacijos ląstelių.

Kitu aspektu šis išradimas yra susijęs su IFN poveikio į tikslinę ląstelių populiaciją stiprinimo būdu, didinant funkcinių receptorių IFN skaičių ant modifikuotų ląstelių paviršiaus tikslinėje ląstelių populiacijoje ir po to veikiant modifikuotas ląsteles terapiškai efektyviu IFN kiekiu. Į IFN poveikius įeina, pavyzdžiui, priešvirusiniai efektai, augimo slopinimo efektai ir imunoreguliaciniai efektai. Pavyzdžiui, buvo rasta, kad didinant IFNAR2c polipeptido ekspresiją ant ląstelių paviršiaus tikslinėje ląstelių populiacijoje, yra stiprinami I tipo IFN poveikiai į šios tikslinės populiacijos ląsteles. Konkrečiau, didinant skaičių funkcinių receptorių I tipo IFN ant modifikuotų ląstelių paviršiaus tikslinėje ląstelių populiacijoje, gali būti sustiprinamas I tipo IFN augimo slopinimo efektas į šią tikslinę ląstelių populiaciją.

Čia naudojamas terminas "augimo slopinimo efektas" apima antiproliferacinius ir apoptozinius poveikius, o taip pat bet kokius poveikius, kurie sukelia ląstelių žūtį, sulaiko ląstelių augimą arba sulėtina ląstelių augimą. Čia naudojamas terminas "antiproliferaciniai poveikiai" apima, pavyzdžiui, ląstelių ciklo sustabdymą arba ląstelių ciklo laiko pailginimą bei apoptozės induktorių indukciją, baltymų sintezės, DNR sintezės arba RNR sintezės supresijos faktorių indukciją arba metabolinių kelių inhibitorių aktyvaciją.

Nenorėdami apsiriboti kokia nors su išradimu susijusia teorija, išradėjai mano, kad I tipo IFN tiesiogiai veikia į ląsteles, didindamas IFNAR2c ekspresiją ir taip išgaudamas šiuos augimo slopinimo efektus. Tačiau, kaip šio išradimo dalis, taip pat turima omenyje tai, kad vietoj tiesioginio efekto arba apart tiesioginio efekto, I tipo IFN gali demonstruoti augimo slopinimo efektus per "pašalinio stebėtojo" poveikį, kur I tipo IFN veikia į ląsteles didindamas IFNAR2c ekspresiją ir taip išgaudamas faktoriaus, kuris turi augimo slopinimo poveikį į kaimynines ląsteles, sekreciją.

Taigi, šis išradimas yra susijęs su I tipo IFN augimo slopinimo efektų į tikslinę ląstelių populiaciją poveikio sustiprinimo būdais, didinant skaičių funkcinio IFNAR2c receptoriaus grandinių, ekspresuotų ant modifikuotų

ląstelių paviršiaus tikslinėje ląstelių populiacijoje, ir tada veikiant šias modifikuotas ląsteles terapiškai efektyviu kiekiu bent vieno efektorinio ligando, kuris rišasi su I tipo IFN receptoriumi. Funkcinio IFNAR2c receptoriaus grandinių ant ląstelės paviršiaus skaičiaus didinimas taip pat yra laikomas šio išradimo dalimi. Tinkamiausias efektorinis ligandas, kuris rišasi su I tipo IFN receptoriumi, yra I tipo IFN.

Čia naudojamas terminas “modifikuotos ląstelės” reiškia ląsteles, kurios buvo modifikuotos taip, kad ekspresuotų padidintus kiekius funkcinio receptoriaus efektoriniam ligandui ant ląstelės paviršiaus. Modifikuotomis ląstelėmis gali būti ląstelės, kurios buvo modifikuotos *in vivo* arba *ex vivo* taip, kad jos ekspresuotų padidintus kiekius funkcinio receptoriaus receptoriui ligandui. Modifikuotos ląstelės, kurios buvo modifikuotos *ex vivo*, gali būti po to perkeltos į tikslinių ląstelių populiaciją po *ex vivo* modifikacijos. Modifikuotomis ląstelėmis taip pat gali būti natūraliai atsirandančios ląstelės, kurios ekspresuoja santykinai didelius kiekius efektorinio ligando receptoriaus ir kurios yra pridamos prie tikslinių ląstelių populiacijos.

Čia naudojamas terminas “efektorinis ligandas” reiškia bet kokią molekulę, kuri rišasi su efektorinio ligando receptoriumi ir kuri pasiekia bent jau dalinę efektorinio ligando receptoriaus aktyvaciją. Efektoriniais ligandais yra, bet jais neapsiribojama, natūraliai atsirandantys efektoriniai ligandai, modifikuoti efektoriniai ligandai, chimeriniai efektoriniai ligandai, efektorinio ligando imitatoriai arba antikūnai prieš efektorinio ligando receptorių.

Tinkamiausiais efektoriniais ligandais yra, pavyzdžiui, augimo faktoriai, citokinai, chemotaktiniai faktoriai ir hematopoietiniai faktoriai. Konkrečiau, tinkamiausiais efektoriniais ligandais yra, bet jais neapsiribojama, tokie ligandai: IFN; auglio nekrozės faktoriai (TNF), pavyzdžiui, $TNF\alpha$, $TNF\beta$; interleukinai (IL), pavyzdžiui, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 ir IL-13; kolonijų susidarymą stimuliuojantys faktoriai (CSF), pavyzdžiui, granulocitų-makrofagų-CSF (GM-CSF), monocitų-CSF (M-CSF), granulocitų-CSF (G-CSF); eritropoietinas (EPO); kamieninių ląstelių faktorius (SCF); leukemijos inhibicijos faktorius (LIF); epidermio augimo faktorius (EGF), onkostatinas M (OSM), chemokinių receptorių 1 arba 5 (CCR1 arba CCR5), ir t.t.

Ypatingai tinkamas efektorinis ligandas yra efektorinis ligandas, kuris rišasi su I tipo IFN receptoriumi, įskaitant I tipo IFN. Čia naudojamas terminas "I tipo IFN" apima IFN α , IFN β , IFN ω , IFN τ ir IFN δ arba bet kokį naujai atrastą I tipo IFN; visi jie gali būti naudojami pagal šį išradimą. Pagal šį išradimą gali būti naudojami be tokio subtipo I tipo IFN, pasižymintys, pavyzdžiui, augimo slopinimo aktyvumu, antivirusiniu aktyvumu arba imunoreguliaciniu aktyvumu. Šis subtipas gali būti atsirandantis natūraliai arba rekombinantinis subtipas, įskaitant dviejų arba daugiau subtipų hibridus arba jų analogus. Augimo slopinimo aktyvumas gali būti nustatytas panaudojant bet kokią metodiką, kuri yra gerai žinoma specialistams, įskaitant toliau duotuose pavyzdžiuose aprašytas metodikas (*Methods in Enzymology*, Vol.119, ed. Sidney Pestka). Pageidautina, kad išradime naudojamas I tipo IFN turėtų tokį augimo slopinimo aktyvumą, kad timidino įsiterpimas į HT1080 ląsteles po 24 valandų inkubavimo su optimalios koncentracijos IFN būtų inhibuojamas 5 %, geriau 10 %, dar geriau 15 %. Taip pat gali būti naudojami įvairių subtipų mišiniai. Geriau, kad šiame išradime naudojamo I tipo IFN būtų IFN α ir IFN β , įskaitant, bet neapsiribojant, tokius: IFN β subtipus, įskaitant, bet neapsiribojant, IFN β 1b ir IFN β 1a; IFN α subtipus, įskaitant, bet neapsiribojant, IFN α 2, IFN α 5, IFN α 13, IFN α 6, IFN α 14, IFN α 16, IFN α 21, IFN α 10, IFN α 46, IFN α 7 ir suderintinius alfa IFN. IFN pavyzdžiais, kurie gali būti naudojami ryšium su šiuo išradimu, yra, bet jais neapsiribojama, tokie: Gali būti naudojamas IFN β 1b "betaseronas" – rekombinantiniu būdu pagamintas žmogaus IFN β , kuriame 17 padėtyje esanti cisteino liekana yra pakeista serinu, kaip aprašyta JAV patente Nr. 4588585. Be to, taip pat gali būti naudojamas rekombinantiniu būdu pagamintas IFN β 1a, kuris yra produkuojamas kuniškojo žiurkėno kiaušidžių (CHO) ląstelėse. Iš IFN α tipo gali būti naudojami žmogaus alfa-IFN produktai: Intron® (Schering-Plough), Roferon® (Hoffman-LaRoche) ir Infergen® (Amgen). Kiti galimi naudoti IFN yra suderintinio I tipo alfa IFN, aprašyti, pavyzdžiui, JAV patentuose Nr. 4695623, 4897471 ir 5541293. Interferonai, naudojami kaip šio išradimo dalis, taip pat gali būti modifikuoti, sujungiant juos su kitomis molekulėmis, tokie kaip aprašyti, pavyzdžiui, JAV patente Nr. 5981709.

Kaip dalis šio išradimo, turima omenyje, kad funkcinių efektorinių ligandų receptorių skaičius ant modifikuotos ląstelės paviršiaus gali būti padidintas panaudojant daugelį įvairiausių būdų. Pavyzdžiui, IFNAR2c receptorinių baltymų ant ląstelės skaičiui padidinti gali būti naudojama IFNAR2c geno genų ekspresijos aktyvacija. Genų ekspresijos aktyvacija gali būti vykdoma, pavyzdžiui, įvedant egzogeninį polinukleotidą, koduojantį IFNAR2c polipeptidą, į modifikuotas ląsteles arba pozityviai veikiant endogeninio IFNAR2c geno arba egzogeninio IFNAR2c geno genų transkripciją modifikuotose ląstelėse. Pavyzdžiui, genų ekspresijos aktyvacija gali būti vykdoma tiesiogiai arba netiesiogiai stimuliuojant promotoriaus arba kitas reguliacines sekas, arba aktyvuojant genus, kurie stimuliuoja IFNAR2c polipeptido produkavimą. Pavyzdžiui, IFNAR2c geno promotoriui stimuliuoti gali būti naudojamos mažos molekulės. Mažos molekulės, kurios aktyvuoja transkripciją, gali būti nustatytos specialistams gerai žinomu būdu. Be to, informacinės RNR, koduojančios IFNAR2c baltymą, stabilumui padidinti arba IFNAR2c polipeptido stabilumui padidinti gali būti naudojami įvairūs specialistams gerai žinomi būdai.

Tinkamiausias būdas funkcinių IFNAR2c polipeptidų ant modifikuotų ląstelių paviršiaus skaičiui padidinti yra bent vieno egzogeninio polinukleotido, koduojančio IFNAR2c polipeptidą, įvedimas į modifikuotas ląsteles. Pagal šį išradimą gali būti naudojamas bet koks egzogeninis IFNAR2c genas, įskaitant, pavyzdžiui, žmogaus IFNAR2c geną arba bet kokio kito žinduolio, tokio kaip pelė, žiurkė ir t.t., IFNAR2c geną. Geno, koduojančio pilno ilgio žmogaus IFNAR2c polipeptidą, DNR seka ir atitinkama aminorūgščių seka yra aprašyta Lutfall et al., 1995, *EMBO J.* 14(20):5100-5108; Domanski et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270:21606-21611; ir ten duotos SEQ ID NOS.3 ir 4. Geno, koduojančio pilno ilgio pelės IFNAR2c polipeptidą, DNR seka ir atitinkama aminorūgščių seka yra parodyta Owezarek et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:23865-23870 ir ten duotos sekos SEQ ID NOS 1 ir 2. Geno, koduojančio žmogaus IFNAR2c polipeptidą, dalinė DNR seka yra taip pat aprašyta Novick, JAV patente Nr. 5821078, EP 0588177 A2 ir EP 0676413 A2. Čia naudojamas terminas "egzogeninis IFNAR2c genas" reiškia bet kokį IFNAR2c geną, kuris yra įjungiamas į ląsteles, įskaitant bet kokio endogeninio IFNAR2c geno kitos kopijos įjungimą į ląsteles.

Šis išradimas yra susijęs ne tik su natūraliai atsirandančių IFNAR2c polipeptidų ant tikslinės ląstelės paviršiaus skaičiaus padidiniu, bet taip pat ir su mutantinių IFNAR2c polipeptidų skaičiaus padidiniu ant ląstelės paviršiaus. Pavyzdžiui, IFNAR2c aminorūgščių sekos pakeitimai taip pat svarstomi šiame išradime. IFNAR2c polipeptidas gali būti pakeistas pakeičiant baltymą koduojančią DNR. Tinkamesni yra konservatyviųjų aminorūgščių pakeitimai, naudojant aminorūgštis, kurios turi tas pačias arba panašias savybes. Aminorūgščių pakeitimų pavyzdžiais gali būti tokie pakeitimai: alaninas serinu; argininas lizinu; asparaginas glutaminu arba histidinu; aspartatas glutamatu; cisteinas serinu; glutaminas asparaginu; glutamatas aspartatu; glicinas prolinu; histidinas asparaginu arba glutaminu; isoleucinas leucinu arba valinu; leucinas valinu arba isoleucinu; lizinas argininu, glutaminu arba glutamatu; metioninas leucinu arba isoleucinu; fenilalaninas tirozinu, leucinu arba metioninu; serinas treoninu; treoninas serinu; triptofanas tirozinu, tirozinas triptofanu arba fenilalaninu; valinas isoleucinu arba leucinu.

Šio išradimo polinukleotidinės sekos apima DNR, kDNR ir RNR sekas, kurios koduoja IFNAR2c polipeptidus. Tokiais polinukleotidais yra gamtiniai, sintetiniai ir specialiai apdoroti polinukleotidai. Pavyzdžiui, mRNR sekos dalys gali būti pakeistos RNR suliejimo charakteristikoms pakeisti arba norint panaudoti jas pakeistų promotorių RNR transkripcijai. Kaip kitas pavyzdys, IFNAR2c polinukleotidai gali būti leidžiami į vietos mutagenezę. Šis išradimas apima bet kokį polinukleotidą, koduojantį IFNAR2c polipeptidą, kuris pasižymi biologiniu aktyvumu. Čia naudojamas terminas "IFNAR2c polipeptido biologinis aktyvumas" reiškia polipeptidą, kuris, kai jis yra ekspresuojamas ant ląstelės paviršiaus, turi vieną iš tokių aktyvumų: (1) suriša I tipo IFN; (2) gali padidinti bent kai kuriuos iš IFN-tarpininkaujamų aktyvumų, kai jis dimerizuoja su IFNAR1; (3) pasižymi geba surišti antikūną, kur antikūnai prieš IFNAR2c inhibuoja arba blokuoja bent vieną IFN-tarpininkaujamą aktyvumą.

Tinkamos tikslinės ląstelės šio išradimo praktikai yra bet kokia ląstelių populiacija, kuriai bus naudinga skatinti IFN-tarpininkaujamą aktyvumą. Pavyzdžiui, pagal šį išradimą gali būti gydomos proliferacinės ląstelių būklės. Čia naudojamas terminas "proliferacinės ląstelių būklės" apima bet kokias būkles, kuriose pageidaujama apriboti ląstelių proliferaciją, įskaitant vėžį arba

neoplazijos būklės. Vėžinės ląstelės apima, bet neapsiriboja, ląsteles, dalyvaujančias plaukuotųjų ląstelių leukemijoje, daugybinę mielomą, Kapošio angiomatozę, kaklo neoplaziją, pamatinių ląstelių karcinomą, žvyninių ląstelių karcinomą, melanomą, inkstų ląstelių karcinomą, karcinoidinius auglius, odos T-ląstelių limfomą, ne-Hodžkino limfomą, galvos ir kaklo auglius ir krūties, plaučių ir prostatos auglius, kasos auglius ir adenokarcinomas. Kaip šio išradimo dalis, ypatingai yra turimos omenyje vėžinių ląstelių populiacijos, kurios yra dalis kietųjų auglių. Be to, kaip šio išradimo dalis, ypatingai yra turimos omenyje neoperuojamos vėžio formos, tokios kaip smegenų vėžys, kasos vėžys ir vėlyvosios stadijos metastazės.

Ląstelės, esančios proliferacinėse ląstelių būklėse, apima mieloproliferacinius sutrikimus turinčių ląstelių tipus. Mieloproliferaciniais sutrikimais yra, pavyzdžiui, chroniška mielogeninė leukemija, tikroji policitemija, neaiškos kilmės mieloidinė metaplazija ir idiopatinė trombocitemija. Proliferacinės ląstelių būklės taip pat apima būklės, tokias kaip, pavyzdžiui, vainikinė restenozė. I tipo IFN panaudojimas vainikinės restenozės gydymui yra aprašytas, pavyzdžiui, JAV patente Nr. 5681558.

Kaip šio išradimo dalis, taip pat turima omenyje, kad šio išradimo būdai gali būti naudojami kartu su kitų augimą reguliuojančių polipeptidų įvedimu į tikslinę ląstelių populiaciją. Pavyzdžiui, pagal šio išradimo būdus, IFN gali būti įvedamas į tikslinę ląstelių populiaciją, turinčias modifikuotas ląsteles, kad jos ekspresuotų padidintus kiekius IFNAR2c polipeptido, kartu įvedant į tikslinių ląstelių populiaciją kitus augimą reguliuojančius polipeptidus, tokius kaip augimo faktoriai arba citokinai, įskaitant, pavyzdžiui, interleukinus. Be to, pagal šį išradimą, tikslinės ląstelių populiacijos ląstelės gali būti modifikuotos taip, kad jos ekspresuotų padidintus kiekius daugiau nei vieno tipo efektorinio ligando receptorių, tokių kaip, pavyzdžiui, I tipo IFN receptorių ir interleukino receptorių, arba ant tų pačių tikslinės ląstelių populiacijos modifikuotų ląstelių arba ant skirtingų modifikuotų ląstelių, o po to būtų veikiamos atitinkamais efektoriniais ligandais.

Šiame išradime yra pateikiama genų terapija proliferacinių ląstelių būklėms gydyti. Tokia terapija galėtų pasiekti terapinį efektą, pavyzdžiui, įvedant IFNAR2c geną į tikslinių ląstelių populiacijos modifikuotas ląsteles, po to veikiant modifikuotas ląsteles I tipo IFN arba bet koku kitu efektyviu IFR

receptoriaus ligandu. IFN receptoriaus ligandas gali būti paduodamas egzogeniškai arba produkuojamas endogeniškai. IFNAR2c genas gali būti pateikiamas organizmui bet koku efektyviu būdu, pvz. naudojant vektorių arba kitą padavimo priemonę, arba apnuogintą DNR. DNR padavimo priemonėmis gali būti virusiniai vektoriai, tokie kaip adenovirusai, su adenovirusu susiję virusai ir retrovirusai. Žr., pavyzdžiui, Bilbao et al., 1998, *Tumor Targeting* 3:59-79; Yia-Hertualla and Martin, 2000, *Lancet* 355:213-222; Chu et al., 1994, *Gene Therapy* 1:292-299; Couture et al., 1994, *Human Gene Therapy* 5:667-677; Eiverhand et al., 1995, *Gene Therapy* 2:336-343. Nevirusiniai vektoriai, kurie taip pat yra tinkami, apima DNR-lipidų kompleksus, pavyzdžiui, liposomų tarpininkaujamas arba ligando/poli-L-lizino konjugatų, tokių kaip asialoglikoproteinų, tarpininkaujamas įvedimo sistemas. Žr., pavyzdžiui, Feigner et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269:2550-2561; Derossi et al., 1995, *Restor. Neurol. Neuros* 8:7-10; ir Abcallah et al., 1995, *Biol. Cell* 85:1-7. Retrovirusai, iš kurių gali būti gaunami retrovirusiniai vektoriai, apima, bet neapsiriboja, Moloney pelių leukemijos virusą (MoMuLV), Harvey pelių sarkomos virusą (HaMuSV), pelių pieno liaukos auglio virusą (MuMTV) ir Rous'o sarkomos virusą (RSV). Šio išradimo dalimi taip pat laikoma tai, kad ligandas arba geną koduojantis ligandas gali būti įtrauktas į genų terapijos padavimo priemonę kartu su IFNAR2c polipeptidą koduojančiu genu.

Šis vektorius šeimininkui yra įvedamas arba vietiniu, arba sisteminiu būdu. Paprastai vektorius yra įvedamas sisteminiu būdu, panaudojant intravenines injekcijas. Tinkami virusų titrai priklausys nuo eilės faktorių, tokių kaip konkretus pasirinktas vektorius, šeimininkas, įvedimo būdas, naudojamo promotoriaus stiprumas ir gydomos ligos sunkumas. Pelėms adenovirusinį vektorių geriausia įvesti kaip injekciją, kurios dozė yra nuo maždaug $5,0 \times 10^6$ iki 10×10^6 plokštelės sudarančių vienetų (PFU) gramui kūno masės. Geresnis dozių intervalas yra maždaug $6-9 \times 10^6$ PFU gramui kūno masės, dar geresnis yra maždaug $6,7-8,6 \times 10^6$ PFU gramui kūno masės.

Gyvūnai, turintys modifikuotas ląsteles, kurios ekspresuoja padidintus kiekius IFNAR2c geno, yra tinkami modeliai tirti I tipo IFN poveikiui į tikslinę ląstelių populiaciją, turinčią modifikuotas ląsteles. Šis išradimas yra ypatingai skirtas žmonių genų terapijai. Kaip dalis išradimo, taip pat turima omenyje ir

genų terapijos panaudojimas gyvūnams, įskaitant naminius gyvulėlius ir ūkinius gyvulius.

I tipo IFN arba kitas ligandas grynoje formoje arba atitinkamoje farmacinėje kompozicijoje gali būti vartojami bet koku priimtu vartojimo būdu. I tipo IFN gali būti vartojamas vietiniu arba sisteminiu būdu. Taigi, vartojimo būdas gali būti, pavyzdžiui, peroralinis, nosinis, parenterinis, vietinis, transderminis arba rektalinis. I tipo IFN gali būti vartojamas kieta arba pusiau kieta dozuota forma, liofilizuotų miltelių pavidalu arba skysta dozuota forma, įskaitant, pavyzdžiui, tabletes, žvakutes, piliules, minkštas elastines ir kietas želatinos kapsules, miltelius, tirpalus, suspensijas arba aerozolius, ir panašiomis formomis, geriausia vienetinėmis dozotomis formomis, tinkamomis paprastam tikslių dozių įvedimui. Į farmacines kompozicijas paprastai įeis įprastas farmacinis nešiklis arba pagalbinė medžiaga ir I tipo IFN. Į kompozicijas taip pat gali įeiti kiti vaistiniai agentai, farmaciniai agentai, nešikliai, adjuvantai ir t.t. Trumpą šiuolaikinių vaistų įvedimo būdų apžvalgą galima rasti Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533, kuris čia pridedamas kaip literatūros šaltinis.

Tinkamiausias I tipo IFN vartojimo būdas yra parenterinis, naudojant įprastus dienos dozių režimus. Tokiam parenteriniam vartojimui, pavyzdžiui, gali būti sukomponuojama farmaciškai priimtina kompozicija pagal JAV patentuose Nr. 4462940, 4588585 ir 4992571 aprašytus metodus.

Čia naudojamas terminas "terapiškai efektyvus kiekis" reiškia I tipo IFN kiekį, pakankamą sukelti antiproliferaciniams efektams tikslinių ląstelių populiacijoje. Tokiam naudojimui efektyvūs kiekiai, žinoma, turi priklausyti nuo gydomos būklės ir subjekto masės bei bendro sveikatos stovio. Įvairios nuomonės yra aprašytos, pvz., Gilman et al. (eds) (1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8th ed., Pergamon Press; ir *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA, kurie duodami kaip literatūros šaltiniai.

I tipo β -IFN terapiškai efektyvi dozė žmonėms yra paprastai, pavyzdžiui, nuo maždaug 0,05 g betaserono iki maždaug 0,25 mg betaserono, leidžiama po oda kas antrą dieną. Kitų interferono produktų,

įskaitant kitus β -IFN produktus, terapiškai efektyvią dozę paprastai gali nustatyti specialistai.

Kaip šio išradimo dalis, taip pat turima omenyje, kad IFNAR2c polipeptidą koduojantis genas bus pateikiamas tikslinei ląstelių populiacijai kartu su I tipo IFN koduojančiu genu. IFNAR2c genas ir I tipo IFN genas gali būti paduodami į tikslinės populiacijos tas pačias ląsteles arba skirtingas ląsteles. IFNAR2c genas gali būti paduodamas toje pačioje kompozicijoje ir/arba tame pačiame vektoriuje kaip ir I tipo IFN genas. Pavyzdžiui, I tipo IFN genas ir IFNAR2c genas gali būti paduodami kaip dalis to paties virusinio vektoriaus, pavyzdžiui, adenoviruso vektoriaus. Be to, kaip šio išradimo dalis, yra turima omenyje, kad IFN genas gali būti paduodamas į ląsteles, kurios yra greta tikslinės ląstelių populiacijos. Be to, I tipo IFN gali būti paduodamas į tikslines ląsteles implantuojant ląsteles, ekspresuojančias I tipo IFN į tikslinių ląstelių populiaciją arba šalia jos.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig.1 yra eilės histogramų, rodančių, kad IFNAR2c genu transfekuotos ląstelės ekspresuoja padidintą kiekį didelio afiniškumo I tipo IFN receptorių. Duomenys vaizduoja trijų atskirų taškų vidurkius, o standartinės paklaidos yra mažesnės nei 10 % nuo vidurkio. Nespecifinis surišimas buvo matuotas esant nežymėto IFN 100 kartų pertekliui. A panelis rodo rezultatus, gautus su transfekuotomis HT1080 ląstelėmis. B panelis rodo rezultatus, gautus su transfekuotomis MDA231 ląstelėmis. C panelis rodo rezultatus, gautus su U5A ląstelėmis, kurios neekspresuoja IFNAR2c, įskaitant ląsteles, transfekuotas IFNAR2c geno sutrumpintais mutantais.

Fig.2 yra histograma, rodanti, kad U5A ląstelės, kurios buvo išgelbėtos transfekuojant funkcinio IFNAR2c genu, yra ypatingai jautrios IFN β 1b antiproliferaciniam aktyvumui, lyginant su netransfekuotomis HT1080 ląstelėmis. Duomenys vaizduoja trijų atskirų taškų vidurkius, o standartiniai nukrypimai yra mažesni nei 15 % nuo vidurkio.

Fig.3 yra histograma, rodanti, kad HT1080 ląstelės ir HT1080 ląstelės, transfekuotos IFNAR2c genu (HTbetaL.2) buvo jautrios ir inkubavimo su IFN β

1b laikui, ir IFN β 1b koncentracijai, nors HTbetaL.2 ląstelės rodė padidintą jautrumą.

Fig.4 yra histograma, rodanti žmogaus IFN β 1b (betaserono) arba žmogaus IFN α 2 5000 tarptautinių vienetų ("IU")/ml augimo stabdymo efektą į HT1080 ląsteles ir HT1080 ląsteles, transfekuotas IFNAR2c genu, palyginimą, naudojant timidino įsiterpimo testą. Duomenys yra išreikšti ląstelių augimo inhibavimo kartais.

Fig.5 yra histograma, rodanti IFN β 1b ir IFN α 2 augimo stabdymo poveikių į HT1080 ląsteles, transfekuotas IFNAR2c genu, palyginimą, naudojant Alamar Blue testą.

Fig.6 rodo IFNAR2c transfekuotų HT1080 (HTbetaL.2) ląstelių, paveiktų IFN β 1b, fotografinius atvaizdus. A-D paneliai yra tokie: A panelis – nepaveiktos ląstelės (10x didinimas), B panelis – paveiktos ląstelės (10x didinimas), C panelis – paveiktos ląstelės (20x didinimas) ir D panelis – paveiktos ląstelės (40x didinimas). Ląstelės buvo paveiktos 500 IU/ml IFN β 1b.

Fig.7. rodo IFNAR2c transfekuotų MDA231 ląstelių, paveiktų IFN β 1b, fotografinius atvaizdus. A ir B paneliai atitinkamai rodo nepaveiktas ir paveiktas kilmines MDA231 ląsteles, esant 10 x didinimui. C ir D paneliai atitinkamai rodo paveiktas ir nepaveiktas IFNAR2c transfekuotas MDA231 ląsteles, esant 10x didinimui. Ląstelės buvo paveiktos 500 IU/ml IFN β 1b.

Fig.8 yra eilė mikroskopinių atvaizdų, kurie rodo IFN β 1b poveikio į HT1080 ląsteles, kurios buvo transfekuotos genu, koduojančiu IFNAR2c receptorinį baltymą (HTbetaL.2 ląstelės), apoptozės testo (TUNEL testo) rezultatus. A-D paneliai yra tokie: A ir B panelis – nepaveiktos HTbetaL.2 ląstelės, atitinkamai šviesaus lauko vaizdas ir fluorescencijos mikroskopinis vaizdas; C ir D panelis – IFN β 1b paveiktos HTbetaL.2 ląstelės, atitinkamai šviesaus lauko vaizdas ir fluorescencijos mikroskopinis vaizdas; E ir F panelis – kilminės HT1080 ląstelės, atitinkamai šviesaus lauko vaizdas ir fluorescencijos mikroskopinis vaizdas. Šviesaus lauko atvaizdų A, C ir E paneliai rodo didesnio nei 80 % susilieimo ląstelių sluoksnį. Apoptozinėms ląstelėms būdingiems DNR fragmentams žymėti buvo naudojami FITC žymėti

nukleozidai (B, D ir F paneliai). Ląstelės buvo veikiamos 500 IU/ml IFN β 1b. A-F panelių didinimas buvo 10x.

Fig.9 yra eilė mikroskopinių atvaizdų, kurie rodo IFN β 1b poveikio į MDA231 ląsteles, kurios buvo transfekuotos genu, koduojančiu IFNAR2c receptorinį baltymą (MDAbetaL.2 ląstelės), apoptozės testo (TUNEL testo) rezultatus. A-F paneliai yra tokie: A ir B paneliai – nepaveiktos MDAbetaL.2 ląstelės, atitinkamai šviesaus lauko vaizdas ir fluorescencijos mikroskopinis vaizdas; C ir D paneliai – IFN β 1b paveiktos MDAbetaL.2 ląstelės, atitinkamai šviesaus lauko vaizdas ir fluorescencijos mikroskopinis vaizdas; E ir F paneliai – kilminės MDA231 ląstelės, atitinkamai šviesaus lauko vaizdas ir fluorescencijos mikroskopinis vaizdas. Šviesaus lauko atvaizdų A, C ir E paneliai rodo didesnio nei 80 % susilieimo ląstelių sluoksnį. Apoptozinėms ląstelėms būdingiems DNR fragmentams žymėti buvo naudojami FITC žymėti nukleozidai (B, D ir F paneliai). Ląstelės buvo veikiamos 500 IU/ml IFN β 1b. A-F panelių didinimas buvo 10x.

Fig.10 yra histograma, kuri rodo IFN β 1b (betaserono) *in vivo* augimo slopinimo aktyvumą į LOX žmogaus melanomos ląsteles ir į LOX-IFNAR2c ląsteles (LOX ląstelės, transfekuotas funkciniu IFNAR2c genu), naudojant pelės plaučių užsėjimo modelį. LOX-IFNAR2c ląstelės rodė padidintą jautrumą 200 μ g betaserono, leidžiamo į pilvaplėvę kas antrą dieną.

Daugiau nebetobulinant, tikimasi, kad specialistai, naudodami šį aprašymą, panaudos šį išradimą jo pilnoje apimtyje. Todėl toliau duodami tinkamiausi konkretūs įgyvendinimo variantai turi būti laikomi tik iliustraciniais, ir jokių būdu ne apribojančiais išradimą.

Prieš tai duotame aprašyme ir toliau duodamuose pavyzdžiuose visos temperatūros yra nekoreguotos ir duodamos Celsijaus laipsniais; jeigu nenurodyta kitaip, visos dalys ir procentai yra pagal masę.

Visų aukščiau arba žemiau cituotų patentų, patentinių paraiškų ir publikacijų pilni aprašymai yra pridedami kaip literatūros šaltiniai.

P a v y z d ž i a l

1 pavyzdys

Ląstelės, transfekuotos IFNAR2c genu, ekspresuoja padidintus kiekius labai afiniškų I tipo IFN receptorių.

Pagal ligando surišimo testus, panaudojant IFN α 2 fosforilintą formą, buvo įvertinta IFNAR2c genais transfekuotų trijų ląstelių linijų I tipo IFN didelio afiniškumo receptorių ekspresija. Anksčiau buvo parodyta, kad didelis ligando surišimo afiniškumas būna tik tada, kai ant ląstelės paviršiaus yra ekspresuojamas ir IFNAR1, ir IFNAR2c (Russell-Harde et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270:26033-26036). Todėl ligando surišimas buvo panaudotas IFNAR2c receptorinio baltymo ekspresijai ant IFNAR2c genais transfekuotų ląstelių linijų paviršiaus patvirtinti. Buvo naudotos tokios ląstelių linijos:

- (i) HT1080 ląstelės. Žmogaus plaučių fibrosarkomos ląstelių linija (ATCC Nr. CCL-121).
- (ii) U5A ląstelės. U5A ląstelės yra gautos iš HT1080 ir jos yra HT1080 ląstelės, kurios buvo atrinktos taip, kad jos neturėtų IFNAR2c baltymo ekspresijos. U5A ląstelės negali duoti atsako į I tipo IFN (Pellegrini, et al., 1989, *Mol. Cell Biol.* 9:4605-4612; Lurfalla et al., 1996, *EMBO J.* 14:5100-5108).
- (iii) MDA231 ląstelės. Žmogaus krūties epitelinės adenosarkomos ląstelių linija (ATCC Nr. HTB-26).

HT1080 ir MDA231 ląstelių linijos buvo gautos iš Amerikos tipinių audinių kultūrų kolekcijos (ATCC) ir visos ląstelės buvo auginamos 37 °C temperatūroje 5 % CO₂ atmosferoje.

Ląstelės buvo transfekuotos, panaudojant Superfect (Qiagen Inc.), ekspresijos plazmidėmis, turinčiomis žmogaus viso ilgio arba mutantinės formos IFNAR2c. Plazmidės, turinčios genus, koduojančius IFNAR2c sutrumpintas mutacijas arba tirozino pakeitimo fenilalaninu mutaciją, buvo sukonstruotos pagal ankstesnį aprašymą (Domanski et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 274:4045-4053). Stabiliai transfekuotos ląstelių linijos buvo atrinktos

G418 (1,0 mg/ml). Po atrinkimo buvo parinkti ir padauginėti atskiri klonai ir IFNAR2c geno integracija buvo patvirtinta PGS analizės metodu, panaudojant introną apimančius pradmenis, būdingus IFNAR2c kDNR. Vėl buvo padauginėti teigiami klonai ir ištirtas jų sugebėjimas susirišti su I tipo IFN.

Ligando surišimo testai buvo atliekami pagrindinai pagal Croze et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271:33165-33168 duotą aprašymą. IFN α , turintis $3,0 \times 10^8$ IU/mg specifinį aktyvumą, buvo gautas iš Pepro Tech Inc. (Rocky Hill, NI), o IFN α 2 ligandas buvo fosforilintas iki 60-62 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ specifinio aktyvumo, kaip aprašyta anksčiau (Croze et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271:33165-33168). Ligando surišimas buvo analizuojamas pagal fosforilinto IFN α 2 susirišimą (esant 176 pM koncentracijai) su 200000 ląstelių 19 minučių laikotarpyje. Nespecifinis surišimas buvo nustatytas pridodant nežymėto IFN α 2 100 kartų perteklių. Surišimo duomenys buvo analizuoti panaudojant Scatchard'o analizę.

Kilminės HT1080 ląstelės surišo IFN α 2 su gana dideliu afiniškumu (K_d – 290 pM) ir pagal Scatchard'o analizę buvo nustatyta 9000 receptorinių vietų vienai ląstelei. Buvo analizuotas trijų stabilų HT1080 ląstelių klonų, transfekuotų laukinio tipo IFNAR2c genu (HTbetaL.1, HTbetaL.2, HTbetaL.4), susirišimas su IFN α 2. Du iš šių klonų - HTbetaL.1 ir HTbetaL.2 – surišo ~8 kartus daugiau ligando (surišta 34-37 pM) nei kilminės HT1080 ląstelės, o trečiasis klonas (HTbetaL.4) surišo maždaug du kartus daugiau ligando (surišta 11-12 pM) nei kilminės HT1080 ląstelės (Fig.1, A panelis).

Žmogaus krūties adenokarcinomos ląstelių linijos MDA231 ląstelės taip pat buvo transfekuotos laukinio tipo IFNAR2c genu. Buvo analizuotas dviejų stabilų klonų – MDAbetaL.1 ir MDAbetaL.2 – susirišimas su IFN α 2. Kilminė ląstelių linija surišo palyginus mažus IFN α 2 kiekius (2-3 pM). Kiekvienas iš transfekuotų klonų surišo maždaug 10 kartų daugiau IFN α 2, nei kilminių MDA231 ląstelių linija (Fig.1, B panelis).

U5A ląstelės, kurios neekspresuoja IFNAR2c receptorinio baltymo, buvo transfekuotos laukinio tipo IFNAR2c genu ir 4 mutuotais genais, įskaitant tris sutrumpintus mutantus (R2.462, R2.417, R2.346) ir pilno tirozino pakeitimo fenilalaninu mutantą (R2.Y-F) (SEQ ID NO3 269, 306, 316, 318, 337, 411 ir 512 padėčių tirozinai pakeisti fenilalaninu). U5A ląstelės,

transfekuotos laukinio tipo IFNAR2c genu, surišo 13 kartų daugiau IFN nei kilminės HT1080 ląstelės (Fig.1 C panelis). Stabilūs klonai, ekspresuojantys arba R2.462, arba R2.346 sutrumpintas mutacijas, arba (R2.Y-F) delecijos mutaciją, surišo IFN α 2 5-10 kartų daugiau nei HT1080 ląstelės (Fig.1, C panelis). Stabilūs klonai, ekspresuojantys R2.417 sutrumpinimo mutaciją, surišo maždaug tą patį IFN α 2 kiekį, kaip ir HT1080 ląstelės (~9000 surišimo vietų).

2 pavyzdys

U5A ir HT1080 ląstelių jautrumo IFN β 1b antiproliferaciniams efektams sustiprinimas, transfekuoiant ląsteles IFNAR2c genu.

Buvo tiriamas U5A ląstelių, transfekuoatų laukinio tipo ir mutantiniais IFNAR2c genais, jautrumas IFN β 1b antiproliferaciniams efektams, lyginant su U5A ląstelėmis. Taip pat buvo tiriamas HT1080 ląstelių, transfekuoatų laukinio tipo IFNAR2c genais, jautrumas IFN β ir IFN α antiproliferaciniams efektams, lyginant su HT1080 ląstelėmis. Ląstelių jautrumas antiproliferaciniams IFN β 1b efektams buvo tiriamas naudojant timidino įsiterpimo testą.

Ląstelės buvo pasėtos į 24 duobučių auginimo plokštes, imant 2×10^4 ląstelių/duobutei tankį, 1 ml/duobutei, ir inkubuojamos su žmogaus IFN β 1b, esant 1000 IU/ml, 24 valandas. Žmogaus IFN β 1b (specifinis aktyvumas $2,5 \times 10^7$ IU/mg) buvo pagamintas kaip aprašyta Russell-Harde, 1995, *J. Interferon Cytokine Res.* 15:31-37. Nuliniame laike pridedama pilnos terpės, turinčios tričiu žymėto timidino ([metil- ^3H]timidinas, specifinis aktyvumas = 40-60 Ci/mmol, Amersham Life Sciences). Tričiu žymėto timidino įsiterpimas buvo matuotas po 10 valandų tokiu būdu: ląstelės buvo plaunamos fosfatinio buferiu su NaCl, po to pridedama 10 % trichloracto rūgšties (TCA) ir po to 100 % etanolio. Prieš nustatant įsiterpusį radioaktyvumą, ląstelės buvo soliubilizuotos 1M kalio hidrokside ir šios soliubilizuotos ląstelės buvo sumaišytos su Ecolume scinciliaciniu skysčiu įsiterpusiam tričiu žymėtam timidinui išmatuoti.

U5A ląstelės, kurios buvo transfekuotos laukinio tipo IFNAR2c genu, buvo ypatingai jautrios IFN β 1b antiproliferaciniam aktyvumui, o U5A ląstelės buvo nejautrios (Fig.2). U5A ląstelės, kurios buvo transfekuotos mutantiniu IFNAR2c genu, koduojančiu ties 462 liekana nukirptą baltymą, taip pat buvo jautrios IFN β 1b antiproliferaciniams efektams. Kiti du sutrumpinti mutantai – R2.417 ir R2.246 bei R2.Y-F mutantas (aprašyti aukščiau duotame 1 pavyzdyje) nedavė atsako į I tipo IFN. Taigi, IFNAR2c receptoriaus nukirpimas po 417 liekanos arba visų tirozinų, esančių IFNAR2c viduląstelinėje dalyje, pašalinimas (R2.Y-F mutantas) paverčia ląsteles, turinčias du I tipo IFN receptorinius baltymus, nejautriomis I tipo IFN antiproliferaciniams efektams. Tačiau 53 tolimųjų IFNAR2c baltymo liekanų (R2.462) pašalinimas, matyt, neturi poveikio į receptoriaus tarpininkaujamus I tipo IFN antiproliferacinius efektus. HT1080 ląstelės, ekspresuojančios normalius IFNAR2c receptorinio baltymo kiekius, yra mažai jautrios IFN β 1b antiproliferaciniam aktyvumui.

1 lentelė

	<i>Antiproliferacija</i>	<i>TUNEL apoptozė</i>	<i>Ląstelių žūtis</i>
HT1080 (kilminės)	+/-	-	-
HTbetaL.2	+++	+++	+++
MDA231 (kilminės)	+/-	+/-	-
MDAbetaL.1	NN	+++	+++
MDAbetaL.2	NN	+++	+++
U5A+IFNAR2c (laukinio tipo)	+++	NN	+++
462 sutrumpintos	+++	NN	+++
356 sutrumpintos	-	NN	NN
Tyr-Phe mutantas	-	NN	-

1. Antiproliferacija buvo matuota pagal timidino įsiterpimo testą.
2. Ląstelių žūtis buvo matuota vizualiai apžiūrint, kaip aprašyta 4 pavyzdyje toliau.
3. Apoptozė buvo matuota pagal TUNEL testą, kaip aprašyta 5 pavyzdyje toliau.

3 pavyzdys

IFNAR2c transfekuotos HT1080 ląstelės, ekspresuojančios padidintus kiekius IFNAR2c, yra jautrios ir I tipo IFN β , ir I tipo IFN α poveikiams

Naudojant Alamar BlueTM testą (Biosource #DAL 1100) mitochondriniam aktyvumui matuoti, buvo palyginti įvairių inkubavimo laikų ir IFN β 1b koncentracijų poveikiai į HT1080 ląsteles ir transfekuotas laukinio tipo IFNAR2c genu HT1080 ląsteles (HTbetaL.2 ląsteles). Ląstelės buvo išdėstytos mažesniu nei susiliejo tankiu 6 duobučių lėkštelėse ir buvo inkubuojamos su 0, 50, 500 arba 5000 IU/ml IFN β 1b 0, 24 arba 48 valandas. Imant įvairius laiko taškus, į ląsteles buvo pridėta Alamar Blue reagento (praskiedimas 1:10) ir inkubuojama su ląstelėmis 30 min. Po 30 min. Alamar Blue fluorescencijos sumažėjimas buvo išmatuotas fluorescenciniu plokštelių skaičiuokliu. Ir HT1080 ląstelės, ir HTbetaL.2 ląstelės davė priklausančius nuo dozės atsakus į IFN β 1b (Fig.3). Tačiau, priešingai HT1080 ląstelėms, HTbetaL.2 ląstelės nebeauga nuo 24 iki 48 valandų. Nors, paveikus IFN β 1b, HT1080 ląstelių proliferacijos greitis yra sumažintas, ląstelių skaičius toliau didėja. Priešingai, HTbetaL.2 ląstelių skaičius mažėja laikui bėgant. Šis sumažėjimas tikriausiai yra dėl apoptozinės ląstelių žūties, kuri yra sukelta HTbetaL.2 ląstelėse ir nesukelta HT1080 ląstelėse.

IFN β ir IFN α augimo slopinimo efektų į HT1080 ląsteles, transfekuotas IFNAR2c genu, palyginimas buvo vykdomas pagal aukščiau 2 pavyzdyje aprašytą timidino įsiterpimo testą, naudojant 5000 IU/ml žmogaus IFN β 1b (betaserono) ir žmogaus IFN α 2 (fig.4). Šis palyginimas parodė, kad abu tirti IFN turėjo augimo slopinimo poveikį į transfekuotas ląsteles.

Žmogaus IFN β ir IFN α įvairių koncentracijų poveikio į augimo slopinimo efektus HT1080 ląstelėms, transfekuotoms IFNAR2c genu, palyginimas buvo vykdomas naudojant Alamar Blue testą (Fig.5). Šis palyginimas taip pat parodė, kad IFN β turi didesnį augimo slopinimo efektą nei IFN α ir kad šis efektų skirtumas yra labiau išreikštas esant didesnėms IFN koncentracijoms.

4 pavyzdys

IFNAR2c transfekuotos HT1080 ir MDA231 ląstelės buvo daug jautresnės I tipo IFN antiproliferaciniams efektams nei kilminių ląstelių linijos.

HT1080 ląstelės yra panašios į epitelines ląsteles, ir yra gautos iš žmogaus fibrosarkomos. Buvo tirti stabiliai transfekuotos ląstelių linijos, gautos iš HT1080 (HTbetaL.2), morfologiniai pokyčiai, paveikus ją IFN β 1b (1 lentelė). Šios ląstelės buvo paskleistos 6 duobučių lėkštelėje ir po to paveiktos IFN β 1b, esant 500 IU/ml koncentracijai. Po dviejų dienų nepaveiktos ląstelės sudarė susijungiantį ląstelių sluoksnį (Fig.6, A panelis). IFN β 1b paveiktos ląstelės neaugo ir po paveikimo pasirodė mažiau ląstelių nei prieš tai (Fig.6, B panelis). Esant didesniai padidiniui, paveiktų ląstelių morfologija rodė, kad ląstelėse vyko apoptozė (Fig.6, C panelis (20x) ir D panelis (40x)). Pasirodė, kad paveiktos ląstelės yra pasiskleidusios ląstelių baltymų ir DNR liekanos sferiniuose "apoptoziniuose kūneliuose". HT1080 ląstelės nebuvo taip stipriai paveiktos apdorojus IFN β 1b kaip HTbetaL.2 ląstelės ir IFN β 1b paveiktose HT1080 ląstelėse apoptozinių kūnelių nebuvo pastebėta (Fig.6, B panelis).

Buvo tirti dviejų stabiliai transfekuotos ląstelių linijų, gautų iš MDA231 (MDAbetaL.1 ir MDAbetaL.2), morfologiniai pokyčiai, paveikus jas IFN β 1b (1 lentelė). Ląstelės buvo veikiamos IFN β 1b, esant 500 IU/ml, tris dienas prieš stebėjimą. Kilminių MDA231 ląstelių augimas buvo tik truputį sumažintas veikiant IFN β 1b, kaip parodyta fig.7, A panelis (nepaveiktos kilminės ląstelės) ir B panelis (paveiktos kilminės ląstelės). Priešingai, MDAbetaL.2 ląstelių augimas buvo drastiškai inhibuotas, paveikus jas 500 IU/ml IFN β 1b, kaip parodyta fig.7, C panelis (nepaveiktos ląstelės) ir D panelis (paveiktos ląstelės). Kaip ir HT1080 ląstelės, kurios ekspresavo padidintus IFNAR2c kiekius, MDAbetaL.2 ląstelės taip pat morfologiškai patyrė apoptozę, paveikus jas IFN β 1b. Morfologinius pokyčius buvo sunkiau įvertinti MDA231 ląstelėms nei HT1080 ląstelėms, nes normalios MDA231 ląstelės yra linkę būti apvalios formos, o HT1080 ląstelės normaliai auga kaip plokšti trikampiai. Tačiau paveikus I tipo IFN, MDAbetaL.2 ląstelėse buvo stebėti sustiprinti apoptozės efektai.

5 pavyzdys

HT1080 ir MDA231 ląstelės, ekspresuojančios padidintus IFNAR2c baltymo kiekius, buvo tirtos TUNEL testu, norint patvirtinti, kad paveiktos IFN β 1b ląstelės pasiduoda apoptozei.

Apoptozė buvo matuota paveiktose ląstelėse naudojant TdT-tarpininkaujamą dUTP įkirpto galo žymėjimo (TUNEL) testą, norint pažymėti fragmentuotą DNR, kuri rodo apoptozę (*In Situ Cell Death Detection Kit*, Boehringer Mannheim). TUNEL teste fluorescenciniu FITC žymėti UTP nukleotidai buvo perkelti į susidariusios fragmentuotos DNR galus, kuri susidarė ląstelių, patyrusių apoptozę, branduoliuose. Stebint fluorescenciniu mikroskopu yra matomos ryškiai žaliai nusidažiusios apoptozinės ląstelės. Paveikus IFN 4 dienas, ląstelės, esančios 6 duobučių ląstelių auginimo plokštelėse, buvo fiksuotos 1 valandą kambario temperatūroje 1X PBS turinčiame 4 % paraformaldehido. Tada ląstelės buvo veikiamos 1 val kambario temperatūroje 0,3 % H₂O₂ metanolyje. Po to ląstelės buvo daromos pralaidžiomis 30 min. kambario temperatūroje 0,3 % Triton-X100 PBS ir po to plaunamos du kartus PBS. Fiksuotos ir padarytos laidžiomis ląstelės buvo išdžiovintos ir ląstelių laukai apibrėžti PAP plunksna (Biogenex). Tada apoptoziniai branduoliai buvo fermentiškai pažymėti fluorescencine žyme (FITC) tokiu būdu. Ląstelės buvo inkubuojamos 45 min. 37 °C temperatūroje su 100 μ l dažančio reagento iš Boehringer Mannheim (450 μ l žymėjimo tirpalo + 50 μ l fermento tirpalo). Nudažytos ląstelės buvo plaunamos du kartus PBS ir po to tiriamos fluorescenciniu mikroskopu.

Nepaveiktos transfekuotos ląstelės turėjo ribotą skaičių TUNEL teigiamų branduolių (Fig.8, A panelis - šviesaus lauko vaizdas, B panelis - fluorescencinis mikroskopas). Transfekuotos ląstelės, kurios buvo paveiktos IFN β 1b turėjo sluoksnį žalių TUNEL teigiamų branduolių, rodantį, kad didelė dalis ląstelių yra galutinėse apoptozės stadijose (Fig.8, C panelis - šviesaus lauko vaizdas; D panelis - fluorescencinis mikroskopas). Maža dalis TUNEL teigiamų ląstelių nepaveiktose ląstelėse gali atspindėti endogeninį nedidelių kiekių I tipo IFN pasigaminimą. HT1080 kilminės ląstelės, paveikus IFN β 1b,

neturėjo jokių apoptozės ženklų, ką rodo visiškas TUNEL teigiamų branduolių nebuvimas (Fig.8: E panelis – šviesaus lauko vaizdas, F panelis – fluorescencinis mikroskopas).

Rezultatai, gauti TUNEL testu su MDA231 ląstelėmis, buvo panašūs į rezultatus, gautus su HT1080 ląstelėmis. Nepaveiktos, transfekuotos MDA231 ląstelės (MDAbetaL.2) rodė ribotą skaičių TUNEL teigiamų branduolių (Fig.9: A panelis – šviesaus lauko vaizdas; B panelis – fluorescencinis mikroskopas). Transfekuotos MDA231 ląstelės (MDAbetaL.2), kurios buvo paveiktos IFN β 1b, turėjo sluoksnį žalių TUNEL teigiamų branduolių, rodantį, kad didelė dalis ląstelių yra galutinėse apoptozės stadijose (Fig.9: C panelis - šviesaus lauko vaizdas; D panelis - fluorescencinis mikroskopas). Kilminės MDA231 ląstelės, paveikus jas 500 IU/ml IFN β 1b 4 dienas, rodė tik nedidelius apoptozės ženklus (Fig.8: C panelis – šviesaus lauko vaizdas; D panelis – fluorescencinis mikroskopas). Dalis TUNEL teigiamų ląstelių nepaveiktose MDAbetaL.2 ląstelėse gali atspindėti endogeninį nedidelių I tipo IFN pasigaminimą.

6 pavyzdys

IFNAR2c transfekuota žmogaus auglio ląstelių linija buvo jautresnė IFN β 1b augimo slopinimo aktyvumui in vivo nei kilminė ląstelių linija.

Suleidus LOX žmogaus melanomos ląstelių į beplaukių pelių uodegos veną, po keturių savaičių atsiranda atitinkami augliai plaučiuose. Šis modelis buvo panaudotas auglio ląstelių, kurios ekspresuoja padidintus kiekius IFNAR2c baltymo, gydymo IFN β 1b efektyvumui įvertinti. Beplaukėms pelėms (15 gyvūnų grupėje) buvo įleista arba kilminių LOX ląstelių, arba LOX ląstelių, transfekuotų genu, koduojančiu IFNAR2c receptoriaus baltymą. Kas antrą dieną, pradedant nuo antrosios dienos po šios injekcijos, pelėms buvo leidžiama į pilvaplėvę arba 200 μ g betaserono, arba ekvivalentinis tūris (200 μ l) fiziologinio tirpalo. Praėjus 28 dienoms po injekcijos, pelės buvo numarintos ir išimti ir homogenizuoti jų plaučiai. Buvo išskirta DNR, panaudojant skaldymą K proteinkinaze, po to gryninant per Quagen kolonėlę.

Žmogaus DNR kiekis plaučiuose – netiesioginis LOX kilminių arba LOX-IFNAR2c auglio ląstelių skaičiaus matas – buvo nustatytas TaqMan9R0 PGS, naudojant pradmenis ir zondus, kurie yra būdingi žmogaus CCR5 genui. Buvo sudaryta standartinė kreivė, naudojant išgrynintą žmogaus genomine DNR.

Ir LOX kilminės, ir LOX-IFNAR2c ląstelės buvo jautrios sisteminio betaserono augimo slopinimo aktyvumui *in vivo*, o LOX ląstelės, transfekuotos IFNAR2c, turėjo sustiprintą jautrumą.

Suleidus MDA231 ląstelių į beplaukių pelių šlaunies raumenį, po dviejų savaičių atsiranda atitinkami augliai. Šis modelis gali buvo panaudotas auglio ląstelių, kurios ekspresuoja padidintus kiekius IFNAR2c baltymo, gydymo IFN β 1b efektyvumui įvertinti. Beplaukėms pelėms buvo įleista arba kilminių MDA231 ląstelių, arba MDA231 ląstelių, transfekuotų genu, koduojančiu IFNAR2c receptoriaus baltymą. IFN β 1b sisteminio įvedimo poveikis į auglio proliferacijos inhibavimą šią injekciją gavusioms pelėms buvo įvertintas matuojant auglių dydį.

Aukščiau duoti pavyzdžiai gali būti pakartoti panašiai sėkmingai, pakeičiant bendrai arba konkrečiai aprašytais šio išradimo reagentais ir/arba veiksmo sąlygomis aukščiau aprašytus pavyzdžiuose reagentus ir sąlygas.

Iš šio aprašymo specialistai gali nesunkiai nustatyti esmines šio išradimo charakteristikas ir, nenukrypdami nuo šio išradimo esmės ir sferos, gali padaryti įvairius pakeitimus ir modifikacijas, pritaikydami šį išradimą įvairiems panaudojimo variantams ir būklėms.

Išradimo apibrėžtis

1. I tipo IFN poveikių į tikslinių ląstelių populiaciją sustiprinimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima funkcinio IFNAR2c receptoriaus grandinių ant modifikuotų ląstelių tikslinių ląstelių populiacijoje skaičiaus padidinimą ir tada modifikuotų ląstelių veikimą terapiškai efektyviu kiekiu I tipo IFN.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėti poveikiai yra augimo slopinimo poveikiai.

3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad funkcinio IFNAR2c receptoriaus grandinių ant modifikuotų ląstelių skaičius yra padidintas aktyvuojant IFNAR2c geno genų ekspresiją.

4. Būdas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad IFNAR2c geno genų ekspresija yra aktyvuojama įvedant į modifikuotas ląsteles IFNAR2c polipeptidą koduojantį egzogeninį geną.

5. Būdas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad IFNAR2c geno genų ekspresija yra aktyvuojama veikiant tikslinės ląstelių populiacijos modifikuotas ląsteles maža molekule, kuri stimuliuoja IFNAR2c geno promotorių.

6. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad I tipo IFN yra I tipo α -IFN, I tipo β -IFN, I tipo ω -IFN arba suderintinio I tipo IFN.

7. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tikslinės ląstelių populiacijos ląstelės yra proliferacinės būklės apimtos ląstelės.

8. Būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad proliferacinės būklės apimtos ląstelės yra vėžinės ląstelės.

9. Būdas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad proliferacinės būklės apimtos ląstelės yra lygiųjų raumenų ląstelės, apimtos restenozės.

10. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad bent vienas IFNAR2c polipeptidą koduojantis egzogeninis genas yra pateikiamas modifikuotoms ląstelėms naudojant virusinį vektorių.

11. Būdas pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad virusinis vektorius yra gautas iš retroviruso arba adenoviruso.

12. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad I tipo IFN augimo slopinimo poveikis į tikslinių ląstelių populiaciją yra padidintas mažiausiai 5 %.

13. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad I tipo IFN augimo slopinimo poveikis yra padidintas mažiausiai 10 %.

14. Būdas pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad IFNAR2c polipeptidą koduojantis egzogeninis genas ir I tipo IFN koduojantis genas yra pateikiami tikslinei ląstelių populiacijai kaip to paties virusinio vektoriaus dalis.

15. Efektorinės molekulės ant tikslinių ląstelių populiacijos, įskaitant navikines ląsteles, augimo slopinimo poveikių sustiprinimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima funkcinį efektorinių molekulių receptorių ant modifikuotų ląstelių tikslinių ląstelių populiacijoje skaičiaus padidinimą ir tada modifikuotų ląstelių veikimą terapiškai efektyviu efektorinės molekulės kiekiu.

16. Būdas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad efektorinė molekulė yra augimo faktorius arba interleukinas.

17. Būdas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad efektorinių molekulių receptorių skaičius yra padidinamas aktyvuojant geno, koduojančio efektorinės molekulės receptorių, genų ekspresiją.

18. Būdas pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad geno, koduojančio efektorinės molekulės receptorių, genų ekspresija yra aktyvuojama įvedant į modifikuotas ląsteles egzogeninį geną, koduojantį efektorinės molekulės receptorių.

19. Būdas pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad geno, koduojančio efektorinės molekulės receptorių, genų ekspresija yra aktyvuojama veikiant tikslinės ląstelių populiacijos modifikuotas ląsteles maža molekule, kuri stimuliuoja geno, koduojančio efektorinės molekulės receptorių, promotorių.

20. Būdas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad efektorinės molekulės augimo slopinimo poveikis į tikslinę ląstelių populiaciją yra padidintas mažiausiai 10 %.

21. I tipo IFN poveikių į tikslinių ląstelių populiaciją sustiprinimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima funkcinio IFNAR1 receptoriaus grandinių ant modifikuotų ląstelių tikslinių ląstelių populiacijoje skaičiaus

padidinimą ir tada šių modifikuotų ląstelių veikimą terapiškai efektyviu kiekiu I tipo IFN.

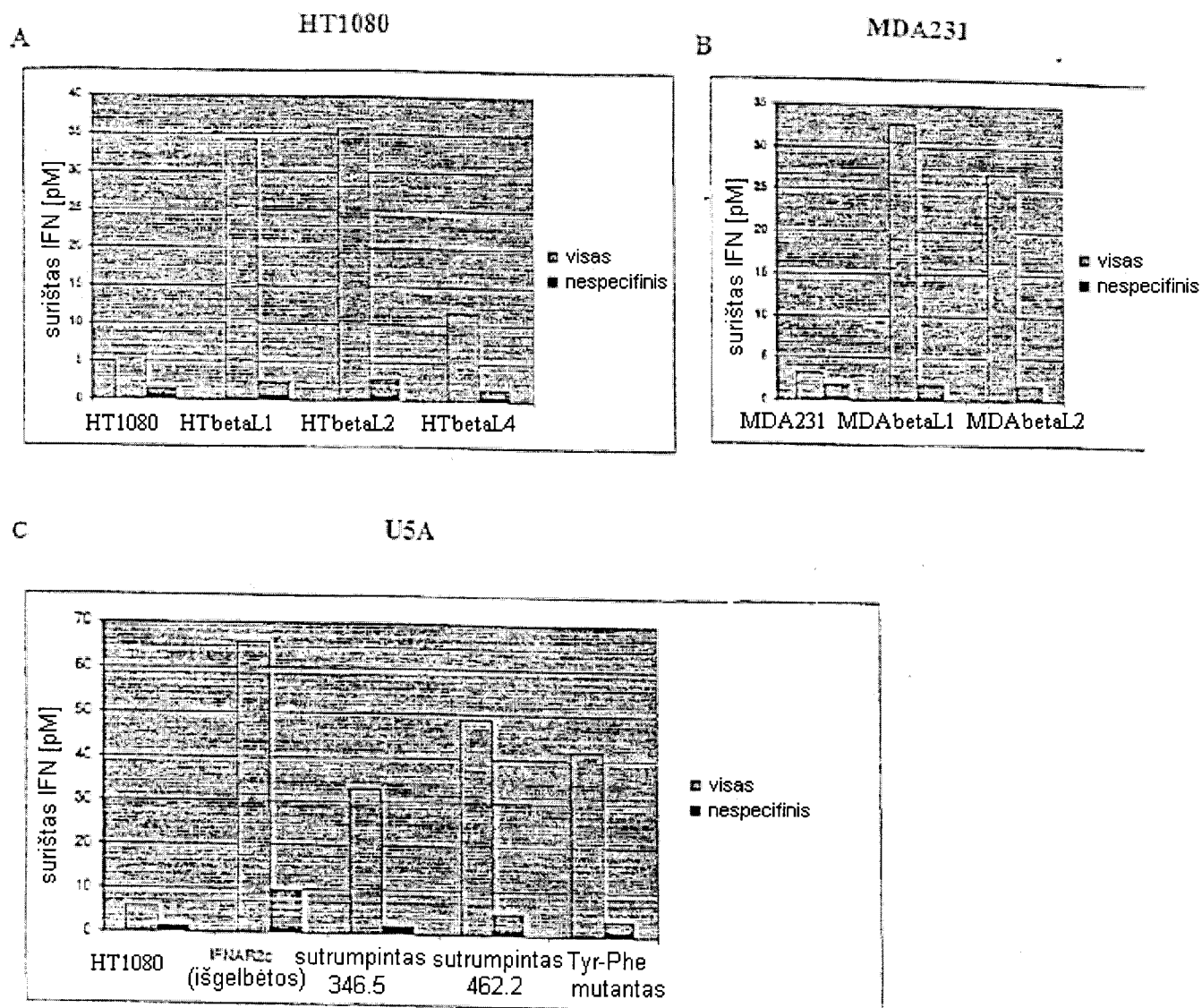


Fig. 1

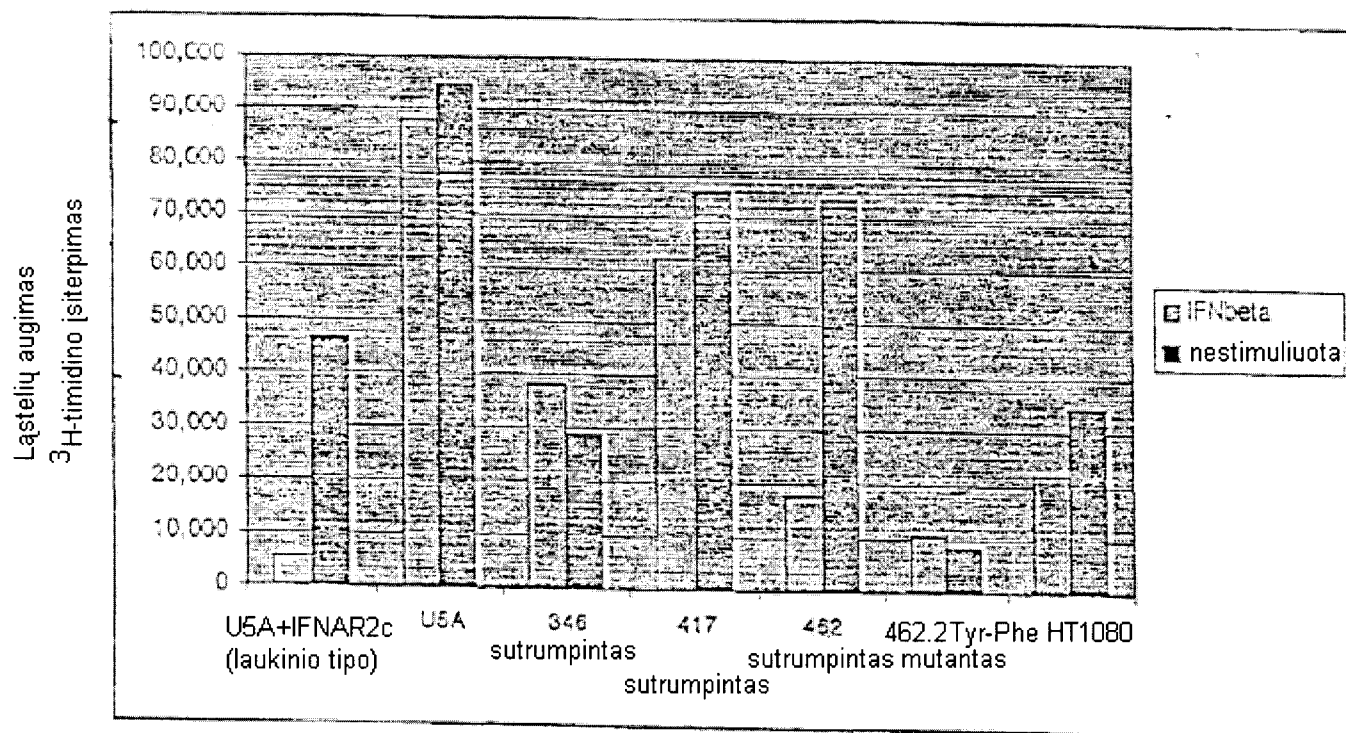


Fig. 2

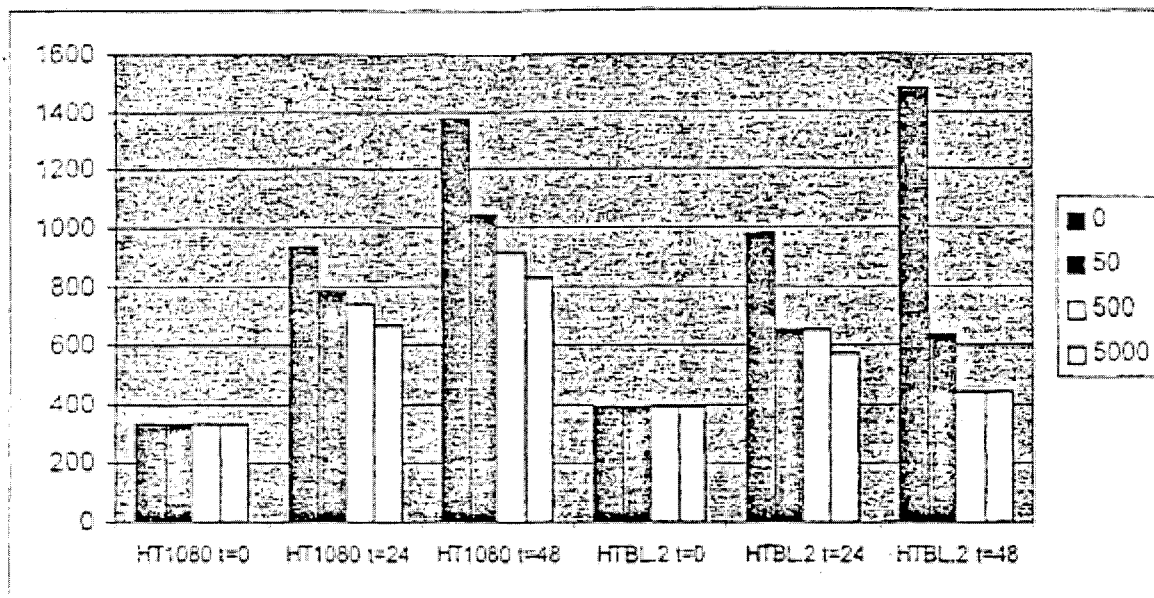


Fig. 3

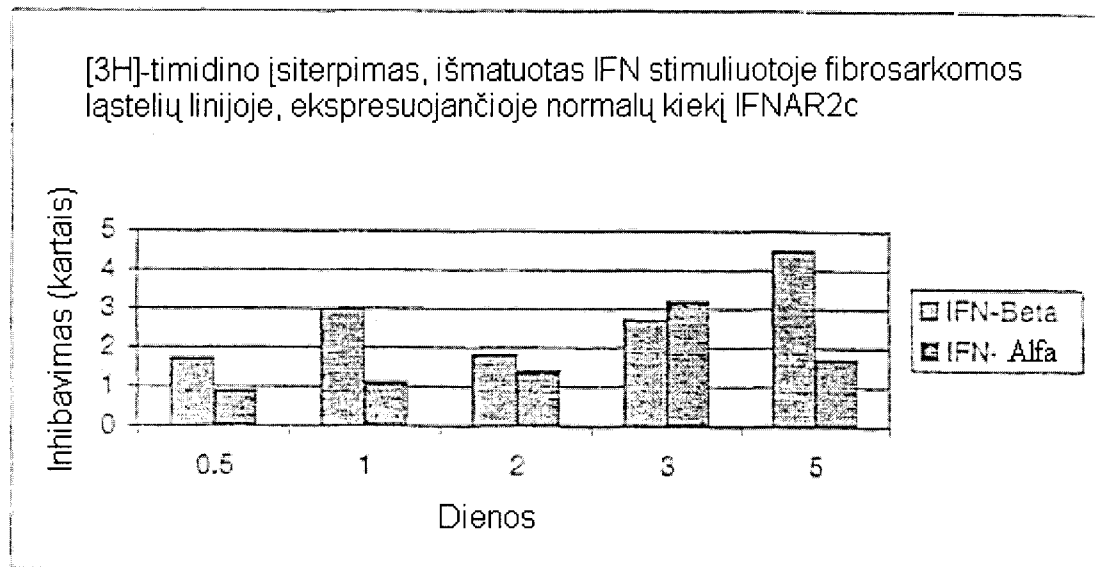
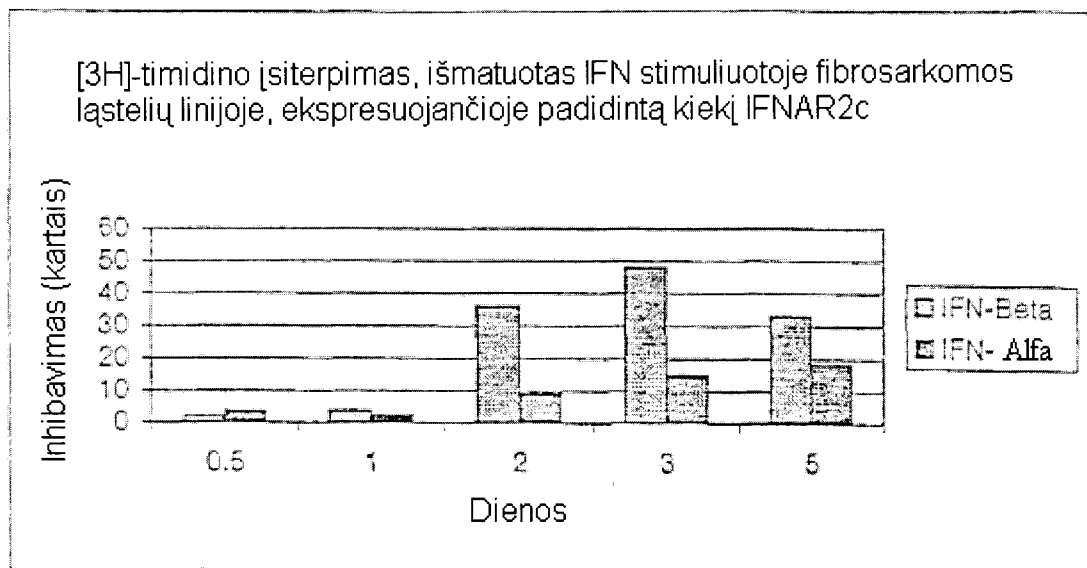


Fig.4

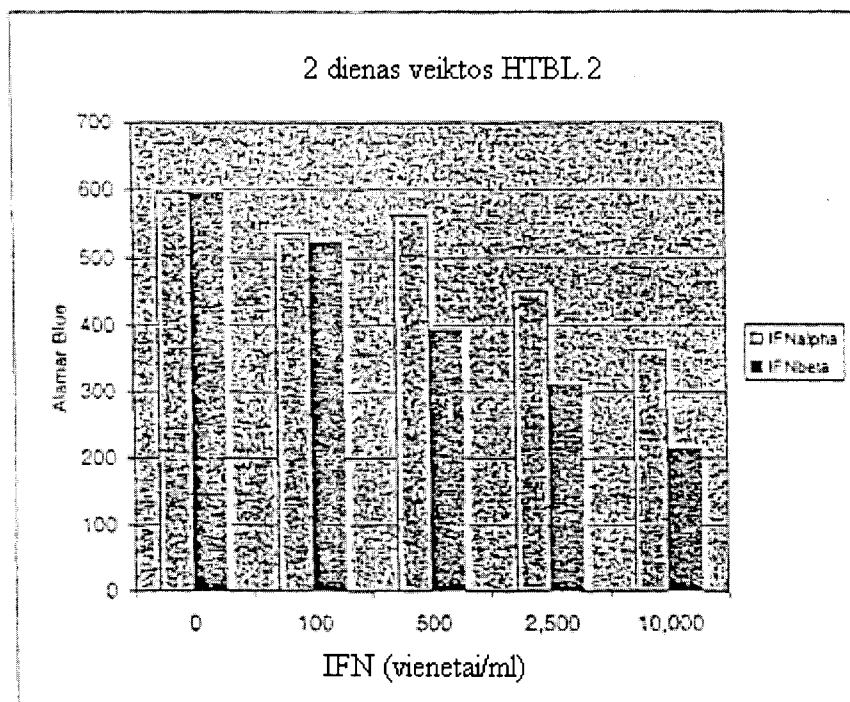


Fig. 5

HTbetaL.2 lastelès

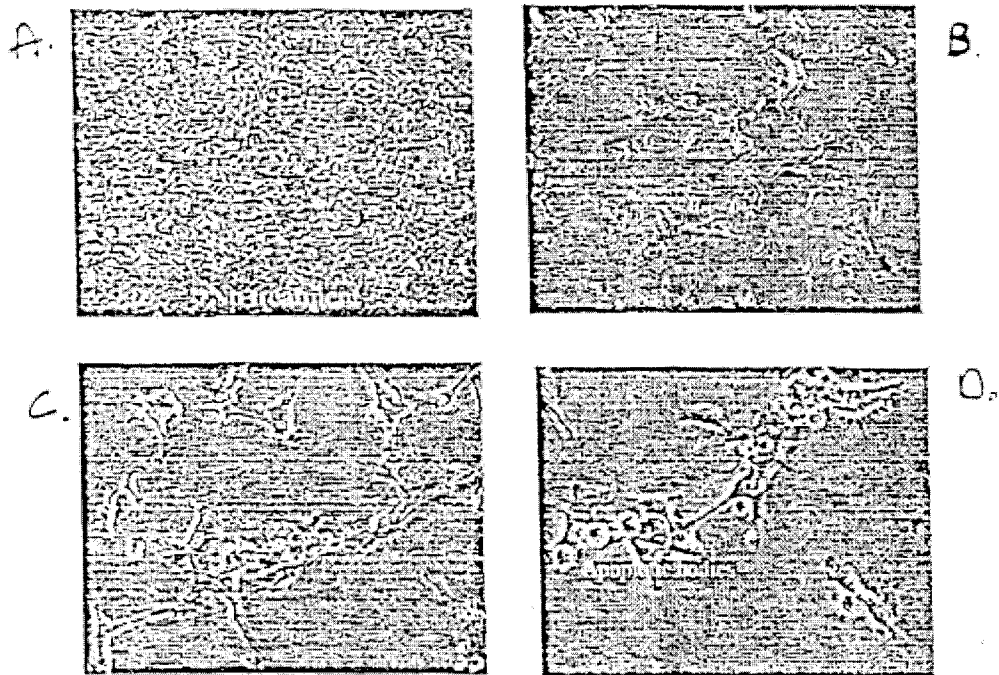


Fig. 6

MDA231 lastelēs

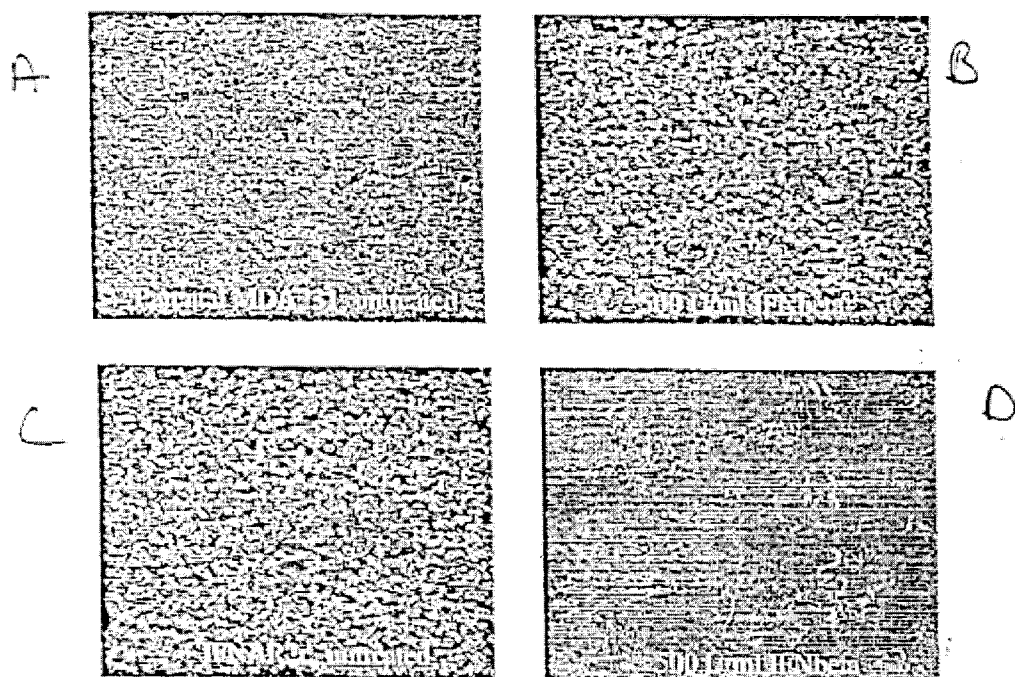


Fig. 7

Fazės kontrastas

"TUNEL" fluorescencijos laukelis

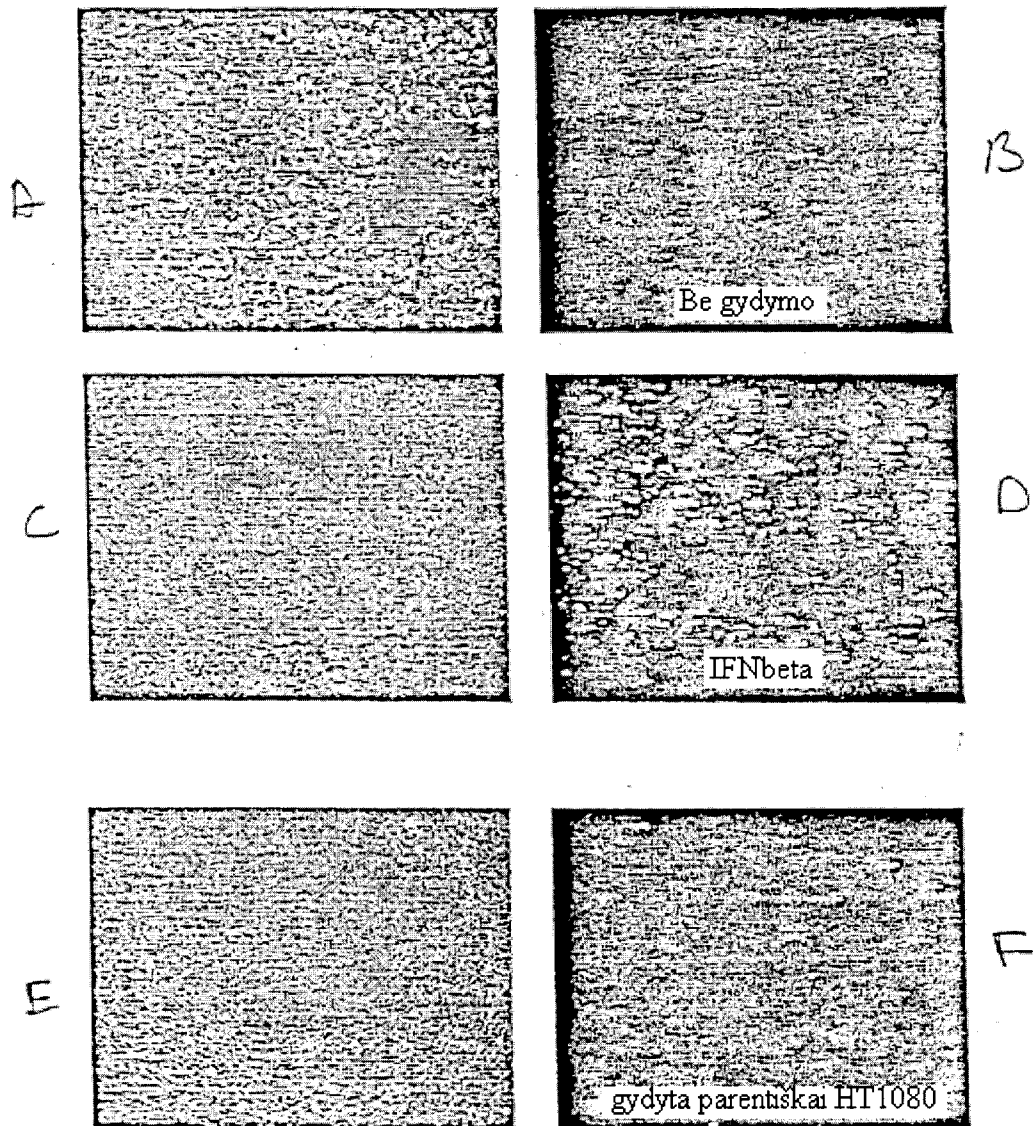


Fig. 8

MDA231 ląstelės

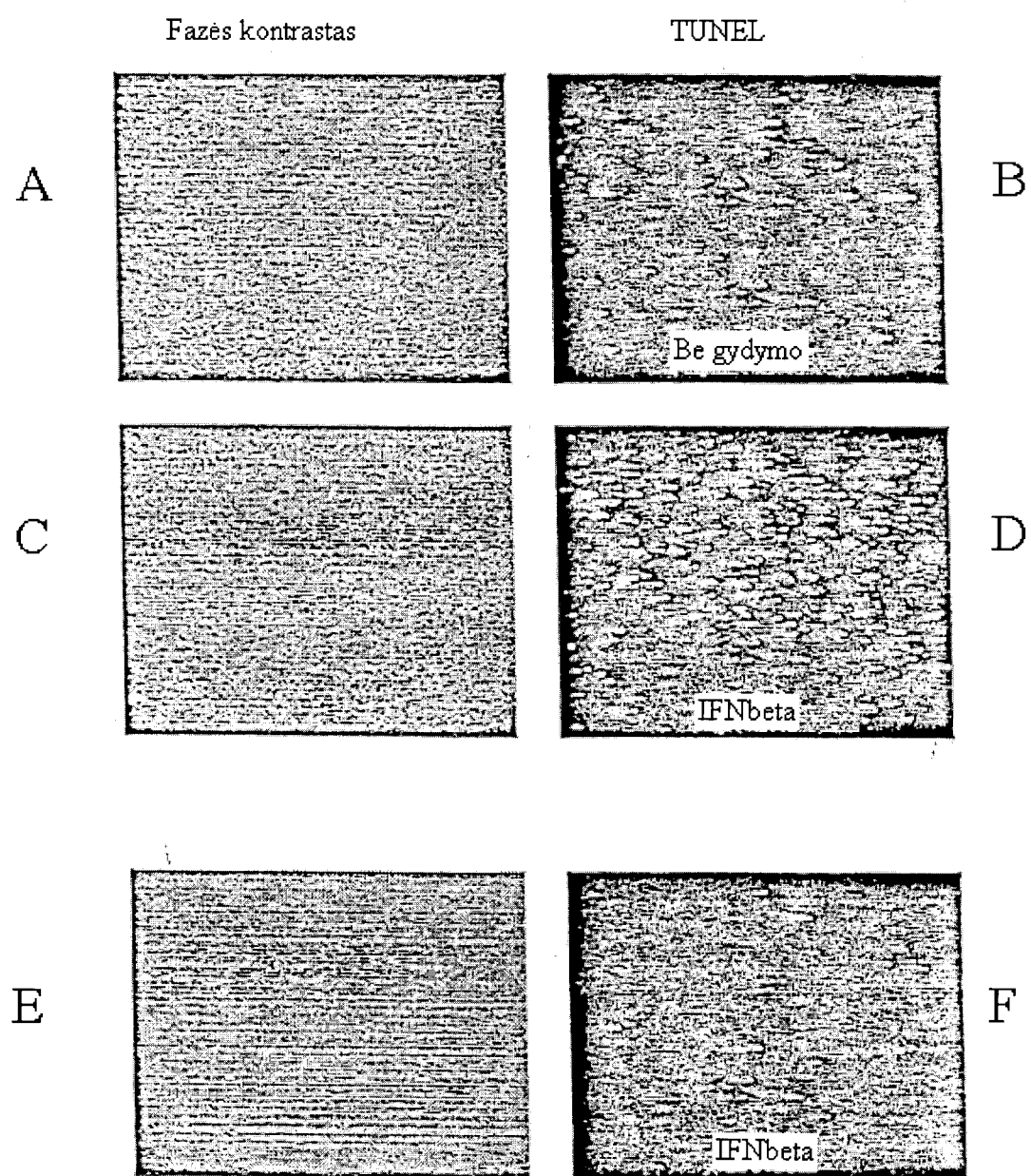


Fig. 9

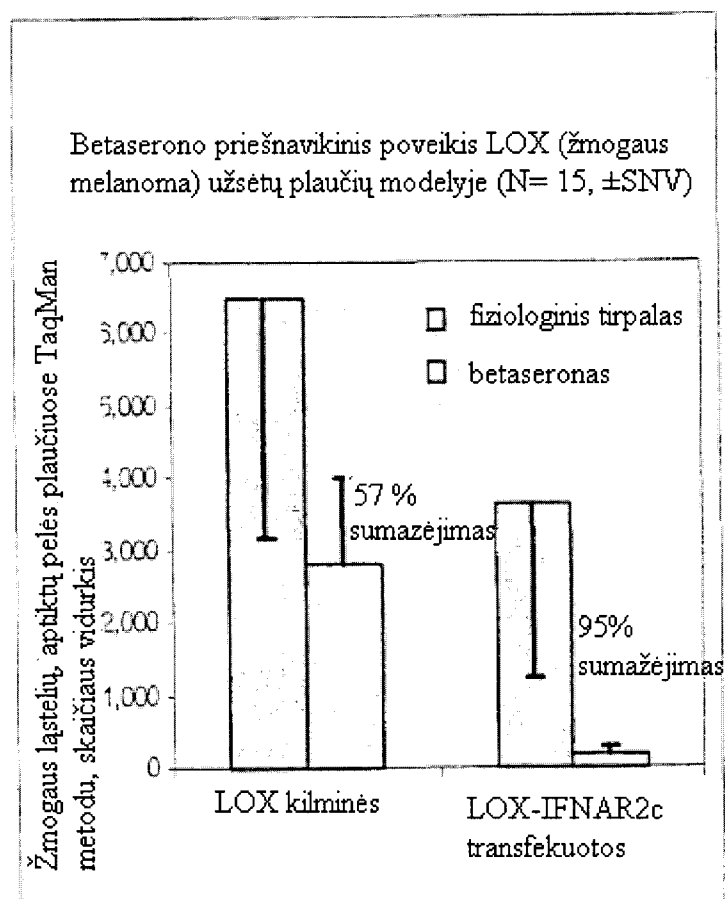


Fig. 10