



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 25 110 T2** 2006.02.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 053 330 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 25 110.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP99/00748**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 904 857.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/040198**

(86) PCT-Anmeldetag: **04.02.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.08.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.11.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **04.05.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/31 (2006.01)**

C07K 14/31 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

98200323 04.02.1998 EP

98200365 06.02.1998 EP

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

**Thromb-X N.V., Leuven, BE; Collen, Desire Jose,
Winksele-Herent, BE**

(72) Erfinder:

**COLLEN, Jose, Desire, B-3020 Winksele-Herent,
BE**

(74) Vertreter:

Arnold und Kollegen, 80331 München

(54) Bezeichnung: **IDENTIFIZIERUNG, PRODUKTION UND VERWENDUNG VON STAPHYLOKINASE-DERIVATEN
MIT REDUZierter IMMUNOGENIZITÄT UND/ODER "CLEARANCE"**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Staphylokinase-Derivate mit reduzierter Immunogenität, welche sich durch kontinuierliche Infusion oder durch eine einzelne intravenöse Bolus-Injektion verabreichen lassen, ihre Identifizierung, Produktion und Verwendung bei der Behandlung von arterieller Thrombose und die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von arterieller Thrombose. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung gentechnisch hergestellter Staphylokinase-Derivate zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Myokardinfarkt.

[0002] Staphylokinase, ein von bestimmten Staphylococcus-aureus-Stämmen produziertes Protein, von dem bereits vor mehr als 4 Jahrzehnten (1, 2) gezeigt wurde, dass es profibrinolytische Eigenschaften aufweist, scheint ein wirksames Thrombolytikum bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt zu sein (3, 4). Das Staphylokinase-Gen wurde aus den Bakteriophagen sakØC (5) und sak42D (6) sowie aus der genomischen DNA (sakSTAR) eines lysogenen Staphylococcus-aureus-Stammes (7) kloniert. Das Staphylokinase-Gen codiert ein Protein mit 163 Aminosäuren, wobei die Aminosäure 28 dem NH₂-terminalen Rest der reifen Vollständigen-Staphylokinase entspricht (6, 8, 9). Die Sequenz des reifen Proteins der Wildtypvariante SakSTAR (9) ist in der **Fig. 1** dargestellt. Es wurden nur vier Nukleotidunterschiede in den codierenden Bereichen der sakØC-, sak42D- und sakSTAR-Gene gefunden, von denen einer eine stille Mutation ausmachte (6, 8, 9). Im Plasmamilieu kann die Staphylokinase Fibringerinnsel lösen, ohne dass ein Fibrinogenabbau (10-12) damit einhergeht. Diese Fibrin-Spezifität der Staphylokinase ist das Ergebnis der reduzierten Hemmung durch α_2 -Antiplasmin des an Fibrin gebundenen Plasmin-Staphylokinase-Komplexes, Rezyklisierung der Staphylokinase aus dem Plasmin-Staphylokinase-Komplex nach der Hemmung durch α_2 -Antiplasmin und Verhinderung der Umwandlung von zirkulierender Plasminogen-Staphylokinase zu Plasmin-Staphylokinase durch α_2 -Antiplasmin (13-15). Zudem hat die Staphylokinase eine schwache Affinität für zirkulierendes, aber eine hohe Affinität für Fibrin-gebundenes Plasminogen (16), und die Staphylokinase erfordert, dass die NH₂-terminale Prozessierung durch Plasmin ihr Plasminogenaktivierungspotential aufweist (17). In mehreren experimentellen Tiermodellen scheint die Staphylokinase zum Auflösen von Vollblut- oder Plasmagerinnsel genauso wirksam wie die Streptokinase zu sein, jedoch ist sie zur Auflösung der plättchenreichen oder retrahierten Thromben (18, 19) erheblich besser geeignet. Staphylokinase ist ein heterologes Protein und beim Menschen immunogen. Die intrinsische Immunogenität der Staphylokinase hemmt ähnlich wie bei der Streptokinase klar deren uneingeschränkte Verwendung. Patienten mit vorher existierenden hohen Antikörper-Titern widersetzen sich nicht nur der thrombolytischen Wirkung dieser Mittel, sondern es können auch allergische Nebenwirkungen und eine gelegentliche lebensbedrohende Anaphylaxe auftreten (20). Da sowohl Streptokinase als auch Staphylokinase heterologe Proteine sind, ist es nicht offensichtlich, dass man ihre Immunogenität durch gentechnologische Protein-Manipulation reduzieren kann. Tatsächlich wurden keine erfolgreichen Versuche zur Erzeugung aktiver Streptokinase-Fragmente mit niedrigem Molekulargewicht berichtet. Bei der Staphylokinase inaktiviert die Deletion von 17 NH₂-terminalen Aminosäuren oder von 2 COOH-terminalen Aminosäuren das Molekül, das zudem gegenüber der Inaktivierung durch stellenspezifische Mutagenese sehr empfindlich ist (21).

[0003] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung schwächer immunogener Staphylokinase-Varianten, die vorzugsweise eine höhere spezifische Aktivität und/oder eine niedrigere Plasma-Clearance und/oder eine erhöhte thrombolytische Wirksamkeit aufweisen.

[0004] In der Forschung, die schließlich zur vorliegenden Erfindung führte, wurde bereits festgestellt, dass die Staphylokinase-Wildtyp-Variante SakSTAR (9) drei nicht-überlappende immundominante Epitope enthält, von denen mindestens zwei durch spezifische stellengerichtete Mutagenese eliminiert werden können, ohne dass das Molekül inaktiviert wird. Dies wurde in EP-95200023.0 (22) offenbart. Diese gentechnisch hergestellten Staphylokinase-Varianten sind mit Antikörpern, die in mit Wildtyp-Staphylokinase behandelten Patienten aufgelöst werden, weniger reaktiv und sind erheblich schwächer immunogen als Wildtyp-Staphylokinase, wie in Kaninchen- und Pavian-Modellen sowie in Patienten mit peripherem Arterienverschluss gezeigt wurde (22).

[0005] Es sind allgemeine Verfahren zur Identifikation, Produktion und Verwendung von Staphylokinase-Derivaten offenbart, die eine reduzierte Antigenität und Immunogenität verglichen mit der Wildtyp-Staphylokinase, sowie für Varianten mittels selektiver Derivatisierung mit Polyethylenglycol zeigen. Die Derivate haben vorzugsweise eine höhere spezifische Aktivität und/oder eine niedrigere Plasma-Clearance und/oder eine erhöhte thrombolytische Wirksamkeit. Die Derivate haben im Wesentlichen die Aminosäuresequenz der Wildtyp-Staphylokinase oder ihrer modifizierten Versionen, sowie im Wesentlichen intakte biologische Aktivitäten, aber sie haben eine verringerte Reaktivität mit einer Reihe monoklonaler Maus-Antikörper und/oder mit Antikörpern, die in Patienten durch Behandlung mit Wildtyp-SakSTAR induziert werden. Die mit Polyethylenglycol substituierten ("pegylierten") Varianten haben reduzierte Plasma-Clearance-Werte, weshalb sie für die Verwendung

durch eine einzelne intravenöse Bolus-Verabreichung besonders geeignet sind. Anstelle von PEG können andere pharmazeutisch verträgliche Makromoleküle verwendet werden.

[0006] Insbesondere werden die folgenden Staphylokinase-Derivate offenbart:

SakSTAR (K35X, G36X, E65X, K74X, E80X, D82X, K102X, E108X, K109X, K121X, K130X, K135X, K136X, +137X) mit der in **Fig. 1** gezeigten Aminosäuresequenz, wobei die Aminosäuren Lys in Position 35, Gly in Position 36, Glu in Position 65, Lys in Position 74, Glu in Position 80, Asp in Position 82, Lys in Position 102, Glu in Position 108, Lys in Position 109, Lys in Position 121, Lys in Position 130, Lys in Position 135 und/oder Lys in Position 136 durch andere Aminosäuren ersetzt wurden und/oder wobei eine Aminosäure am COOH-Terminus hinzugefügt wurde, wodurch die Immunogenität nach der Verabreichung in Patienten verändert wurde, ohne dass die spezifische Aktivität merklich verringert wurde.

[0007] Es werden die in den Tabellen 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 19 und 20 aufgeführten Staphylokinase-Derivate mit der in **Fig. 1** gezeigten Aminosäuresequenz offenbart, wobei die angegebenen Aminosäuren durch andere Aminosäuren ersetzt wurden, wodurch die Absorption SakSTAR-spezifischer Antikörper aus Plasma von mit Staphylokinase behandelten Patienten gesenkt wurde, ohne dass die spezifische Aktivität verringert wurde.

[0008] Derivate, in denen die spezifische Aktivität erhöht und die Immunogenität verringert ist, sind die Folgenden:

SakSTAR(K74A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, E75A), SakSTAR(E75A), SakSTAR(E80A, D82A), SakSTAR(E80A), SakSTAR(D82A), SakSTAR(E75A, D82A), SakSTAR(S34G, G36R, H43R), SakSTAR(K35A), SakSTAR(E80A), SakSTAR(D82A, S84A), SakSTAR(T90A), SakSTAR(Y92A), SakSTAR(K130A), SakSTAR(V132A), SakSTAR(S34G, G36R, H43R), SakSTAR(G36R), SakSTAR(H43R), SakSTAR(G36R, K74R), SakSTAR(K35E), SakSTAR(K74Q), SakSTAR(K130T), SakSTAR(V132L), SakSTAR(V132T), SakSTAR(V132N), SakSTAR(V132R), SakSTAR(K130T, K135R), SakSTAR(G36R, K130T, K135R), SakSTAR(K74R, K130T, K135R), SakSTAR(K74Q, K130T, K135R), SakSTAR(G36R, K74R, K130T, K135R), SakSTAR(G36R, K74Q, K130T, K135R), SakSTAR(G36R, H43R, K74R, K130T, K135R), SakSTAR(E65A, K74Q, K130T, K135R), SakSTAR(E65Q, K74Q, K130T, K135R), SakSTAR(K74Q, K86A, K130T, K135R), SakSTAR(E65Q, T71S, K74Q, K130T, K135R), SakSTAR(K74Q, K130A, K135R), SakSTAR(E65Q, K74Q, K130A, K135R), SakSTAR(K74Q, K130E, K135R), SakSTAR(K74Q, K130E, V132R, K135R), SakSTAR(E65Q, K74Q, T90A, K130A, K135R), SakSTAR(E65Q, K74Q, N95A, K130A, K135R), SakSTAR(E65Q, K74Q, E118A, K130A, K135R), SakSTAR(E65Q, K74Q, N95A, E118A, K130A, K135R), SakSTAR(N95A, K130A, K135R), SakSTAR(E65Q, K74Q, K109A, K130, K135R), SakSTAR(E65Q, K74Q, E108A, K109A, K130T, K135R), SakSTAR(E65Q, K74Q, K121A, K130T, K135R), SakSTAR(E65Q, K74Q, N95A, E118A, K130A, K135R, K136A, +137K), SakSTAR(E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(K35A, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(E65S, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(S34G, G36R, K74R, K130T, K135R), SakSTAR(E65A, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(E65N, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(E65Q, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(K57A, E58A, E61A, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(E65D, K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(E65Q, K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(K35A, E65D, K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(K74R, E80A, D82A, S103A, K130T, K135R), SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K109A, K130T, K135R), SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R, K136A), SakSTAR(E65Q, K74Q, D82A, S84A, K130T, K135R), SakSTAR(K35A, K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(K35A, E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R).

[0009] Von diesen sind SakSTAR (E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) mit der Bezeichnung SY19 und SakSTAR (K35A, E65Q, K74R, E80A, D82A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R) mit der Bezeichnung SY161 besonders bevorzugt.

[0010] Neben den vorstehend beschriebenen Substitutionsderivaten betrifft die Erfindung Derivate, bei denen zusätzlich eine Aminosäure gegen Cys ausgetauscht ist. Diese Art von Austausch kann zu einer Dimerisation und/oder zu einer erhöhten spezifischen Aktivität und/oder reduzierten Clearance und/oder einer erhöhten thrombolytischen Wirksamkeit führen. Die reduzierte Plasma-Clearance wird insbesondere erhalten, wenn das Derivat mit Polyethylenglycol substituiert wird.

[0011] Bei bevorzugten Ausführungsformen dieser Staphylokinase-Derivate ist Cys mit Polyethylenglycol mit Molekulargewichten bis zu 20 kDa chemisch modifiziert. Bei besonderen Ausführungsformen sind ausgewählte Aminosäuren im NH₂-terminalen Bereich von 10 Aminosäuren gegen Cys ausgetauscht, das mit Polyethylenglycol mit Molekulargewichten bis zu 20 kDa chemisch modifiziert ist. Diese Derivate sind durch eine signi-

fikant reduzierte Plasma-Clearance und aufrecht erhaltene thrombolytische Wirksamkeit bei einer einzelnen intravenösen Bolus-Verabreichung bei einer reduzierten Dosis gekennzeichnet.

[0012] Insbesondere das Serin in Stellung 2 oder 3 ist gegen ein Cystein ausgetauscht, und das Cystein ist mit Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von 5, 10 oder 20 kDa chemisch modifiziert. Bevorzugte Ausführungsformen dieser Derivate sind SY161(S3C-MP5), SY161(S3C-P10), SY161(S3C-P20), SY19(S3C-MP5), SY19(S3C-SP5), SY19(S2C-SP5, S3C-SP5), SY19(S3C-P20), SY19 (S3C-P10), die jeweils wie in Tabelle 20 definiert sind.

[0013] Das Vorhandensein der Cysteine ermöglicht die Bildung von Dimeren von zwei erfindungsgemäßen Staphylokinase-Derivaten.

[0014] Offenbart wird auch ein Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäßen Derivate durch Herstellen eines DNA-Fragmentes, das mindestens den Teil der codierenden Sequenz der Staphylokinase umfasst, der deren biologische Aktivität bereitstellt; Durchführen der stellengerichteten In-vitro-Mutagenese an dem DNA-Fragment, um ein oder mehrere Codons für Wildtyp-Aminosäuren durch ein Codon für eine andere Aminosäure zu ersetzen; Klonieren des mutierten DNA-Fragmentes in einen geeigneten Vektor; Transformieren oder Transfizieren einer geeigneten Wirtszelle mit dem Vektor; Züchten der Wirtszelle unter Bedingungen, die sich zur Expression des DNA-Fragmentes eignen; Reinigen des exprimierten Staphylokinase-Derivates bis zur Homogenität und Derivatisieren der Variante mit Polyethylenglycol.

[0015] Das DNA-Fragment ist vorzugsweise ein 453 bp EcoRI-HindIII-Fragment des Plasmids pMEX602sakB (22, 23), die stellengerichtete In-vitro-Mutagenese wird vorzugsweise durch Polymerasekettenreaktion mit gespleißter Überlappungs-Extension durchgeführt. Eine solche Polymerasekettenreaktion mit Überlappungs-Extension wird vorzugsweise mit der Vent-DNA-Polymerase (New England Biolabs) oder der Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim) und mit erhältlichem oder erzeugtem Wildtyp-SakSTAR oder SakSTAR-Varianten als Matrize durchgeführt (24).

[0016] Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die mindestens eins der erfindungsgemäßen Staphylokinase-Derivate zusammen mit einem geeigneten Exzipienten umfassen, zur Behandlung von arterieller Thrombose. Pharmazeutische Zusammensetzungen, die schwächer immunogene Staphylokinase-Varianten oder "pegylierte" Staphylokinase-Varianten als Wirkstoff enthalten, zur Behandlung von arterieller Thrombose in der human- oder veterinärmedizinischen Praxis, können die Form von Pulvern oder Lösungen haben und können zur intravenösen, intraarteriellen oder parenteralen Verabreichung verwendet werden. Diese Zusammensetzungen können hergestellt werden, indem der Wirkstoff mit den pharmazeutisch verträglichen, neutral beschaffenen Exzipienten (wie wässrigen oder nicht-wässrigen Lösungsmitteln, Stabilisatoren, Emulgatoren, Detergenzien, Additiven) und zudem nötigenfalls mit Farbstoffen (beispielsweise durch Mischen, Lösen usw.) vereinigt wird.

[0017] Die Erfindung betrifft darüber hinaus die Verwendung der Staphylokinase-Derivate zur Behandlung von arterieller Thrombose, insbesondere Myokard-Infarkt, und die Verwendung von Staphylokinase-Derivaten zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von arterieller Thrombose, insbesondere von Myokard-Infarkt. Im Vorstehenden und im Folgenden werden die Begriffe "Derivate", "Mutanten" und "Varianten" untereinander austauschbar verwendet.

[0018] Die vorliegende Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele eingehender beschrieben. In den Beispielen wird auf die folgenden Figuren Bezug genommen. Es zeigt:

[0019] Fig. 1 die Proteinsequenz der Wildtyp-Staphylokinase SakSTAR. Die Nummerierung beginnt mit der NH₂-terminalen Aminosäure der reifen Volllängen-Staphylokinase;

[0020] Fig. 2 den zeitlichen Verlauf der Neutralisierungsaktivitäten (linkes Feld) und von spezifischem IgG gegen das verabreichte Mittel (rechtes Feld) nach einer intraarteriellen Infusion von SakSTAR (offene Kreise, n = 9), SakSTAR(K74A) (ausgefüllte Kreise, n = 11) oder SakSTAR(K74A, E75A, R77A) (offene Quadrate, n = 6) in Patienten mit peripherem Arterienverschluss. Die Daten stellen Mittelwerte und Interquartil-Bereiche in µg/ml dar;

[0021] Fig. 3 die Proteinsequenz von Wildtyp-Staphylokinase, SakSTAR, mit den angegebenen Aminosäure-Austauschen;
Quadrate: einzelne Aminosäure-Austausche;

Kreise: kombinierte (2 bis 3) Aminosäure-Austausche zu Ala;

[0022] Fig. 4 die Temperaturstabilität von SakSTAR, (A); SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) (B); SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), (C); und SakSTAR(K35A, E65D, K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R), (D). (O): 4°C; (●): 20°C; (▽): 37°C; (▼): 56°C; (□): 70°C.

[0023] Fig. 5 den zeitlichen Verlauf der Neutralisierungsaktivitäten (linkes Feld) und von spezifischem IgG gegen das verabreichte Mittel (rechtes Feld) nach einer intraarteriellen Infusion von SakSTAR (Kreise, n = 6), SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) (Quadrate, n = 6) oder SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) (Dreiecke, n = 6) bei Patienten mit peripherem Arterienverschluss. Die Daten stellen Mittelwerte und 15-85 Percentilbereiche in µg/ml dar.

BEISPIELE

BEISPIEL 1

Epitop-Kartierung von Wildtyp-Staphylokinase

[0024] Die Epitopspezifität einer Gruppe von 15 Maus-MAks (22), die gegen Wildtyp-SakSTAR erzeugt wurden, wurde durch eine biospezifische Echtzeit-Wechselwirkungsanalyse (BIA) mit dem BIAcore-Gerät (Pharmacia, Biosensor AB, Uppsala, Schweden) bestimmt. Die MAks wurden auf der Oberfläche des Sensor-Chips CM5 mit dem Amin-Kopplungs-Kit (Pharmacia Biosensor AB) wie vom Hersteller empfohlen immobilisiert (25). Die Immobilisierung wurde aus Proteinlösungen bei einer Konzentration von 20 µg/ml in 10 mmol/l Natriumacetat bei pH-Wert 5,0 und einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min während 6 min durchgeführt. Dadurch wurden 5000 bis 10000 Resonanzeinheiten (RU) Antikörper (entsprechend 0,035 bis 0,07 pmol/mm²) kovalent gebunden. Die SakSTAR-Lösungen wurden durch einen kontinuierlichen Fluss bei 20°C hinter die Sensoroberfläche geleitet. Es wurden mindestens vier Konzentrationen jedes Analyten (Bereich, 50 nmol/l bis 50 mol/l) in 10 mmol/l HEPES, 3,4 mmol/l EDTA, 0,15 mol/l NaCl und 0,005% oberflächenaktivem Mittel P20, pH-Wert 7,2, bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min während 6 min in der Assoziationsphase eingespritzt. Dann wurde die Probe durch Puffer ersetzt, und zwar ebenfalls bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min während 6 min. Nach jedem Zyklus wurde die Oberfläche des Sensor-Chips durch Einspritzen von 5 µl 15 mmol/l HCl regeneriert. Die apparente Assoziations- (k_{ass}) und die apparente Dissoziations- (k_{diss}) -Geschwindigkeitskonstante wurden aus den Sensorgrammen wie an anderer Stelle eingehend beschrieben (26) hergeleitet, und die Assoziations-Gleichgewichtskonstanten (K_A) als ihr Verhältnis berechnet.

[0025] Die Bestimmung der Gleichgewichts-Assoziationskonstanten für die Bindung von Wildtyp-SakSTAR und SakSTAR-Variante an unlöslich gemachte MAks (Tabelle 1) ergab apparente Assoziationskonstanten von 10^7 bis 10^8 (mol/l)⁻¹, die um ein bis zwei Größenordnungen niedriger als die apparenten Assoziationskonstanten sind, die vorher für die Bindung dieser MAks an unlöslich gemachtes Wildtyp-SakSTAR erhalten wurden (22). Werden die MAks anstelle der SakSTAR-Varianten unlöslich gemacht, werden Aviditätseffekte der bivalenten MAks vermieden. Die erfindungsgemäßen Werte stimmen stattdessen besser mit bekannten Assoziationskonstanten von MAks überein, und daher wurde dieses "umgekehrte" Verfahren im Verlauf der vorliegenden Erfindung verwendet.

[0026] In den Tabellen stehen die mit "Variante" bezeichneten Spalten für die verschiedenen Staphylokinase-Derivate, die identifiziert wurden, indem zwischen den Klammern die ausgetauschten Aminosäuren in Einzelbuchstabensymbolen und anschließend ihre Positionsnummer in der reifen Staphylokinase-Sequenz sowie die stattdessen eingebrachten Aminosäuren in Einzelbuchstabensymbol aufgeführt wurden; die Spalte "Exp." steht für das Ausmaß der Expression in mg/l, und die Spalte "spez. Akt." steht für die spezifische Aktivität in Home-Einheiten wie in Beispiel 2 definiert. Die Bezeichnungen "17G11", "26A2" usw. stehen für monoklonale Antikörper, die an die angegebenen Epitope I, II und III wie in Literatur 22 definiert binden. Das Epitop I wird durch den Antikörper-Cluster 17G11, 26A2, 30A2, 2B12 und 3G10 erkannt, wohingegen das Epitop II durch den Antikörper-Cluster 18F12, 14H5, 28H4, 32B2 und 7F10 und das Epitop III durch den Antikörper-Cluster 7H11, 25E1, 40C8, 24C4 und 1A10 erkannt wird. Der Humanplasma-"Pool" steht für einen Plasmapool von anfangs 16 und anschließend 10 durch Behandlung mit SakSTAR immunisierten Patienten, "Subpool B" steht für einen Plasmapool von drei Patienten, die weniger als 50% der induzierten Antikörper mit SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) absorbierten, und "Subpool C" steht für einen Plasmapool von 3 Patienten, die > 90% der induzierten Antikörper mit SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) absorbierten (22).

[0027] In den Tabellen 6, 7 und 8 wurde ebenfalls ein zusätzlicher Plasmapool von 40 Patienten verwendet,

die durch Behandlung mit SakSTAR (Pool 40) immunisiert worden waren.

BEISPIEL 2

Konstruktion, Epitop-Kartierung mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Absorption mit vereinigt Plasma aus immunisierten Patienten von "Alanin-zu-Wildtyp"-Umkehrvarianten von "geladenem-Cluster-zu-Ala-nin"-Mutanten von Staphylokinase

1. Einleitung

[0028] Wie vorstehend erwähnt enthält die Wildtyp-Staphylokinase (SakSTAR-Variante (9)) drei nicht-überlappende immundominante Epitope, von denen zwei durch spezifischen stellengerichteten Austausch der Cluster von zwei (K35A, E38A oder E80A, D82A) oder drei (K74A, E75A, R77A) geladenen Aminosäuren gegen Ala eliminiert werden können. Die Kombinationsmutanten SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A), in denen Lys35, Glu 38, Lys74, Glu75 und Arg77, und SakSTAR(K74A, E75A, R77A, E80A, D82A), in denen Lys74, Glu75, Arg77, Glu80 und Asp82 gegen Ala ausgetauscht worden waren (vorher identifiziert als SakSTAR.M3.8 bzw. SakSTAR.M8.9 (22)), hatten Befunden zufolge eine reduzierte Aktivität mit monoklonalen Maus-Antikörpern gegen zwei der drei immundominanten Epitope und absorbierten durchschnittlich nur 2/3 der in 16 Patienten durch Behandlung mit Wildtyp-SakSTAR ausgelösten neutralisierenden Antikörper (22). Diese Mutanten induzierten in experimentellen Thrombolysemodellen in Kaninchen und Pavianen sowie in Patienten mit peripherem Arterienverschluss auch weniger Antikörper-Bildung als Wildtyp-SakSTAR (22).

[0029] Ihre spezifischen Aktivitäten waren jedoch auf etwa 50% von derjenigen von Wildtyp-SakSTAR reduziert, was in Bezug auf die klinische Verwendung dieser Verbindungen eine gewisse Bedeutung hat.

[0030] Bei einem Versuch zur Verbesserung der Aktivität und Stabilität ohne Verlust der reduzierten Antikörper-Erkennung wurde die Wirkung einer systematischen Umkehr von einer oder mehreren dieser ausgetauschten Aminosäuren zu den Wildtyp-Resten untersucht. Es wurden 14 neue Mutanten konstruiert, gereinigt und in Bezug auf spezifische Aktivität, Reaktivität mit der Gruppe der monoklonalen Maus-Antikörper und Absorption der Antikörper aus Plasma von mit Wildtyp-SakSTAR behandelten Patienten charakterisiert (Tabelle 1). Das vorliegende Beispiel betrifft somit die Umkehr von Alanin zu dem Wildtyp-Rest von einer oder mehreren der vorstehend genannten sieben Aminosäuren von SakSTAR, d.h. K35, E38, K74, E75, R77, E80 und D82.

2. Reagenzien und Verfahren

[0031] Die Quelle für sämtliche in der erfindungsgemäßen Untersuchung verwendeten Reagenzien wurde zuvor beschrieben (22). Restriktionsenzyme wurden von Pharmacia (Uppsala, Schweden) oder Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) erhalten. T4-DNA-Ligase, Klenow-Fragment von E.-coli-DNA-Polymerase I und alkalische Phosphatase wurden von Boehringer Mannheim erhalten. Die Enzymreaktionen wurden unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mittels QIAGEN-Reinigungsprotokoll (bereitgestellt von Westburg, Leusden, Niederlande) isoliert. pMEX.602sakB (d.h. pMEX.SakSTAR) wurde wie an anderer Stelle beschrieben konstruiert (23). SakSTAR, SakSTAR(K35A, E38A), SakSTAR(K74A, E75A, R77A), SakSTAR(E80A, D82A), SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) und SakSTAR (K74A, E75A, R77A, E80A, D82A) wurden wie an anderer Stelle beschrieben hergestellt und gereinigt (22). E. coli-Transformationen wurden mit dem Calciumphosphat-Verfahren durchgeführt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem Dideoxy-Kettenabbruchreaktionsverfahren und der automatischen Laser-Fluoreszenz A.L.F.TM (Pharmacia). Das chromogene Substrat (S2403) L-Pyroglyutamyl-L-phenylalanyl-L-lysin-p-nitroanilin-Hydrochlorid wurde von Chromogenix (Belgien) bezogen. ¹²⁵I-markiertes Fibrinogen wurde von Amersham (GB) erhalten. Sämtliche anderen, in dem erfindungsgemäßen Beispiel verwendeten Verfahren, wurden vorher beschrieben (22, 27).

3. Konstruktion von Expressionsplasmiden

[0032] Die Plasmide, die SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A), SakSTAR(E38A, E75A, R77A), SakSTAR(E38A, E75A), SakSTAR(K35A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, E75A), SakSTAR(E80A), SakSTAR(D82A), SakSTAR(E75A, D82A), SakSTAR (K74A) und SakSTAR (E75A) codieren, wurden durch die Polymerasekettenreaktion mit gespleißter Überlappungs-Extension (SOE-PCR) konstruiert (24), wobei Vent-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Leusden, Niederlande) und erhältliche oder hergestellte SakSTAR-Varianten als Matrize verwendet wurden. Zwei Fragmente wurden durch PCR amplifiziert, wobei das erste Fragment von dem 5'-Ende des Staphylokinase-Gens mit dem Primer 5'-CAGGAAACAGAATTCAG-

GAG-3' bis zu dem zu mutagenisierenden Bereich (Vorwärts-Primer) ausging und das zweite Fragment vom gleichen Bereich (Rückwärts-Primer) bis zum 3'-Ende des Staphylokinase-Gens mit dem Primer 5'-CAAAA-CAGCCAAGCTTCATTCATTCAGC-3' ausging. Vorwärts- und Rückwärts-Primer haben eine gemeinsame Überlappung von etwa 24 bp (Primer nicht gezeigt). Die beiden gereinigten Fragmente wurden dann in einer neuen primerlosen PCR mit Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim) zusammengefügt. Nach 7 Zyklen (1 min bei 94°C, 1 min bei 70°C) wurde das verlängerte Produkt wieder amplifiziert, indem die Primer vom 5'-Ende und vom 3'-Ende (siehe oben) zu der PCR-Reaktion gegeben wurden, und indem folgender Zyklus 25 Mal wiederholt wurde (1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C, 1 min bei 72°C). Das Endprodukt wurde gereinigt, mit EcoRI und HindII gespalten und in die entsprechenden Stellen von pMEX602sakB kloniert. Das SakSTAR(E38A, K74A, E75A, R77A) codierende Plasmid wurde zusammengebaut durch Spaltung von pMEX602sakB und pMEX.SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) mit Bpml, das zwischen den Codons für K35 und E38 von SakSTAR spaltet, und Ligierung der erforderlichen Fragmente. Das SakSTAR(K35A, K74A, E75A, R77A) codierende Plasmid wurde zusammengebaut durch Spaltung von pMEX.SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) und pMEX.SakSTAR(K74A, E75A, R77A) mit Bpml und Religierung der erforderlichen Fragmente. Die SakSTAR(K35A, E38A, E75A, R77A) und SakSTAR(K35A, E38A, K74A, R77A) codierenden Plasmide wurden durch zwei PCR mittels pMEX.SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) als Matrize, gefolgt von Restriktionsligierung und neuerliche Klonierung in pMEX602sakB konstruiert.

4. Expression und Reinigung von SakSTAR-Varianten

[0033] Die SakSTAR-Varianten wurden wie nachstehend beschrieben aus transformiertem E. coli WK6-Bakterien exprimiert und gereinigt, die entweder in LB-Medium [SakSTAR(E38A, K74A, E75A, R77A), SakSTAR(K74A), SakSTAR(E75A) und SakSTAR(E75A, D82A)], oder in Terrific-Broth-(TB)-Medium (28) [SakSTAR(K35A, K74A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, E38A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, E38A, K74A, R77A), SakSTAR(K35A, E38A, E75A), SakSTAR(E38A, E75A, R77A), SakSTAR(E38A, E75A), SakSTAR(K35A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, E75A), SakSTAR(E80A), und SakSTAR(D82A)] gezüchtet worden waren.

[0034] Für Derivate, die in LB-Medium hergestellt wurden, wurde ein 20 ml-Aliquot einer über Nacht gesättigten Kultur zum Animpfen eines 2 Liter-Volumens LB-Medium verwendet, das 100 g/ml Ampicillin enthielt. Nach 3 Std. Inkubation bei 37°C wurde IPTG (200 mol/l) zur Induktion der Expression vom tac-Promotor hinzugefügt. Die Produktionsphase konnte 4 Std. weiter fortschreiten, wonach die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 U/min für 20 min pelletiert wurden, in 1/20 Volumen (100 ml) 0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH-Wert 6,5, resuspendiert wurden und durch Ultraschallbehandlung bei 0°C aufgebrochen wurden. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 20000 U/min entfernt, und der Überstand mit der cytosolischen löslichen Proteinfraction wurde bei -20°C bis zur Reinigung aufbewahrt.

[0035] Für die in TB-Medium erzeugten Derivate wurde ein 4 ml-Aliquot einer über Nacht gesättigten Kultur in LB-Medium zum Animpfen einer 2 l-Kultur in Terrific Broth mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet. Die Kultur wurde unter starker Belüftung für 20 Std. bei 30°C gezüchtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert, in 1/10 Volumen (200 ml) 0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH-Wert 6,5, resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung bei 0°C aufgebrochen. Die Suspension wurde dann 20 min bei 20000 U/min zentrifugiert, und der Überstand wurde bis zur Reinigung bei -20°C aufbewahrt. Die geklärten Zelllysate mit den SakSTAR-Varianten wurden auf einer 1,6 × 6 cm SP-Sephadex-Säule und anschließend auf einer 1,6 × 5 cm Q-Sepharose-Säule [Varianten SakSTAR(E38A, K74A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, K74A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, E38A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, E38A, K74A, R77A) und SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A)] oder auf einer 1,6 × 6 cm Phenylsepharose-Säule [Varianten SakSTAR(E35A, E38A, R77A), SakSTAR(E38A, E75A), SakSTAR(K35A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, E75A), SakSTAR(K74A), SakSTAR(E75A), SakSTAR(E80A), SakSTAR(D82A) und SakSTAR(E75A, D82A)] chromatographisch aufgetrennt. Die SakSTAR-haltigen Fraktionen, die durch SDS-Gelelektrophorese lokalisiert wurden, wurden zur weiteren Analyse vereinigt.

5. Physikalisch-chemische und biochemische Analyse

[0036] Die Proteinkonzentrationen wurden gemäß Bradford (29) bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten der SakSTAR-Lösungen wurden mit einem Test mittels chromogenem Substrat bestimmt, der in Mikrotiterplatten mit einem Gemisch von 80 µl SakSTAR-Lösung und 100 µl Glu-Plasminogen-Lösung, wie an anderer Stelle beschrieben (30) hergestellt, durchgeführt wurde (Endkonzentration 0,5 µmol/l). Nach der Inkubation für 30 min bei 37°C wurde das erzeugte Plasmin durch Zugabe von 20 µl S2403 (Endkonzentration 1 mmol/l) und Messung der Absorption bei 405 nm quantifiziert. Die Aktivität wurde in Home-Einheiten (HU) durch Vergleich

mit einem im Labor gängigen Standard (lot STAN5) ausgedrückt, dem eine Aktivität von 100000 HU (100 kHU) pro mg Protein entsprechend der Bestimmung der Aminosäure-Zusammensetzung zugeschrieben wurde (7). Die SDS-PAGE wurde mit dem Phast System™ (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit 10-15%igen Gradienten-Gelen und Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung durchgeführt. Die Reduktion der Proben wurde durch Erwärmen für 3 min bei 100°C in Gegenwart von 1 % SDS und 1 % Dithiothreitol durchgeführt. Die mit dem chromogenen Substrat-Test bestimmten spezifischen Aktivitäten der verschiedenen SakSTAR-Mutanten sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

6. Bindung an monoklonale Maus-Antikörper

[0037] In Übereinstimmung mit vorhergehenden Beobachtungen (22) reagierte SakSTAR(K74A, E75A, R77A) nicht mit 4 der 5 MAks, die Epitop I erkennen, wohingegen SakSTAR(K35A, E38A) nicht mit 3 der 5 reagierte und SakSTAR(E80A, D82A) nicht mit 4 der 5 MAks, die Epitop III erkennen. Diese reduzierten Reaktivitäten waren in SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) und in SakSTAR(K74A, E75A, R77A, E80A, D82A) additiv. Die reduzierte Reaktivität von SakSTAR(K74A, E75A, R77A) blieb in SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A) und in SakSTAR(K35A, E75A, R77A) vollständig, in SakSTAR(K35A, E38A, E75A, R77A), SakSTAR(E38A, E75A, R77A), SakSTAR(E38A, E75A) und SakSTAR(E75A) zum Großteil erhalten, war jedoch viel schwächer in SakSTAR(K35A, E38A, K74A, R77A) und SakSTAR(K74A), was zeigt, dass E75 hauptsächlich an der Bindung der 4 MAks, die das Epitop I von SakSTAR erkennen, beteiligt ist. Überraschenderweise war jedoch die Bindung von Epitop I-Antikörper an SakSTAR(E57A, D82A) in zwei unabhängigen Präparaten aus Expressionplasmiden mit bestätigten DNA-Sequenzen normal. Die reduzierte Reaktivität der 3 MAks von Epitop III mit SakSTAR(K35A, E38A) erforderte sowohl K35 als auch E38, wie mit SakSTAR(E38A, K74A, E75A, R77A) und SakSTAR(K35A, K74A, E75A, R77A), mit SakSTAR(E38A, E75A) und SakSTAR(K35A, E75A) und mit SakSTAR (E38A, E75A, R77A) und SakSTAR(K35A, E75A, R77A) gezeigt wurde. Die reduzierte Reaktivität der 4 MAks des Clusters III mit SakSTAR(E80A, D82A) wurde in SakSTAR(D82A) aufrechterhalten, aber nicht in SakSTAR(E80A).

7. Absorption von in Patienten durch Behandlung mit Wildtyp-SakSTAR ausgelösten Antikörpern

[0038] Plasmaproben aus 16 Patienten mit akutem Myokardinfarkt, erhalten mehrere Wochen nach der Behandlung mit SakSTAR (4, 31), wurden verwendet. Die Staphylokinase-neutralisierende Aktivität in diesen Proben wurde folgendermaßen bestimmt. Steigende Konzentrationen von Wildtyp-SakSTAR oder SakSTAR-Variante (50 µl Volumina mit 0,2 bis 1000 µg/ml) wurden zu einem Gemisch aus 300 µl citratbehandeltem Plasma und 50 µl Puffer oder Test-Plasma gegeben, unmittelbar gefolgt von der Zugabe von 100 µl eines Gemisches mit Thrombin (50 NIH-Einheiten/ml) und CaCl₂ (25 mmol/l). Die Plasmagerinnungszeit wurde gemessen und gegen die Konzentration der SakSTAR-Einheit aufgetragen. Aus dieser Kurve wurde die Konzentration der Staphylokinase-Einheit bestimmt, die eine vollständige Gerinnungs-Lyse in 20 min erzeugte. Der Neutralisierungs-Aktivitäts-Titer wurde als Unterschied zwischen dem Testplasma und den Pufferwerten bestimmt, und wurde ausgedrückt als µg pro ml Testplasma. Die Ergebnisse der einzelnen Patienten sind an anderer Stelle angegeben (22). Für die vorliegende Erfindung wurden drei Plasmapools erstellt, und zwar ein Pool aus 10 Patienten, von denen genügend Restplasma verfügbar war, ein Pool aus drei Patienten, die weniger als 50% der Antikörper mit SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75, R77A) absorbierten (Subpool B) und ein Pool aus drei Patienten, die > 90% der Antikörper mit SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) absorbierten (Subpool C). Diese Plasmapools wurden verdünnt (1/30 bis 1/200), bis ihre Bindung an SakSTAR-substituierte Chips in dem BIAcore-Gerät etwa 2000 RU ausmachte. Aus dieser Verdünnung wurde eine Kalibrierungskurve für die Antikörper-Bindung erstellt, wobei weitere zweifache Verdünnungsreihen erstellt wurden. Die Plasmapools wurden für 10 min mit 100 nmol/l der SakSTAR-Varianten absorbiert, und die Restbindung an immobilisiertes SakSTAR wurde bestimmt. Die Restbindung wurde ausgedrückt in Prozent des nichtabsorbierten Plasmas, wobei die Kalibrierungskurve verwendet wurde.

[0039] Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. Wildtyp-SakSTAR absorbierte zwar mehr als 95% der Bindungs-Antikörper aus dem vereinigten Plasma der 10 Patienten, jedoch wurde eine unvollständige Absorption (< 60%) mit SakSTAR(K74A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A), SakSTAR(E38A, K74A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, K74A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, E38A, K74A, R77A), SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A), SakSTAR(K74A) und SakSTAR(K74A, E75A, R77A, E80A, D82A) beobachtet, jedoch war die Absorption mit SakSTAR(K35A, E38A), SakSTAR(K35A, E38A, E75A, R77A), SakSTAR(E38A, E75A, R77A), SakSTAR(E38A, E75A), SakSTAR(K35A, E75A, R77A), SakSTAR(K35A, E75A), SakSTAR(E75A), SakSTAR(E80A, D82A), SakSTAR(E80A), SakSTAR(D82A) und SakSTAR(E75A, D82A) nahezu vollständig. Diese Ergebnisse zeigen überraschenderweise, dass etwa 40% der in Patienten durch Behandlung mit Wildtyp-SakSTAR ausgelösten Antikörper für ihre Bindung von K74 ab-

hängen (Tabelle 1). Die Absorption mit vereinigttem Plasma vom 3 Patienten, von denen < 50% der Antikörper mit SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) absorbiert waren (Subpool B), bestätigte die vorherrschende Rolle von K74 für die Antikörpererkennung. Die Absorption mit vereinigttem Plasma von 3 Patienten, von denen > 95% der Antikörper mit SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) absorbiert wurden (Subpool C), war erwartungsgemäß mit allen untersuchten Varianten nahezu vollständig.

BEISPIEL 3

Vergleichende thrombolytische Wirksamkeit und Immunogenität von SakSTAR(K74A, E75A, R77A) und SakSTAR(K74A) gegen SakSTAR in Patienten mit peripherem Arterienverschluss

1. Reinigung von SakSTAR(K74A, E75A, R77A) und SakSTAR(K74A) zur In-vivo-Verwendung

[0040] Eine 12- bis 24-Liter-Kultur (in 2-Liter-Ansätzen) der Varianten SakSTAR(K74A, E75A, R77A) oder SakSTAR(K74A) wurde in LB-Medium, das mit 100 µg/ml Ampicillin angereichert war, gezüchtet und mit IPTG induziert, pelletiert, resuspendiert, durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen und wie vorstehend beschrieben geklärt. Die Verbindungen wurden durch Chromatographie auf einer 5 × 20 cm SP-Sephadex-Säule, einer 5 × 10 cm Q-Sepharose-Säule und/oder einer 5 × 13 cm Phenylsepharose-Säule mit den an anderer Stelle beschriebenen Puffersystemen (22, 23) gereinigt. Die Materialien wurden dann auf sterilisiertem Superdex 75 gelfiltriert, so dass ihr Endotoxin-Gehalt weiter reduziert wurde. Die Fraktionen mit der SakSTAR-Variante wurden vereinigt, die Proteinkonzentration wurde auf 1 mg/ml eingestellt und das Material durch Filtration durch einen 0,22 µm Millipore-Filter sterilisiert. Die zur Bestimmung der biologischen Eigenschaften des Endmaterials verwendete Methodik zur In-vivo-Verwendung ist oben und an anderer Stelle beschrieben (22).

2. Materialien und Verfahren

[0041] Die Staphylokinase-neutralisierende Aktivität in Plasma wurde wie vorstehend beschrieben bestimmt. Die Quantifizierung antigen-spezifischer IgG- und IgM-Antikörper wurde im Wesentlichen wie vorher beschrieben (22) mittels Enzymimmuntests in Polystyrol-Mikrotiterplatten durchgeführt. Bei den IgG-Tests waren die Verdünnungskurven der affinospezifischen Anti-SakSTAR-IgG-Antikörper auf jeder Platte enthalten. Diese Antikörper wurden aus dem von 3 Patienten nach der thrombolytischen Therapie mit Wildtyp-SakSTAR erhaltenen Plasma durch Chromatographie auf Protein-A-Sepharose und auf unlöslich gemachtem SakStar und Elution gebundener Antikörper mit 0,1 mol/l Glycin-HCl, pH-Wert 2,8, isoliert. Die Reinheit des IgG-Präparates wurde durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestätigt. In den IgM-Tests wurden die Titer, die als Plasmaverdünnung definiert waren und die eine Absorption bei 492 nm äquivalent zu derjenigen einer 1/640-Verdünnung von vereinigttem Plasma ergaben, bestimmt und mit dem Titer von Grundlinien-Proben vor der Behandlung verglichen (Mittelwert 1/410, Interquartil-Bereich 1/20-1/700).

3. Thrombolytische Wirksamkeit

[0042] Wildtyp-SakSTAR oder die Varianten SakSTAR(K74A) oder SakSTAR(K74A, E75A, R77A) wurden intraarteriell bei dem proximalen Ende oder in das proximale Ende des verschließenden Thrombus als Bolus von 2 mg, gefolgt von einer Infusion von 1 mg/Std. (bei einigen Patienten auf 0,5 mg/Std. reduziert) in Gruppen von 6 bis 12 Patienten mit angiographisch dokumentiertem Verschluss einer peripheren Arterien oder Bypass-Transplantat von weniger als 120 Tagen Dauer verabreicht. Die Patienten wurden untersucht, nachdem sie ihre Einwilligung gegeben hatten und das Protokoll durch das Human Studies Committee der Universität Leuven genehmigt worden war. Einschluss- und Ausschluss-Kriterien, die verbindende Antithrombose-Behandlung (einschließlich kontinuierlichem intravenösem Heparin) und das Untersuchungsprotokoll waren im Wesentlichen wie zuvor beschrieben (22).

[0043] Relevante Grundlinien-Eigenschaften der einzelnen Patienten sind in der Tabelle 2 gezeigt. Der Großteil von PAO war auf femoropoplitealem Niveau. Es waren zwei Iliumstent- und 8 Transplantatverschlüsse enthalten. Acht Patienten litten an behinderndem Hinken, 5 an chronischem ischämischen Restschmerz, 7 an subakuter Ischämie und 7 an akuter Ischämie. Ein Patient (POE), der 2 Jahre zuvor mit SakSTAR behandelt worden war, wurde in die SakSTAR(K74A)-Gruppe aufgenommen. Dieser Patient wurde nicht in die statistischen Analysen aufgenommen.

[0044] Die Tabelle 2 fasst ebenfalls die einzelne Behandlung und die Ergebnisse zusammen. Intraarterielle Infusion bei einer Dosis von 6,0 bis 25 mg und einer Dauer von 4,0 bis 23 Std. induzierten eine vollständige Rekanalisierung in 24 Patienten und partielle Rekanalisierung bei 3 Patienten. Vollständige endovaskuläre

Verfahren (überwiegend PTA) wurden bei 17 Patienten und eine komplementäre rekonstruktive vaskuläre Chirurgie nach Thrombose bei 3 Patienten durchgeführt. Kein Patient durchlief eine größere Amputation. Frühe Rezidive der Thrombose nach dem Ende des angiographischen Verfahrens traten bei 4 Patienten auf. Blutungskomplikationen traten außer bei 5 Patienten, die eine Transfusion benötigten (Daten nicht gezeigt), nicht auf oder eingeschränkt bis zu einer schwachen bis mäßigen Hämatombildung an den Angiographie-Einstichstellen. Intrakranielle oder viscerale Hämorrhagie wurde nicht beobachtet. Die Spiegel von zirkulierendem Fibrinogen, Plasminogen und α_2 -Antiplasmin blieben während der Infusion der SakSTAR-Einheiten im Wesentlichen unverändert (Daten nicht gezeigt), was eine absolute Fibrin-Spezifität der Staphylokinase bei den verwendeten Dosierungen bestätigt. Signifikante In-vivo-Fibrin-Spaltung trat auf, wie es durch die Erhöhung der Fibrinfragment-D-Dimerspiegel angezeigt wurde. Eine intraarterielle Heparin-Therapie verlängerte die aPTT-Spiegel in einem variablen Maße (Daten nicht gezeigt).

4. Antikörper-Induktion

[0045] Antikörper-bezogene SakSTAR-, SakSTAR(K74A)- und SakSTAR(K74A, E75A, R77A)-neutralisierende Aktivität und Anti-SakSTAR-, Anti-SakSTAR(K74A)- und Anti-SakSTAR(K74A, E75A, R77A)-IgG waren an der Grundlinie und während der ersten Woche nach der Infusion niedrig (**Fig. 2**). Von der zweiten Woche an stiegen die Neutralisierungsaktivitäts-Spiegel und erreichten nach 3 bis 4 Wochen Mittelwerte von 20 μg SakSTAR(K74A) und 2,4 μg SakSTAR(K74A, E75A, R77A), neutralisiert pro ml Plasma in den mit SakSTAR(K74A) bzw. SakSTAR(K74A, E75A, R77A) behandelten Patienten, was erheblich niedriger ist als der Mittelwert von 93 μg Wildtyp-SakSTAR, neutralisiert pro ml in den mit SakSTAR behandelten Patienten ($p = 0,024$ für Unterschiede zwischen den drei Gruppen durch Kruskal-Wallis-Analyse und $p = 0,01$ bzw. $p = 0,036$, für Varianten gegen Wildtyp durch den Mann-Whitney-Rangsummentest). Die Spiegel von Anti-SakSTAR(K74A) und von Anti-Sakstar(K74A, E75A, R77A)-IgG stiegen nach 3 bis 4 Wochen auf Mittelwerte von 270 und 82 $\mu\text{g/ml}$ Plasma in Patienten, die mit SakSTAR(K74A) bzw. SakSTAR(K74A, E75A, R77A) behandelt worden waren, was signifikant niedriger ist als der Mittelwert von 1800 μg Anti-SakSTAR pro ml Plasma in den Patienten, die mit SakSTAR behandelt worden waren ($p = 0,024$ für Unterschiede zwischen den drei Gruppen durch Kruskal-Wallis-Analyse und $p = 0,007$ bzw. 0,05, für die Varianten gegen Wildtyp durch den Mann-Whitney-Rangsummentest).

[0046] Die Titer von Anti-SakSTAR (K74A) und Anti-SakSTAR (K74A, E75A, R77A)-IgM stiegen von mittleren Grundlinienwerten von 1/460 und 1/410 auf Mittelwerte bei 1 Woche von 1/510 und 1/450 in Patienten, die mit SakSTAR(K74A) bzw. SakSTAR(K74A, E75A, R77A) behandelt worden waren, was sich nicht signifikant von den Mittelwerten 1/320 an der Grundlinie und 1/640 nach Woche 1 in Patienten unterscheidet, die mit SakSTAR behandelt worden waren. Entsprechende Werte nach 2 Wochen waren 1/590 und 1/550 bei Patienten, denen SakSTAR(K74A) und SakSTAR(K74A, E75A, R77A) gegeben worden war, was sich nicht signifikant von 1/930 mit SakSTAR unterscheidet (Daten nicht gezeigt). Die durch Behandlung mit SakSTAR induzierten Antikörper wurden vollständig von SakSTAR absorbiert, jedoch unvollständig von SakSTAR(K74A) und von SakSTAR(K74A, E75A, R77A), was die Immunogenität des Epitops K74, E75, R77 und die dominante Rolle von K74 bei der Bindung der gegen dieses Epitop gerichteten Antikörper bestätigt. Die Antikörper, die durch Behandlung mit SakSTAR(K74A) oder SakSTAR(K74A, E75A, R77A) induziert wurden, wurden vollständig durch SakSTAR, SakSTAR(K74A) und SakSTAR(K74A, E75A, R77A) absorbiert, was zeigt, dass die Immunisierung nicht auf den Neoepitopen beruhte, die durch Austausch von Lys74 gegen Ala erzeugt wurden, sondern von Epitopen abhing, die sich von dem K74, E75, R77-Epitop unterschieden.

[0047] Somit veranschaulicht dieses Beispiel, dass Staphylokinase-Varianten mit reduzierter Antikörperinduktion, aber intakter thrombolytischer Wirksamkeit erzeugt werden können. Die derzeitige Erfahrung an 26 Patienten, die mit SakSTAR ($n = 9$), SakSTAR(K74) ($n = 11$) und SakSTAR(K74A, E75A, R77A) ($n = 6$) behandelt worden waren, und die vorherige Erfahrung bei 14 Patienten mit SakSTAR ($n = 7$) und SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) ($n = 7$) (31) und bei 24 Patienten mit SakSTAR (32) und mit der anschließenden nicht-randomisierten Erfahrung bei Patienten mit SakSTAR ($n = 30$), mit SakSTAR(K74A) ($n = 12$) und mit SakSTAR(K74A, E75A, R77A) ($n = 7$) (Daten nicht gezeigt), ermöglicht eine anfängliche Abschätzung der Prävalenz der Immunisierung durch intraarterielle Behandlung mit SakSTAR oder Varianten mit einem veränderten K74, E75, R77-Epitop [SakSTAR(K74A), SakSTAR(K74A, E75A, R77A) und SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A)]. Die Neutralisierungsaktivitätsdaten nach 2 bis 4 Wochen, die in 70 Patienten mit peripherem Arterienverschluss, denen intraarterielles SakSTAR gegeben worden war, verfügbar waren, ergaben, dass 56 Patienten (80 Prozent) Spiegel $> 5 \mu\text{g}$ Verbindung, neutralisiert pro ml Plasma, aufwiesen. Von den 43 Patienten, denen SakSTAR(K74A), SakSTAR(K74A, E75A, R77A) oder SakSTAR(K74A, E75A, K74A, E75A, R77A) gegeben worden war, hatten 27 (63 Prozent) Neutralisierungsaktivitätsspiegel von $> 5 \mu\text{g}$ Verbindung pro ml Plasma. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0,05$ mittels Fischer's exaktem Test), was zeigt, dass

das K74, E75, R77-Epitop eine Hauptdeterminante der Antikörperinduktion ist.

BEISPIEL 4

Konstruktion, Epitop-Kartierung mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Absorption mit vereinigttem Plasma immunisierter Patienten von Alanin-Substitutionsmutanten von Staphylokinase

1. Einleitung

[0048] Stellengerichtete Mutagenese wurde bei anderen Resten als bei "geladenen Aminosäuren" angewendet, um folgendes zu identifizieren: i) zusätzliche Reste, die zu den Epitopen I und III gehören, und die mit der Gruppe der Maus-MAKs identifiziert wurden, und ii) Aminosäuren, die die Absorption an Antiserum aus immunisierten Patienten bestimmen. Da die funktionellen Epitope gewöhnlich mehr als einen Aminosäure-Rest umfassen, der für die Antikörperbindung entscheidend ist, konnte die Identifizierung zusätzlicher Reste in diesen Epitopen zur Konstruktion neuer Kombinationsderivate führen, die ein niedrigeres antigenes Profil zeigen, während die spezifische Aktivität und die Temperaturstabilität der Wildtyp-Staphylokinase beibehalten wird. In diesem Beispiel wird die Konstruktion und Charakterisierung von SakSTAR-Varianten, in denen eine oder höchstens zwei Aminosäuren (benachbart oder in unmittelbarer Nähe zueinander) durch Alanin ersetzt wurde, beschrieben. Die unter diesem Beispiel beschriebenen Mutanten sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Diese Varianten wurden in *E. coli* exprimiert, gereinigt und hinsichtlich ihrer spezifischen Aktivität, Reaktivität mit der Gruppe monoklonaler Maus-Antikörper und Absorption der Antikörper aus Plasma von mit Wildtyp-SakSTAR behandelten Patienten charakterisiert.

2. Reagenzien und Verfahren

[0049] Die Quelle für sämtliche in der erfindungsgemäßen Untersuchung verwendeten Reagenzien wurde zuvor beschrieben (22) oder ist nachstehend angegeben. Der Matrizenvektor für die Mutagenese, pMEX602sakB (d.h. pMEX.SakSTAR), ist an anderer Stelle beschrieben (23). Restriktions- und Modifikationsenzyme wurden von New England Biolabs (Leusden, Niederlande), Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) oder Pharmacia (Uppsala, Schweden) erhalten. Die Enzymreaktionen wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Mutagene Oligonukleotide und Primer wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) erhalten. Die Plasmid-DNA wurde mit einem Reinigungs-Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) oder dem BIO 101 RPM-Kit (Vista, CA), wie empfohlen isoliert. Transformationskompetente *E. coli*-Zellen wurden durch das bekannte Calciumphosphat-Verfahren hergestellt. Die Nukleotidsequenz-Bestimmung wurde an doppelsträngiger Plasmid-DNA mit dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren durchgeführt, wobei das T7-Sequenzier-Kit (Pharmacia, Uppsala, Schweden) verwendet wurde. Die Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden mit Taq-Polymerase von Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) oder Vent-Polymerase (New England Biolabs, Leusden, Niederlande) durchgeführt. Die in diesem Beispiel beschriebenen und zur Konstruktion der Varianten erforderlichen DNA-Rekombinationsverfahren sind gut etabliert (22, 27).

3. Konstruktion von Expressionsplasmiden

[0050] Die Varianten SakSTAR(Y17A, F18A), SakSTAR(F104A), SakSTAR(F111A), SakSTAR(Y9A), SakSTAR(Y91A), SakSTAR(Y92A), SakSTAR(I87A), SakSTAR(I106A) und SakSTAR(I120A) wurden mit dem Chameleon-Kit für stellengerichtete Mutagenese mit Doppelstrang von Stratagene (La Jolla, USA) konstruiert, wobei der pMEX.SakSTAR-Vektor als Matrize verwendet wurde und die Anweisungen des Herstellers befolgt wurden. Die mutagenen Oligonukleotide (nicht gezeigt) wurden in Kombination mit dem Selektions-Primer LY34 5' CAAAACAGCCGAGCTTCATTCATTCAGC verwendet, der die einzige HindIII-Stelle zerstört, die sich 3' von dem Staphylokinase-codierenden Gen in pMEX.SakSTAR befindet, und der die Gegenselektion nicht-mutierter Nachkommen durch HindIII-Spaltung ermöglicht. Die Deletion der HindIII-Stelle war in den meisten Fällen mit dem Vorhandensein der gewünschten Mutation korreliert, die durch das mutagene Oligonukleotid eingebracht wurde. Die Variante SakSTAR(I133A) wurde konstruiert, indem eine Polymerasekettenreaktion mit dem pMEX.SakSTAR-Plasmid durchgeführt wurde, wobei der am 5'-Ende des sakSTAR-Gens befindliche Primer 818A (5'CAGGAAACAGAATTCAGGAG) und der mutagene Primer LY58 (5'TTCAGCATGCTGCAGTTATTTCTTTCTGCAACAACCTTGG) verwendet wurden. Das amplifizierte Produkt (30 Zyklen: 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 50°C, 30 sec bei 72°C) wurde gereinigt, mit EcoRI und PstI gespalten und in die entsprechenden Stellen von pMEXSakSTAR ligiert. Die Varianten SakSTAR(I128), SakSTAR(L127A) und SakSTAR(N126V) wurden konstruiert, indem eine Polymerasekettenreaktion mit dem am 5'-Ende des sakSTAR-Gens befindlichen Primer 818A und den mutagenen Primern (nicht gezeigt) durchgeführt wurde. Das amplifizierte Produkt (30 Zyklen: 1 sec bei 94°C, 1 sec bei 50°C, 10 sec bei 72°C) wurde

gereinigt, mit EcoRI und Styl gespalten und in die entsprechenden Stellen von pMEXSakSTAR ligiert.

[0051] Die Variante SakSTAR(F125A) wurde über die Durchführung von zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen (30 Zyklen: 30 sec bei 94°C, 30 sec. bei 50°C, 30 sec. bei 72°C) konstruiert. In der ersten Reaktion wurde ein Fragment von pMEX.SakSTAR mit den Primern 818A und einem mutagenen Primer amplifiziert. Dieses amplifizierte Fragment wurde dann als Matrize in einer zweiten PCR-Reaktion mit einem mutagenen Primer verwendet, um das Fragment stromabwärts der Styl-Stelle in dem sakSTAR-Gen (entsprechend den Aminosäuren 130-131 von SakSTAR) weiter zu verlängern. Das resultierende Produkt wurde mit EcoRI und Styl gespalten und in die entsprechenden Stellen von pMEXSakSTAR ligiert.

[0052] Die Plasmide, die sämtliche anderen in der Tabelle 3 aufgeführten Varianten codieren, wurden durch direkte PCR oder durch Polymerasekettenreaktion mit gespleißter Überlappungs-Extension (SOE-PCR) (24) mittels pMEX.SakSTAR oder verfügbaren Plasmiden, die SakSTAR-Varianten codieren, als Matrize konstruiert. Zwei Fragmente wurden durch PCR (30 Zyklen: 1 sec bei 94°C, 1 sec bei 50°C, 10 sec bei 72°C) amplifiziert, wobei das erste Fragment vom 5'-Ende (Primer 818A) des Staphylokinase-Gens bis zu dem zu mutagenisierenden Bereich (Vorwärtsprimer) ausging, und das zweite Fragment von eben diesem Bereich (Rückwärtsprimer) bis zum 3'-Ende des Gens mit dem Primer 818D (5'CAAACAGCCAAGCTTCATTCATTCAGC) ausging. Vorwärts- und Rückwärts-Primer hatten einen gemeinsamen überlappenden Bereich von etwa 24 by (Primer nicht gezeigt). Die zwei gereinigten Fragmente wurden dann in einer zweiten PCR-Reaktion mit den externen Primern 818A und 818D zusammengebaut (30 Zyklen: 1 sec bei 94°C, 1 sec bei 50°C, 10 sec bei 72°C). Das amplifizierte Produkt aus dieser Endreaktion wurde gereinigt, mit EcoRI und HindIII gespalten und in die entsprechende Stelle von pMEX.SakSTAR ligiert. Für jede Konstruktion wurde die Sequenz der Variante durch Sequenzieren des gesamten SakSTAR-codierenden Bereichs bestätigt.

4. Expression und Reinigung der SakSTAR-Varianten

[0053] Die SakSTAR-Varianten wurden wie vorstehend beschrieben aus transformierten E. coli exprimiert und gereinigt, die in Terrific-Broth-(TB)-Medium (28) gezüchtet worden waren. Ein 2- bis 4 ml-Aliquot einer über Nacht gesättigten Kultur in LB-Medium wurde zum Animpfen einer 1- bis 2-Liter-Kultur in Terrific Broth verwendet, die mit 100 µg/ml Ampicillin angereichert war. Die Kultur wurde unter starker Belüftung und bei 30°C inkubiert. Nach etwa 16 Std. Inkubation wurde IPTG (200 µmol/l) zur Induktion der Expression vom tac-Promotor zu der Kultur gegeben. Nach 3 Std. Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 U/min für 20 min pelletiert, in 1/10 Volumen 0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH-Wert 6-6,5, resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung bei 0°C aufgebrochen. Die Suspension wurde für 20 min bei 20000 U/min zentrifugiert, und der Überstand wurde bei 4°C oder bei -20°C bis zur Reinigung aufbewahrt. Das Material wurde im Wesentlichen wie vorstehend beschrieben gereinigt (Beispiel 2): geklärte Zell-Lysate, die die SakSTAR-Varianten enthielten, wurden auf einer 1,6 × 5 cm SP-Sephadex-Säule und anschließend auf einer 1,6 × 8 cm Phenylsepharose-Säule chromatographisch aufgetrennt. Die SakSTAR enthaltenden Fraktionen, die durch SDS-Gelelektrophorese lokalisiert wurden, wurden zur weiteren Analyse vereinigt.

5. Physikalisch-chemische und biochemische Analyse

[0054] Die Proteinkonzentrationen wurden gemäß Bradford (29) bestimmt. SDS-PAGE wurde mit dem Phast System™ (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mittels 10-15%igen Gradientengelen und Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung durchgeführt, und die spezifischen Aktivitäten der SakSTAR-Lösungen wurden mit einem in Mikrotiterplatten (wie in Beispiel 2 beschrieben) durchgeführten chromogenen Substrat-Test bestimmt. Die spezifische Aktivität der verschiedenen SakSTAR-Varianten ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

6. Reaktivität der SakSTAR-Varianten mit einer Gruppe monoklonaler Maus-Antikörper.

[0055] Die zur Bestimmung der Reaktivität der SakSTAR-Varianten mit einer Gruppe monoklonaler Maus-Antikörper verwendete Methodik wurde im vorstehenden Beispiel 1 beschrieben. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefasst (das Layout dieser Tabelle entspricht dem Layout der Tabelle 1, wie in Beispiel 1 beschrieben). Die apparenten Assoziationskonstanten, die mindestens zehnmal niedriger als bei der Wildtyp-Staphylokinase waren, wurden als signifikant angesehen, und sind in der Tabelle fett gedruckt angegeben.

[0056] Zur Gewinnung einer umfassenden Liste der Eigenschaften von Ala-Substitutionsvarianten des SakSTAR-Moleküls wurden 67 Plasmide, die Varianten mit einem Austausch einer einzelnen oder von zwei benachbarten Aminosäuren gegen Ala codieren, konstruiert, exprimiert und gereinigt. Zusammen mit den vorher beschriebenen (22 und Beispiel 2) 35 geladenen Rest-zu-Ala-Substitutionsvarianten deckt diese Analyse

sämtliche Reste in SakSTAR ab, außer Gly, Ala und Pro, wie in der **Fig. 3** veranschaulicht. Acht der Varianten konnten in erster Linie wegen niedriger Expressionsspiegel nicht in gereinigter Form erhalten werden, 11 Varianten waren inaktiv, 56 hatten eine reduzierte spezifische Aktivität und 27 hatten eine aufrechterhaltene oder erhöhte spezifische Aktivität (≥ 100 kHU/mg). Die Ausbeuten des gereinigten Materials aus den Kulturen der exprimierten Plasmide waren 16 mg/l (Mittelwert, 10 bis 90 Perzentil-Bereich 4 bis 41 mg/l). Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte übereinstimmend eine Hauptbande mit $M \approx 16000$, was gewöhnlich 95% des Gesamtproteins ausmacht (nicht gezeigt).

[0057] Der Austausch von K35; N95, S103 oder K135 gegen Ala ergab Varianten mit spezifischen Aktivitäten von ≥ 200 kU/mg. Der Austausch von W66, Y73 oder E75 gegen Ala reduzierte die Reaktivität der Varianten mit ≥ 3 Antikörpern des Epitop-Clusters I, der Austausch von H43 oder V45 gegen Ala reduzierte diejenige mit 3 Antikörpern von Epitop-Cluster II, und der Austausch von V32, K35, D82 und K130 gegen Ala reduzierte diejenige mit ≥ 3 Antikörpern des Epitop-Clusters III.

7. Absorption von Antikörpern, ausgelöst in Patienten durch Behandlung mit SakSTAR

[0058] Für das erfindungsgemäße Beispiel wurden drei Plasmapools, wie in Beispiel 2 beschrieben, verwendet. Die zur Bewertung der Absorption mit Wildtyp-Staphylokinase und mit SakSTAR-Varianten verwendete Methodik von Antikörpern, die in mit SakSTAR behandelten Patienten ausgelöst wurden, ist eingehend in Beispiel 2 beschrieben. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefasst. Während Wildtyp-SakSTAR und die meisten der in diesem Beispiel analysierten Varianten mehr als 95% der bindenden Antikörper aus dem vereinigten Plasma der 10 Patienten absorbierten, wurde eine unvollständige Absorption ($< 60\%$) mit SakSTAR(Y73A) und mit SakSTAR(K74A) beobachtet. Die Hauptrolle von Lys74 für die Antikörpererkennung wurde zuvor gezeigt (siehe Beispiel 2). Die erfindungsgemäßen Ergebnisse zeigen, dass Tyr73 am gleichen Hauptepitop wie Lys74 beteiligt ist, oder alternativ, dass der Austausch an Tyr73 indirekt eine strukturelle Modifikation des "K74-Epitops" induzieren kann. Die Absorption mit dem vereinigten Plasma aus 3 Patienten, aus denen $> 95\%$ der Antikörper mit SakSTAR(K35A, E38A, K74A, E75A, R77A) absorbiert wurden (Subpool C, siehe Beispiel 2), war mit den meisten untersuchten Varianten nahezu vollständig.

BEISPIEL 5

Konstruktion, Epitopkartierung mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Absorption mit vereinigtem Plasma immunisierter Patienten von Staphylokinase-Varianten mit Austausch von S34, G36 und/oder H43.

[0059] Die natürliche Variante Sak42D unterscheidet sich von SakSTAR in drei Aminosäuren und entspricht SakSTAR(S34G, G36R, H43R). Sak42D ist durch eine reduzierte Reaktivität mit einigen Maus-Antikörpern der Epitop-Cluster II und III und eine leicht reduzierte Absorption von Antikörpern aus dem Plasma von mit SakSTAR behandelten Patienten gekennzeichnet (Tabelle 4). Die Mutagenese dieser Reste in SakSTAR ergab, dass die reduzierte Reaktivität mit dem Epitop-Cluster III und mit dem Plasma immunisierter Patienten der G36R-Substitution zugeschrieben werden konnte, die H43R-Substitution vermittelte die reduzierte Reaktivität mit Epitop-Cluster II, hatte aber keine Wirkung auf die Reaktivität mit dem Plasma immunisierter Patienten, wohingegen die S34A-Substitution keine Wirkung zeigte. Die G36R-Substitution konnte mit K74R kombiniert werden, aber nicht mit der K74A-Substitution, ohne dass die spezifische Aktivität signifikant reduziert wurde (Tabelle 4).

BEISPIEL 6

Konstruktion, Epitopkartierung mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Absorption mit vereinigtem Plasma aus immunisierten Patienten von Staphylokinase-Varianten mit Austausch von K35, E65, Y73, K74, E80+D82, N95, K130, V132, und/oder K135

[0060] Auf der Basis der Ergebnisse der Alanin-Austauschanalyse in Beispiel 4, wurden K35, N95 und K135 zur weiteren Analyse ausgewählt, weil SakSTAR(K35A), SakSTAR(N95A) und SakSTAR(K135A) eine doppelt so große spezifische Aktivität aufwiesen, Y73 und K74, weil SakSTAR(Y73A) und SakSTAR(K74A) eine deutlich reduzierte Reaktivität mit Antikörpern aus dem Epitop-Cluster I und eine verminderte Absorption von Antikörpern aus Plasma von durch Behandlung mit SakSTAR immunisierten Patienten hatten, und K35, E80+D82, K130 und V132, weil SakSTAR(K35A), SakSTAR(E80A, D82A), SakSTAR(K130A) und SakSTAR(V132A) eine verringerte Reaktivität mit Antikörpern aus dem Epitop-Cluster III aufwiesen.

[0061] In einem Versuch, das Verhältnis von Aktivität und Antigenität zu maximieren, wurden diese Amino-

säuren gegen andere Aminosäuren als Ala ausgetauscht. Wie in der Tabelle 5 zusammengefasst, ergab der Austausch von K35 gegen A, E oder Q, dass SakSTAR(K35A) die interessantesten Eigenschaften hatte, der Austausch von Y73 gegen F, H, L, S oder W rettete nicht die deutliche Reduktion der spezifischen Aktivität, und K74 bestätigte seine Schlüsselrolle bei der Bindung der Antikörper aus dem Plasma immunisierter Patienten, wobei die besten Verhältnisse von spezifischer Aktivität und Antigenität mit SakSTAR(K74Q) und SakSTAR(K74R) erhalten wurden. SakSTAR(E80A, D82A) wurde gegenüber den Einzelrest-Varianten SakSTAR(E80A) oder SakSTAR(D82A) wegen seiner etwas niedrigeren Reaktivität mit dem Plasma immunisierter Patienten bevorzugt. SakSTAR(N95A) konnte durch Austausch von N95 gegen E, G, K oder R nicht weiter verbessert werden, und es konnte seine erhöhte spezifische Aktivität nicht auf Varianten übertragen, die K174A oder K135R enthielten. Schließlich wurde SakSTAR(K130A) von SakSTAR(K130T) und SakSTAR(V132A) von SakSTAR(V 132R) hinsichtlich der spezifischen Aktivität übertroffen.

BEISPIEL 7

Konstruktion, Epitopkartierung mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Absorption mit vereinigttem Plasma aus immunisierten Patienten von Kombinations-Varianten von SakSTAR(K130T, K135R) und SakSTAR(E80A, D82A, K130T, K135R) mit K35A, G36R, E65X, K74X und ausgewählten anderen Aminosäuren

[0062] Im vorliegenden und in den folgenden Beispielen wurde ein zusätzlicher Plasmapool aus 40 Patienten erzeugt, der mehrere Wochen nach der Behandlung mit SakSTAR (Pool 40) erhalten wurde. Der ursprüngliche Pool aus 10 Patienten wird weiterhin als Pool 10 identifiziert. Die Absorption Staphylokinase-spezifischer Antikörper wurde wie vorstehend und an anderer Stelle beschrieben (22) quantifiziert.

[0063] Die SakSTAR(K130T, K135R)-Variante wurde wegen ihrer hohen spezifischen Aktivität mit einer mäßigen Reduktion der Bindung an Antikörper von Epitop-Cluster III und Absorption von Antikörpern aus dem Plasma immunisierter Patienten als Matrice zur additiven Mutagenese verwendet (Tabelle 6). Der Zusatz von G36R, K74R oder K74Q oder beidem zu der Matrice verringerte die spezifische Aktivität nicht merklich, reduzierte die Reaktivität mit monoklonalen Antikörpern gegen Epitop-Cluster III (G36R-Substitution) und senkte die Absorption von Antikörpern aus Plasma immunisierter Patienten (K74R- oder K74Q-Substitution). Die Kombination von E65A oder E65Q mit K74Q in der SakSTAR(K130T, K135R)-Matrice reduzierte die Absorption der Antikörper aus Pool 10 und Pool 40 auf etwa 50 bzw. 60 Prozent, ohne dass die spezifische Aktivität merklich verringert wurde. Die Additionssubstitution ausgewählter Aminosäuren in der SakSTAR(E65Q, K74Q, K130T, K135R)-Matrice verringerte die Antikörperabsorption aus Pool 10 oder Pool 40 nicht weiter. Überraschend bewirkte der Austausch von K136 gegen A und die Addition von K in Stellung 137 einen deutlichen Anstieg der spezifischen Aktivität, wie es in dem chromogenen Substrat-Test gemessen wurde.

[0064] Die Kombination der SakSTAR(E80A, D82A)- und SakSTAR(K130T, K135R)-Matrizen beeinflusste die spezifische Aktivität nicht und hatte eine verringerte Reaktivität mit Epitop-Cluster III-Antikörpern (Tabelle 7). Daher wurde die SakSTAR(E80A, D82A, K130T, K135R)-Matrice zur weiteren Mutagenese ausgewählt. Die Addition von K74R und noch mehr K74Q senkte die Reaktivität mit dem Plasma immunisierter Patienten drastisch. Schließlich ergab die Addition von E65D oder K35A oder E65S zu SakSTAR(K74R, E80A, D82A, K130T, K135R)- oder SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R)-Matrizen Varianten mit intakter spezifischer Aktivität, die nur ≤ 45 der Antikörper des vereinigten Plasmas immunisierter Patienten banden und weniger als 15% des Subpools, der zu als 50% mit dem K74, E75, R77-Epitop reagierte.

BEISPIEL 8

Charakterisierung ausgewählter Varianten von Staphylokinase mit intakter spezifischer Aktivität und weniger als 50% Adsorption von vereinigten SakSTAR-spezifischen Human-Antikörpern, die in Patienten durch Behandlung mit Wildtyp-SakSTAR ausgelöst wurden

1. Einleitung

[0065] Dreiundzwanzig von den in den vorstehenden Beispielen konstruierten und charakterisierten Varianten vereinigten die Eigenschaften einer spezifischen Rest-Aktivität von ≥ 100 kHU/mg und ≤ 50 Prozent Adsorption mit dem Pool der Antiseren, die aus 10 mit Wildtyp-SakSTAR behandelten Patienten erhalten wurden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 zusammengefasst. Die mit Subpool B und Subpool C und mit dem Pool von 40 mit Wildtyp-SakSTAR behandelten Patienten erhaltenen Ergebnisse sind enthalten. SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(K35A, E65D, K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) und SakSTAR(E65Q, K74Q, N95A, E118A, K130A, K135R, K136A, ▽

137K) wurden zur weiteren Charakterisierung ausgewählt.

2. Fibrinolytische In-vitro-Eigenschaften von SakSTAR-Varianten in Humanplasma

[0066] Die fibrinolytischen und fibrinogenolytischen Eigenschaften der SakSTAR-Varianten wurden wie zuvor beschrieben bestimmt. Es wurde eine dosis- und zeitabhängige Lyse von in Humanplasma getränkten mit ^{125}I -Fibrin markierten Plasmagerinnseln mit den ausgewählten Varianten erhalten (Tabelle 9). Die spontane Gerinnsel-Lyse während des Versuchszeitraums betrug $\leq 5\%$ (nicht gezeigt). Gleich wirksame Konzentrationen der Testverbindung (die 50% Gerinnsel-Lyse in 2 Std. verursachten; C_{50}), welche graphisch aus Auftragungen der Gerinnsel-Lyse nach 2 Std. gegen die Konzentration des Plasminogenaktivators (nicht gezeigt) bestimmt wurden, reichten von $0,11 \pm 0,01$ bis $0,24 \pm 0,04$ g/ml, wobei die Rest-Fibrinogen-Spiegel im Bereich zwischen 92 ± 30 und 97 ± 30 Prozent der Grundlinie lagen (Tabelle 9). Die Konzentrationen der Verbindung, die 50% Fibrinogen-Abbau in 2 Std. in Humanplasma in Abwesenheit von Fibrin verursachten, wurden graphisch aus Dosis-Reaktions-Kurven (nicht gezeigt) bestimmt. Diese Werte (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten) reichten von $14 \pm 3,2$ bis $29 \pm 3,1$ $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle 9). Überraschenderweise ging die sehr hohe spezifische Aktivität von SakSTAR(E65Q, K74Q, N95A, E118A, K130A, K135R, K136A, ∇ 137K) in dem chromogenen Test nicht mit einer erhöhten thrombolytischen Wirksamkeit in einem Plasmamimie einher.

3. Temperaturstabilität selektierter SakSTAR-Varianten

[0067] Die Temperaturstabilität von Präparaten von SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R), SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) und SakSTAR(K35A, E65D, K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R), gelöst auf eine Konzentration von 1,0 mg/ml in 0,15 mol/l NaCl, 0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5, bei verschiedenen Temperaturen ist in **Fig. 4** veranschaulicht. Bei Temperaturen bis zu 37°C blieben sämtliche Verbindungen für mindestens drei Tage vollständig aktiv. Bei 56°C und 70°C waren die drei Varianten jedoch weniger stabil als Wildtyp-SakSTAR.

4. Pharmakokinetische Eigenschaften von SakSTAR-Varianten nach Bolus-Injektion in Hamstern

[0068] Die pharmakokinetischen Parameter der Disposition von SakSTAR-Varianten aus Blut wurden in Gruppen von 4 Hamstern nach einer intravenösen Bolus-Injektion von 100 $\mu\text{g/kg}$ SakSTAR-Variante bewertet. SakSTAR-verwandtes Antigen wurde unter Verwendung des an anderer Stelle beschriebenen ELISA untersucht. Der ELISA wurde gegen jede der zu quantifizierenden SakSTAR-Varianten kalibriert. Pharmakokinetische Parameter umfassten: Anfängliche Halbwertszeit (in min.), $t_{1/2\alpha} = \ln 2/\alpha$; Halbwertszeit am Ende (in min), $t_{1/2\beta} = \ln 2/\beta$; Volumen des zentralen (Plasma)-Kompartimentes (in ml), $V_c = \text{Dosis}/(A+B)$; Fläche unter der Kurve in ($\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1}$), $\text{AUC} = A/\alpha + B/\beta$; und Plasma-Clearance (in $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$), $\text{Clp} = \text{Dosis}/\text{AUC}$ (33).

[0069] Die Dispositionsrate von Staphylokinase-bezogenem Antigen aus Blut nach Bolus-Injektion von 100 $\mu\text{g/kg}$ der ausgewählten SakSTAR-Varianten in Gruppen von 4 Hamstern ließ sich angemessen durch eine Summe von zwei Exponentialausdrücken durch graphisches "Curve Peeling" beschreiben (Ergebnisse nicht gezeigt), woraus die in der Tabelle 10 zusammengefassten pharmakokinetischen Parameter hergeleitet wurden. Die pharmakokinetischen Parameter der Mutanten unterschieden sich nicht merklich von denen des Wildtyp-SakSTAR. Die anfänglichen Plasma-Halbwertszeiten ($t_{1/2}(\alpha)$) lagen im Bereich zwischen 2,0 und 3,2 min und die Plasma-Clearance-Werte (Clp) zwischen 1,6 und 4,1 ml/min .

BEISPIEL 9

Vergleichende thrombolytische Wirksamkeit und Immunogenität von SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) und SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) gegen SakSTAR in Patienten mit peripherem Arterienverschluss

1. Reinigung zur In-vivo-Verwendung

[0070] Achzehn-Liter-Kulturen (in 2-Liter-Ansätzen) der Varianten SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) und SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) wurden 20 Std. in Terrific-Broth-Medium (28) gezüchtet, das mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin angereichert war, und während der letzten 3 Std. mit IPTG induziert. Die Zellen wurden pelletiert, in 1/10 Volumen 0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH-Wert 6,0, resuspendiert, durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen und durch Zentrifugation geklärt. Die Verbindungen wurden durch Chromatographie auf einer 10×7 cm SP-Sepharose-Säule gereinigt, die mit 0,01 mol/l Phosphatpuffer,

pH-Wert 6,0, äquilibriert und mit einem 1 mol/l NaCl-Gradient (3 Säulenvolumina) eluiert worden war. Die Fraktionen mit der SakSTAR-Variante wurden vereinigt, festes NaCl wurde zu einer Konzentration von 2,5 mol/l dazu gegeben, und das Material wurde auf einer 10 × 20 cm Phenylsepharose-Säule chromatographisch aufgetrennt, gefolgt von schrittweise erfolgreicher Elution mit 0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH-Wert 6,0. Die Materialien wurden auf einer 10 × 45 cm Sephadex G25-Säule entsalzt, durch Auftragen auf eine 5 × 10 cm SP-Sephadex-Säule unter schrittweise erfolgreicher Elution mit 1,0 mol/l NaCl eingeeengt und anschließend auf einer 6 × 60 cm Superdex 75-Säule gelfiltriert, die mit 0,15 m NaCl, 0,01 Mol/l Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5, äquilibriert worden war, damit ihr Endotoxin-Gehalt weiter reduziert wurde. Die SakSTAR-Variante enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, die Proteinkonzentration wurde auf 1 mg/ml eingestellt, und das Material durch Filtration durch einen 0,22 µm Millipore-Filter sterilisiert. Die zur Bestimmung der spezifischen Aktivität, Endotoxin-Kontamination, Bakteriensterilität und Toxizität in Mäusen verwendete Methodik ist oben und an anderer Stelle beschrieben (22). Die Reinheit des Präparates wurde durch SDS-Gelelektrophorese auf 10% Gelen untersucht, auf die 40 g der Verbindung aufgetragen worden war.

[0071] Aus den Kulturvolumina von 18 Litern SakSTAR-Variante wurden 840 mg SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) mit einer spezifischen Aktivität von 140 kHU/mg und 800 mg SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) mit einer spezifischen Aktivität von 150 gereinigt. Der Endotoxin-Gehalt betrug < 0,1 und 0,26 IU/mg. Die Gelfiltration auf HPLC ergab einen einzelnen symmetrischen Haupt-Peak in dem Chromatographiebereich der Säule, der > 98% des eluierten Materials darstellt (Gesamtfläche unter der Kurve) (nicht gezeigt).

[0072] Die SDS-Gelelektrophorese von 40 g-Proben ergaben einzelne Hauptkomponenten (nicht gezeigt). Die mittels Filtration sterilisierten Präparate erwiesen sich am 3. Untersuchungstag wie an anderer Stelle beschrieben (22) als steril. Die intravenöse Bolus-Injektion der SakSTAR-Varianten in Gruppen von 5 Mäusen (3 mg/kg Körpergewicht) provozierte keine akute Reaktion und reduzierte auch nicht die Gewichtszunahme innerhalb von 8 Tagen, verglichen mit Mäusen, denen eine gleiche Menge Salzlösung gegeben wurde (nicht gezeigt).

2. Thrombolytische Wirksamkeit

[0073] Wildtyp-SakSTAR oder die Varianten SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) oder SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) wurden intraarteriell bei dem proximalen Ende oder in das proximale Ende des verschließenden Thrombus als Bolus von 2 mg und anschließend durch eine Infusion von 1 mg/Std. (bei einigen Patienten über Nacht auf 0,5 mg/Std. reduziert) in Gruppen von 15, 6 bzw. 6 Patienten mit einem angiographisch dokumentierten Verschluss einer peripheren Arterie oder eines Bypass-Transplantates von weniger als 30 Tagen Dauer verabreicht. Die Patienten wurden untersucht, nachdem sie ihre Einwilligung gegeben hatten und das Protokoll von dem Human Studies Committee of the University of Leuven genehmigt worden war. Die Einschluss- und Ausschlusskriterien, die verbindende Antithrombose-Behandlung (einschließlich kontinuierlichem intravenösem Heparin) und das Untersuchungsprotokoll waren im Wesentlichen wie vorstehend beschrieben (22).

[0074] Die relevanten Grundlinieneigenschaften der einzelnen Patienten und die Ergebnisse der Behandlung und die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 gezeigt. Die intraarterielle Infusion bei einer Dosis von 3,5 bis 27 mg und einer Dauer von 2 bis 44 Std. induzierte eine vollständige Rekanalisierung bei 22 Patienten und eine partielle Rekanalisierung bei 5 Patienten. Komplementäre endovaskuläre Verfahren (hauptsächlich PTA) wurden bei 13 Patienten und die komplementäre rekonstruktive vaskuläre Operation nach Thrombolyse bei 5 Patienten durchgeführt. Ein Patient unterlag einer großen Amputation. Blutungskomplikationen traten gewöhnlich nicht auf oder waren auf eine schwache bis mäßige Hämatombildung an den Angiographie-Einstichstellen beschränkt (Daten nicht gezeigt). Ein Patient, der Wildtyp-SakSTAR erhielt, litt an nicht-tödlicher intrakranialer Blutung, ein Patient (BUE) an einem retroperitonealem Hämatom, und zwei Patienten (MAN und STRO) an gastrointestinaler Blutung.

[0075] Zirkulierendes Fibrinogen, Plasminogen und α_2 -Antiplasmin-Spiegel blieben während der Infusion von SakSTAR-Einheiten unverändert (Daten nicht gezeigt), was die absolute Fibrin-Spezifität dieser Mittel bei den verwendeten Dosierungen widerspiegelt (Daten nicht gezeigt). Signifikante In-vivo-Fibrin-Spaltung erfolgte, wie anhand der Erhöhung der Spiegel an Fibrin-Fragment D-Dimer bewiesen wurde. Die intraarterielle Heparin-Therapie verlängerte die aPTT-Spiegel in variablem Maße (Daten nicht gezeigt).

3. Antikörper-Induktion

[0076] Staphylokinase-neutralisierende Aktivität in plasma- und antigenspezifischen IgG-Antikörper wurden im Wesentlichen wie oben und an anderer Stelle beschrieben quantifiziert (22). Die Antikörper-bezogene SakSTAR-, SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R)- und SakSTAR (E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R)-neutralisierende Aktivität und Anti-SakSTAR-, Anti-SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R)- und Anti-SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R)-IgG waren an der Grundlinie und während der ersten Woche nach der Infusion niedrig (**Fig. 5**). Von der zweiten Woche an stiegen die Neutralisierungs-Aktivitäts-Spiegel an und erreichten nach 3 bis 4 Wochen Mittelwerte von 9 µg SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) und 0,5 µg SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), neutralisiert pro ml Plasma in den mit den entsprechenden Einheiten behandelten Patienten, verglichen mit einem Mittelwert von 24 µg Wildtyp-SakSTAR, neutralisiert pro ml in den 15 mit SakSTAR behandelten Patienten. Die Spiegel von Anti-SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) und von Anti-SakSTAR (E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R)-IgG stiegen nach 3 bis 4 Wochen auf Mittelwerte von 420 bzw. 30 µg/ml Plasma in Patienten, die mit den entsprechenden Einheiten behandelt worden waren, verglichen mit einem Mittelwert von 590 µg Anti-SakSTAR pro ml Plasma in den mit SakSTAR behandelten Patienten (**Fig. 5**). Die Prävalenz der Immunisierung, definiert als Neutralisierungs-Aktivitäten im Plasma nach 2 bis 4 Wochen oberhalb von 5 g/ml, war 3 von 6 Patienten (50 Prozent) mit SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R), 1 von 6 Patienten (17 Prozent) mit SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), verglichen mit 56 von 70 Patienten (80 Prozent) mit SakSTAR. Dieser Unterschied ist statistisch hoch-signifikant ($p = 0,01$ mittels 2×3 Chi-Quadrat-Analyse).

[0077] Die durch Behandlung mit SakSTAR induzierten Antikörper wurden vollständig von SakSTAR absorbiert, aber unvollständig von SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) und von SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) (Tabelle 12). Antikörper, die durch Behandlung mit SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) induziert wurden, und die bei 4 von 6 Patienten nachweisbar waren, wurden vollständig (≥ 90 Prozent) von SakSTAR, SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) und von SakSTAR (E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) absorbiert, was zeigt, dass die Immunisierung nicht aufgrund von Neoepitopen erfolgte, die durch Substitution der Wildtyp-Aminosäuren erzeugt wurden. Antikörper, die durch Behandlung mit SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) induziert wurden, und die in einem Patient (URB) nachgewiesen wurden, wurden vollständig mit SakSTAR(K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R) und mit SakSTAR(E65D, K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R), aber unvollständig (85%) mit Wildtyp-SakSTAR absorbiert, was nahelegt, dass eine kleine Fraktion der induzierten Antikörper gegen ein Neoepitop in der zur Infusion verwendeten Variante gerichtet sein kann.

BEISPIEL 10

Konstruktion und Absorption mit vereinigttem Plasma immunisierter Patienten der Kombinationsvarianten von SakSTAR(E65Q, K74Q, K130T, K135R) und anderen ausgewählten Aminosäuren

1. Einleitung

[0078] Bei einer letzten Runde der additiven Substitutionsmutagenese wurde die SakSTAR(E65Q, K74Q, K130T, K135R)-Variante als Matrize verwendet, da sie eine hohe spezifische Aktivität mit einer signifikanten Reduktion der Absorption (auf 65 Prozent) der Antikörper aus vereinigttem Plasma immunisierter Patienten (Pool 40) aufwies. Die Zwischenvarianten, die für die Zusammensetzung der schließlich selektierten Varianten relevant waren, sind in der Tabelle 13 zusammengefasst. Die Addition von K35A, D82A und S84A, von T90A, E99D und T101S oder von E108A und K109A reduzierte die Antikörperabsorption auf etwa 50 Prozent, wohingegen die kombinierte Addition von D82A, S84A und E108A, K109A diese auf 41 Prozent senkte. Substitution von K136A, kombiniert mit der Addition eines Lys-Restes an das COOH-Ende (-137K), erhöhte die spezifische Aktivität in einem gereinigten System, aber nicht im Plasmamillieu und auch nicht in einem Hamster-Lungenembolie-Modell (nicht gezeigt), und reduzierte weiterhin die Absorption der Antikörper aus vereinigttem Patientenplasma auf 30 Prozent. Schließlich ergab die Addition von K35A und T90A, E99D, T101S-Substitutionen zu dieser Matrize eine Mutante mit intakter thrombolytischer Wirksamkeit, die nur 24 Prozent der Antikörper von vereinigttem immunisiertem Patientenplasma band.

[0079] Auf der Grundlage dieser Analyse wurden SakSTAR(E65Q, K74Q, D82A, S84A, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY118), und SakSTAR(K35A, E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY141), zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Zudem wurde SakSTAR(K35A, E65Q, K74R, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY145), mit einem Lys-Rest in Position 74 konstruiert und untersucht.

2. Pharmakokinetische Eigenschaften von SakSTAR-Varianten nach Bolusinjektion in Hamstern

[0080] Die Dispositionsrate von Staphylokinase-bezogenem Antigen aus Blut nach Bolus-Injektion von 100 µg/kg der ausgewählten SakSTAR-Varianten in Gruppen von 4 Hamstern konnte durch die Summe von zwei exponentiellen Ausdrücken durch graphisches "Curve Peeling" (Ergebnisse nicht gezeigt) angemessen beschrieben werden. Die pharmakokinetischen Parameter der Mutanten wurden von diesen Plasma-Schwundkurven hergeleitet, die sich nicht besonders von denen des Wildtyp-SakSTAR unterschieden (die Ergebnisse ähneln sehr stark denen aus Tabelle 10, Daten nicht gezeigt).

BEISPIEL 11

Charakterisierung ausgewählter Varianten, die von SakSTAR(E65Q, K74Q, K130T, K135R) hergeleitet wurden

1. Fibrinolytische In-vitro-Eigenschaften ausgewählter SakSTAR-Varianten gegenüber Humanplasma

[0081] Eine dosis- und zeitabhängige Lyse von in Humanplasma getränkten ¹²⁵I-Fibrin-markierten Humanplasmagerinnseln wurde mit den drei ausgewählten Varianten erhalten (Tabelle 14). Die spontane Gerinnsel-Lyse während des Versuchszeitraums betrug ≤ 5% (nicht gezeigt). Gleich wirksame Konzentrationen der Testverbindung (die 50% Gerinnsel-Lyse in 2 Std. verursachte; C₅₀), graphisch bestimmt aus Schaubildern der Gerinnsel-Lyse bei 2 Std. gegen die Konzentration des Plasminogenaktivators (nicht gezeigt), reichten von 0,15 ± 0,02 bis 0,19 ± 0,01 µg/ml, wobei kein signifikanter Fibrinogen-Abbau auftrat. Die Konzentrationen der Verbindung, die 50% Fibrinogen-Abbau in 2 Std. in Humanplasma in Abwesenheit von Fibrin verursachten, wurden aus Dosis-Reaktions-Kurven (nicht gezeigt) graphisch bestimmt. Diese Werte (Mittelwert ± Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten) reichten von 7,0 ± 0,6 bis 24 ± 3,6 µg/ml (Tabelle 14).

2. Temperaturstabilität ausgewählter SakSTAR-Varianten

[0082] Die Temperatur-Stabilität von Präparaten von SakSTAR(E65Q, K74Q, D82A, S84A, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇137K), SakSTAR(K35A, E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇137K) und SakSTAR(K35A, E65Q, K74R, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇137K) lösten sich auf eine Konzentration von 1,0 mg/ml in 0,15 M NaCl, 0,01 M Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5, bei verschiedenen Temperaturen. Bei Temperaturen bis zu 37°C blieben sämtliche Verbindungen für mindestens drei Tage vollständig aktiv. Bei 56°C und 70°C waren die Varianten gewöhnlich weniger stabil als Wildtyp-SakSTAR (die Ergebnisse ähneln sehr stark denen von **Fig. 4**, Daten nicht gezeigt).

BEISPIEL 12

[0083] Vergleichende thrombolytische Wirksamkeit und Immunogenität von SakSTAR(E65Q, K74Q, D82A, S84A, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇137K), (SY118), SakSTAR(K35A, E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇137K), (SY141), und SakSTAR(K35A, E65Q, K74R, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇137K), (SY145), in Patienten mit peripherem Arterienverschluss

1. Reinigung und Konditionierung von SakSTAR-Varianten im Großmaßstab zur In-vivo-Verwendung.

[0084] Das Material wurde bis zur Homogenität aus 18 Liter Kulturvolumina gereinigt. Der Endotoxin-Gehalt war unter 2 IU/mg. Die Gelfiltration auf HPLC ergab einen einzigen Haupt-Symmetrie-Peak im Chromatographiebereich der Säule, was > 98% des eluierten Materials darstellt (Gesamtfläche unter der Kurve) (nicht gezeigt). Die SDS-Gelelektrophorese von 30 µg Proben ergab einzelne Haupt-Komponenten. Die durch Filtration sterilisierten Präparate erwiesen sich am Tag 3 der Untersuchung als steril. Die intravenöse Bolus-Injektion von SakSTAR-Varianten in Gruppen von 5 Mäusen (3 mg/kg Körpergewicht) provozierte keine akute Reaktion und verringerte nicht die Gewichtszunahme innerhalb von 8 Tagen, im Vergleich zu Mäusen, denen die gleiche Menge Salzlösung gegeben wurde (nicht gezeigt).

[0085] Gruppen von 6 Patienten mit angiographisch dokumentiertem Arterienverschluss (PAO) wurden untersucht. Die relevanten Grundlinien-Eigenschaften der einzelnen Patienten sind in der Tabelle 15 gezeigt. Die Tabelle 16 fasst die einzelne Behandlung und die Ergebnisse zusammen. Die intraarterielle Infusion bei einer Dosis von 6 bis 24 mg und einer Dauer von 4 bis 29 Std. induzierte eine vollständige Rekanalisierung in den meisten Patienten. Die Spiegel von zirkulierendem Fibrinogen, Plasminogen und α₂-Antiplasmin blieben wäh-

rend der Infusion der SakSTAR-Varianten im Wesentlichen unverändert (Daten nicht gezeigt), was die absolute Fibrinspezifität dieser Mittel bei den verwendeten Dosierungen widerspiegelt. Die Antikörper-bezogene SakSTAR(E65Q, K74Q, D82A, S84A, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K)-, SakSTAR(K35A, E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K)- und SakSTAR(K35A, E65Q, K74R, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K)-neutralisierende Aktivität war an der Grundlinie und während der ersten Woche nach der Infusion niedrig (Tabelle 17). Von der zweiten Woche an stiegen die Neutralisierungsaktivitäts-Spiegel nach 3 bis 4 Wochen und erreichten Mittelwerte von 19 μ g SakSTAR (E65Q, K74Q, D82A, S84A, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY118), 0,7 μ g SakSTAR (K35A, E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY141), und 4,3 μ g SakSTAR(K35A, E65Q, K74R, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY145), neutralisiert pro ml Plasma in den Patienten, die mit den jeweiligen Verbindungen behandelt worden waren, was für SY141 und SY145, aber nicht für SY118 niedriger ist als der Mittelwert von 12 μ g Wildtyp-SakSTAR, neutralisiert pro ml bei den 69 mit Wildtyp-SakSTAR behandelten Patienten.

[0086] Eine offenkundige Immunisierung (Neutralisierungsaktivität nach 3 bis 4 Wochen von 5 g Verbindung pro ml Plasma) wurde in 56 von 70 Patienten beobachtet, die mit SakSTAR behandelt worden waren, in 5 von 6 Patienten, die SakSTAR(E65Q, K74Q, D82A, S84A, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY118), ausgesetzt waren, nur in 2 der 6 Patienten, denen SakSTAR(K35A, E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY141), gegeben worden war, und in 1 der 3 Patienten, denen SakSTAR(K35A, E65Q, K74R, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY145) gegeben worden war.

[0087] Die Ergebnisse hinsichtlich der Immunogenität der in den Patienten untersuchten Hauptvarianten sind in der Tabelle 18 zusammengefasst. Eindeutig hatten die Varianten SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) und SakSTAR(K35A, E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K) eine signifikant reduzierte Immunogenität verglichen mit dem Wildtyp-Protein.

BEISPIEL 13

Konstruktion, Reinigung und Charakterisierung von Cystein-Substitutionsmutanten von Staphylokinase

1. Einleitung

[0088] Die stellengerichtete Mutagenese wurde angewendet, um die freiliegenden Aminosäuren gegen einzelne Cysteinreste auszutauschen, so dass man Folgendes konstruierte: i) homodimere Formen der Staphylokinase bei der Bildung einer zwischenmolekularen Disulfid-Brücke, und ii) Polyethylenglycol-konjugierte Moleküle (PEG-Derivate). Dieses Beispiel hatte zwei Ziele: Erstens lässt sich die Clearance durch Steigerung der Größe des injizierten Moleküls (über Dimerisation oder Konjugation mit einem großen Molekül, wie PEG) senken, und zweitens hat sich herausgestellt, dass PEG-Derivate ebenfalls eine reduzierte Immunreaktivität in Tiermodellen induzieren (für eine Übersicht siehe Literaturstelle 34). In beiden Fällen konnte eine verlängerte In-vivo-Halbwertszeit die Reduktion der pharmakologischen Dosis der Staphylokinase in Patienten unterstützen. Diese Reduktion konnte mit einer reduzierten immunogenen Reaktion gegen das thrombolytische Mittel einhergehen, wodurch deren pharmakologische Aktivität als Thrombolytikum gesteigert wurde.

[0089] In diesem Beispiel wird die Konstruktion und die Charakterisierung der beiden SakSTAR-Varianten beschrieben, bei denen eine einzelne Aminosäure gegen Cystein ausgetauscht wurde. Die in diesem Beispiel beschriebenen Mutanten sind in der Tabelle 19 aufgeführt. Diese Varianten wurden in *E. coli* exprimiert, gereinigt und hinsichtlich der spezifischen Aktivität, fibrinolytischen Eigenschaften in Humanplasma in vitro und pharmakokinetischen Eigenschaften nach der Bolus-Injektion in Hamstern charakterisiert.

2. Reagenzien und Verfahren

[0090] Die Quelle für sämtliche in der erfindungsgemäßen Untersuchung verwendeten Reagenzien wurde zuvor beschrieben (22) oder ist nachstehend angegeben. Der Matrizenvektor für die Mutagenese, pMEX602sakB (d.h. pMEX.SakSTAR) wurde an anderer Stelle beschrieben (23). Die Restriktions- und Modifikations-Enzyme wurden von New England Biolabs (Leusden, Niederlande), Boehringer Mannheim, (Mannheim, Deutschland) oder Pharmacia (Uppsala, Schweden) erhalten. Die Enzymreaktionen wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die mutagenen Oligonukleotide und Primer wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) erhalten. Plasmid-DNA wurde mit einem Reinigungs-Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) wie empfohlen

isoliert. Transformations-kompetente E. coli-Zellen wurden mit dem bekannten Calciumphosphat-Verfahren hergestellt. Die Nukleotid-Sequenzbestimmung erfolgte an doppelsträngiger Plasmid-DNA mit dem Dideoxy-Kettenabbruch-Verfahren mittels T7-Sequenzierungs-Kit (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden mittels Taq-Polymerase von Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die rekombinanten DNA-Verfahren, die zur Konstruktion der in diesem Beispiel beschriebenen Varianten erforderlich sind, sind gut etabliert (22, 27).

3. Konstruktion von Expressionsplasmiden

[0091] Die Varianten SakSTAR(K102C) und SakSTAR(K109C) wurden durch die Polymerasekettenreaktion mit gespleißter Überlappungs-Extension (SOE-PCR) (24) mit pMEX.SakSTAR, das SakSTAR codiert, als Matrize durchgeführt. Zwei Fragmente wurden durch PCR (30 Zyklen: 1 sec bei 94°C, 1 sec bei 50°C, 10 sec bei 72°C) amplifiziert, wobei das erste Fragment von dem 5'-Ende (Primer 818A) des Staphylokinase-Gens bis zu dem zu mutagenisierenden Bereich (Vorwärts-Primer) und das zweite Fragment von eben diesem Bereich (Rückwärts-Primer) zum 3'-Ende des Gens mit dem Primer 818D (5'CAAACAGCCAAGCTTCATTTCAGC) ausging. Vorwärts- und Rückwärts-Primer hatten eine gemeinsam Überlappung von etwa 24 bp (für die Konstruktion von K102C: TAT GAT AAG AAT TGC AAA AAA GAA GAA (rückwärts) and TTC TTC TTT TTT GCA ATT CTT ATC ATA (vorwärts), für die Konstruktion von K109C: AAA AAG AAG AAA CGT GCT CTT TCC CTA (rückwärts) and TAG GGA AAG AGC ACG TTT CTT CTT TTT (vorwärts)). Die beiden gereinigten Fragmente wurden dann in einer zweiten PCR-Reaktion mit den äußeren Primern 818A und 818D zusammengebaut (30 Zyklen: 1 sec bei 94°C, 1 sec bei 50°C, 10 sec bei 72°C). Das amplifizierte Produkt aus dieser letzten Reaktion wurde gereinigt, mit EcoRI und HindIII gespalten und in die entsprechende Stelle von pMEX.SakSTAR ligiert. Für jede Konstruktion wurde die Sequenz der Variante durch Sequenzierung des gesamten codierenden Bereichs bestätigt.

4. Expression und Reinigung von SakSTAR-Varianten

[0092] Die SakSTAR-Varianten wurden wie nachstehend beschrieben exprimiert und gereinigt, und zwar aus transformierten E. coli, welche in Terrific-Broth(TB)-Medium (28) gezüchtet wurden. Ein 2- bis 4 ml-Aliquot einer über Nacht gesättigten Kultur in LB-Medium wurde zum Animpfen einer 1- bis 2-Liter-Kultur in Terrific Broth verwendet, die mit 100 µg/ml Ampicillin angereichert war. Die Kultur wurde unter starker Belüftung und bei 30°C inkubiert. Nach etwa 16 Std. Inkubation wurde IPTG (200 µmol/l) zu der Kultur gegeben, um die Expression von dem tac-Promotor zu induzieren. Nach 3 Std. Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 U/min für 20 min. pelletiert, in 1/10 Volumen 0,01 mol/l Phosphatpuffer bei pH-Wert 6-6,5 resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung bei 0°C aufgebrochen. Die Suspension wurde für 20 min bei 20000 U/min zentrifugiert, und der Überstand wurde bei 4°C oder bei -20°C bis zur Reinigung aufbewahrt. Das Material wurde im Wesentlichen wie vorstehend beschrieben (Beispiel 2) gereinigt: geklärte Zellysate mit den SakSTAR-Varianten wurden auf einer 1,6 × 5 cm SP-Sephadex-Säule und anschließend auf einer 1,6 × 8 cm Phenylsepharose-Säule chromatographisch aufgetrennt. Die SakSTAR-enthaltenden Fraktionen, die durch SDS-Gelelektrophorese lokalisiert wurden, wurden zur weiteren Analyse vereinigt.

5. Biochemische Analyse

[0093] Die Proteinkonzentrationen wurden gemäß Bradford (29) bestimmt. Die SDS-PAGE wurde mit dem Phast System (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit 10-15%igen Gradienten-Gelen und Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung durchgeführt, und die spezifischen Aktivitäten von SakSTAR-Lösungen wurden mit einem in Mikrotiterplatten durchgeführten chromogenen Substrat-Test (wie in Beispiel 2 beschrieben) bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten der verschiedenen SakSTAR-Varianten sind in der Tabelle 19 zusammengefasst.

[0094] Die Mutante SakSTAR(K102C) war im wesentlichen monomer, wie es durch SDS-PAGE und Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht wurde. Seine spezifische Aktivität war mit der von Wildtyp-Staphylokinase vergleichbar. SakSTAR(K109C) zeigte dagegen eine Neigung zur Bildung von Dimeren (> 60%). Dies führte zu einer erheblich erhöhten spezifischen Aktivität in dem plasminogen-gekoppelten chromogenen Substrat-Test (siehe Tabelle 19). Bei der Reduktion mit Dithiothreitol (DTT) (20facher molarer Überschuss während 1,5 Std. bei 37°C) und Alkylierung mit Iodacetamid (100facher molarer Überschuss während 1 Std. bei 37°C) wird das K109C-Dimer in ein stabiles Monomer umgewandelt, und seine resultierende Spezifität liegt innerhalb des erwarteten Bereichs gegenüber Wildtyp-Staphylokinase (Tabelle 19). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Bildung von Homodimeren die einzigartige Determinante für diesen starken Anstieg der spezifischen Aktivität ist. Dimere SakSTAR(K109C) wurde von monomerem SakSTAR(K109C) auf Source S (Pharmacia) (5 × 50 mm) chromatographisch getrennt. Der Ladepuffer war 10 mM Phosphat, pH-Wert 6,0 und dimeres SakSTAR

(K109C) wurde durch einen Salz-Gradienten (bis zu 1 M) im gleichen Puffer eluiert. Die das dimere SakSTAR(K109C) (> 95% rein) enthaltenden Fraktionen, die durch SDS-Gelelektrophorese lokalisiert wurden, wurden zur weiteren Analyse vereinigt.

6. Chemische Vernetzung von Cystein-Mutanten von SakSTAR mit Polyethylenglycol

[0095] Die Thiolgruppe der Cystein-Mutante SakSTAR(K102C) wurde zur Anbindung an ein aktiviertes Polyethylenglycol, OPSS-PEG (Shearwater Polymers Europe, Enschede, Niederlande) als Ziel verwendet. OPSS-PEG ist ein 5 kDa PEG-Molekül, das eine einzelne aktivierte Thiolgruppe an einem Ende trägt, das bei leicht alkalischem pH-Wert spezifisch mit freien Thiolen reagiert. Die Modifikation von SakSTAR(K102C) wurde durch Inkubation des Moleküls (100 µM) mit einem dreifachen Überschuss von SS-PEG in einer 5 mM Phosphatlösung, pH-Wert 7,9, bei Raumtemperatur erzielt. Das Ausmaß der Reaktion wurde durch Beobachten der Freisetzung von 2-Thiopyridon aus OPSS-PEG bei 412 nm überwacht. Nach der Umsetzung (etwa 15 min) wurde überschüssiges OPSS-PEG durch Reinigen des derivatisierten SakSTAR(K102C-PEG) auf einer 1,6 × 5 cm SP-Sephadex-Säule, wie vorstehend beschrieben (siehe Beispiel 2), entfernt. Die SakSTAR(K102C-PEG) enthaltenden Fraktionen, die durch optische Dichte bei 280 nm lokalisiert wurden, wurden zur weiteren Analyse vereinigt. Die SDS-PAGE-Analyse und Coomassie-Blue-Färbung bestätigten, dass die PEG-Vernetzung an SakSTAR(K102C) quantitativ erfolgte. Der Tabelle 19 zufolge war die spezifische Aktivität des PEG-Derivates nur marginal beeinflusst, verglichen mit der der Wildtyp-Staphylokinase.

7. Fibrinolytische In-vitro-Eigenschaften der SakSTAR-Varianten in Humanplasma

[0096] Die fibrinolytischen und fibrinogenolytischen Eigenschaften von SakSTAR-Varianten wurden wie zuvor beschrieben bestimmt. Die dosis- und zeitabhängige Lyse von in Humanplasma getränkten, mit ¹²⁵I-Fibrin markierten Humanplasma-Gerinnseln wurde mit vier Molekülen erhalten: SakSTAR(K109C) als Dimer und als Monomer (nach der Reduktion und Alkylierung mit Iodacetamid), dem monomeren SakSTAR(K102C) und dem PEG-derivatisierten SakSTAR(K102C). Die spontane Gerinnsel-Lyse während des Versuchszeitraums betrug ≤ 5% (nicht gezeigt). Gleich-wirksame Konzentrationen der Test-Verbindung (welche 50% Gerinnsel-Lyse in 2 Std. verursachen; C₅₀), die graphisch aus den Auftragungen der Gerinnsel-Lyse bei 2 Std. gegen die Konzentration des Plasminogenaktivators bestimmt wurden (nicht gezeigt), waren für monomeres SakSTAR(K109C) und SakSTAR(K102C) mit der von SakSTAR vergleichbar (Tabelle 19). Es wurde jedoch beobachtet, dass C₅₀ für die Gerinnsel-Lyse durch dimeres SakSTAR(K109C) nur 0,12 µg/ml betrug, was etwa dreimal so niedrig ist wie für Wildtyp-Staphylokinase. Ein C₅₀ von 0,60 µg/ml wurde dagegen für SakSTAR(K102C-PEG) gemessen, was nur doppelt so hoch ist wie für Wildtyp-Staphylokinase. Somit schließt die Dimerisierung von SakSTAR über Disulfid-Brücken oder die Erhöhung der Größe des Moleküls über PEG-Derivatisierung die fibrinolytische Aktivität der Staphylokinase nicht aus. Ein PEG-Molekül scheint zwar die Diffusion und daher die fibrinolytische Wirksamkeit der derivatisierten Staphylokinase in einem Fibringerinnsel zu verringern, jedoch führt die Dimerisierung der Staphylokinase zu einer synergistischen fibrinolytischen Wirkung auf Human-Fibringerinnsel.

8. Pharmakokinetische Eigenschaften von dimerem SakSTAR(K109C) und SakSTAR(K102C-PEG) nach Bolus-Injektion in Hamstern

[0097] Die pharmakokinetischen Parameter der Disposition von dimerem SakSTAR(K109C) und SakSTAR(K102C-PEG) aus Blut wurden in Gruppen von 4 Hamstern nach einer intravenösen Bolus-Injektion von 100 µg/kg SakSTAR-Variante bewertet. SakSTAR-bezogenes Antigen wurde mittels dem an anderer Stelle beschriebenen ELISA untersucht. Der ELISA wurde gegen jede der zu quantifizierenden SakSTAR-Varianten kalibriert. Die pharmakokinetischen Parameter umfassten: anfängliche Halbwertszeit (in min), $t_{1/2\alpha} = \ln 2/\alpha$; endgültige Halbwertszeit (in min), $t_{1/2\beta} = \ln 2/\beta$; Volumen des Zentral-(Plasma-)Kompartimentes (in ml), $VC = \text{Dosis}/(A+B)$; Fläche unter der Kurve (in µg.min.ml⁻¹), $AUC = A/\alpha + B/\beta$; und Plasma-Clearance (in ml.min⁻¹), $Clp = \text{Dosis}/AUC$ (32).

[0098] Die Dispositionsrate des Staphylokinase-bezogenen Antigens aus Blut nach der Bolus-Injektion von 100 µg/kg der ausgewählten SakSTAR-Varianten in Gruppen von 4 Hamstern konnten durch eine Summe von zwei exponentiellen Ausdrücken durch graphisches "Curve Peeling" (Ergebnisse nicht gezeigt) angemessen beschrieben werden, aus denen die in der Tabelle 19 zusammengefassten pharmakokinetischen Parameter $t_{1/2\alpha}$ und Clp hergeleitet wurden. Die pharmakokinetischen Parameter der dimeren SakSTAR(K109C) und SakSTAR(K102C-PEG) unterschieden sich deutlich von denen des Wildtyp-SakSTAR. Die anfänglichen Plasma-Halbwertszeiten ($t_{1/2(\alpha)}$) waren 3,6 und 3,0 min und die Plasma-Clearance-Werte (Clp) waren 0,52 und 0,32 ml/min, für dimeres SakSTAR(K109C) bzw. SakSTAR(K102C-PEG). Diese Ergebnisse können auf dem Anstieg des Stokes-Radius von SakSTAR aufgrund der Dimerisation oder Vernetzung mit PEG beruhen. Ge-

maß der Größenausschluss-Chromatographie auf Superdex50 mittels HPLC haben die dimeren SakSTAR(K109C) und SakSTAR(K102C-PEG) apparente Molekulargewichte von 33 kDa bzw. 40 kDa.

BEISPIEL 14

Konstruktion, Reinigung und Charakterisierung von Cystein-Substitutions-Mutanten von Staphylokinase-Varianten mit reduzierter Immunogenität

1. Einleitung

[0099] Auf der Grundlage der Ergebnisse von Beispiel 13 wurden zusätzliche Polyethylenglycol-Derivate der SakSTAR-Varianten konstruiert, gereinigt und charakterisiert. Die am schwächsten immunogenen Varianten SakSTAR(E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), (SY19), und SakSTAR(K35A, E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY141), wurden als Matrizen verwendet, mit der Maßgabe, dass der COOH-Terminus der Letzteren Variante zur Wildtyp-Sequenz zurück verwandelt wurde, S84A durch E80 und K74Q durch K74R ersetzt wurden, so dass SakSTAR(K35A, E65Q, K74R, E80A, D82A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R), (SY161), erhalten wurde. Das eingebrachte Cystein, das als Akzeptor des Polyethylenglycol-Moleküls wirkt, befand sich in der aminoterminalen Region (vorzugsweise, aber nicht ausschließlich am Ser in der Stellung Nummer 3 der reifen Staphylokinase-Variante), damit es bei der Aktivierung der Staphylokinase freigesetzt wurde (Freisetzung der 10 NH₂-terminalen Aminosäuren); schließlich wurden Polyethylenglycol-Moleküle verschiedener Molekulargewichte (M_r 5000 bis 20000) verwendet, die entweder mit OPSS oder Maleimid substituirt worden waren.

[0100] Die in diesem Beispiel beschriebenen Mutanten sind in der Tabelle 20 aufgeführt. Diese Varianten wurden in *E. coli* exprimiert, gereinigt und in Bezug auf spezifische Aktivität, fibrinolytische Eigenschaften in Humanplasma *in vitro*, pharmakokinetische Eigenschaften nach Bolus-Injektion in Hamstern, thrombolytische Eigenschaften nach Bolus-Injektion in einem Hamster-Lungenembolie-Modell und Absorption von Antikörpern aus vereinigtem Plasma immunisierter Patienten (Pool 40) charakterisiert.

2. Reagenzien und Verfahren

[0101] Die Quelle für sämtliche in der erfindungsgemäßen Untersuchung verwendeten Reagenzien wurde zuvor beschrieben (22) oder ist nachstehend angegeben. Der Matrizenvektor für die Mutagenese, pMEX602sakB (d.h. pMEX.SakSTAR) ist an anderer Stelle beschrieben (23). Restriktions- und Modifikationsenzyme wurden von New England Biolabs (Leusden, Niederlande), Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) oder Pharmacia (Uppsala, Schweden) erhalten. Die Enzymreaktionen wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die mutagenen Oligonukleotide und Primer wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) erhalten. Die Plasmid-DNA wurde mit einem Reinigungs-Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) wie empfohlen isoliert. Transformationskompetente *E. coli*-Zellen wurden durch das bekannte Calciumphosphat-Verfahren hergestellt. Die Nukleotidsequenz-Bestimmung wurde an doppelsträngiger Plasmid-DNA mit dem Dideoxy-Kettenabbruch-Verfahren durchgeführt, wobei das T7-Sequenzier-Kit (Pharmacia, Uppsala, Schweden) verwendet wurde. Die Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden mit Taq-Polymerase von Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die in diesem Beispiel beschriebenen und zur Konstruktion der Varianten erforderlichen DNA-Rekombinations-Verfahren sind gut etabliert (22, 27).

3. Konstruktion der Expressionsplasmide

[0102] Die Varianten SakSTAR(S3C, E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), (SY19(S3C)), SakSTAR(S2C, S3C, E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), (SY19(2SC, 3SC)), SakSTAR(S3C, K35A, E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY141(S3C)), SakSTAR(S2C, S3C, K35A, E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, ∇ 137K), (SY141(S2C, S3C)), SakSTAR(S3C, K35A, E65Q, K74Q, E80A, D82A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R), (SY160(S3C)) und SakSTAR(S3C, K35A, E65Q, K74R, E80A, D82A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R), (SY161(S3C)), wurden mittels Polymerasekettenreaktion mit gespleißter Überlappungs-Extension (SOE-PCR) (24) mittels pMEX.SakSTAR, das SakSTAR codiert, als Matrize konstruiert, wobei zwei Fragmente durch PCR amplifiziert wurden (30 Zyklen: 1 sec bei 94°C, 1 sec bei 50°C, 10 sec. bei 72°C), wobei das erste Fragment von dem 5'-Ende (Primer 818A) des Staphylokinase-Gens zu dem zu mutagenisierenden Bereich (Vorwärts-Primer) ausging und das zweite Fragment von eben diesem Bereich (Rückwärts-Primer) zum 3'-Ende des Gens mit Primer 818D (5'CAAACAGCCAAGCTTCATT-CATTGAGC) ausging. Vorwärts- und Rückwärts-Primer hatten eine gemeinsame Überlappung von etwa 24

bp. Die beiden gereinigten Fragmente wurden dann in einer zweiten PCR-Reaktion mit den äußeren Primern 818A und 818D zusammengebaut (30 Zyklen: 1 sec bei 94°C, 1 sec bei 50°C, 10 sec bei 72°C). Das amplifizierte Produkt aus dieser letzten Reaktion wurde gereinigt, mit EcoRI und HindIII gespalten und in die entsprechende Stelle von pMEX.SakSTAR ligiert. Für jede Konstruktion wurde die Sequenz der Variante durch Sequenzierung des gesamten codierenden SakSTAR-Bereichs bestätigt.

4. Expression und Reinigung der SakSTAR-Varianten

[0103] Die SakSTAR-Varianten wurden wie vorstehend beschrieben aus transformierten *E. coli* exprimiert und gereinigt, die in Terrific-Broth(TB)-Medium (28) gezüchtet worden waren. Ein 2- bis 4-ml-Aliquot einer über Nacht gesättigten Kultur in LB-Medium wurde zum Animpfen einer 1- bis 2-Liter-Kultur in Terrific Broth verwendet, die mit 100 µg/ml Ampicillin angereichert war. Die Kultur wurde unter starker Belüftung und bei 30°C inkubiert. Nach etwa 16 Std. Inkubation wurde IPTG (200 µmol/l) zur Induktion der Expression von dem tac-Motor zu der Kultur gegeben. Nach 3 Std. Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 U/min für 20 min pelletiert, in 1/10 Volumen 0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH-Wert 6-6,5, resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung bei 0°C aufgebrochen. Die Suspension wurde für 20 min bei 20000 U/min zentrifugiert, und der Überstand wurde bei 4°C oder bei -20°C bis zur Reinigung aufbewahrt. Das Material wurde im Wesentlichen wie vorstehend beschrieben gereinigt (Beispiel 2): geklärte Zell-Lysate, die die SakSTAR-Varianten enthielten, wurden auf einer 1,6 × 5 cm SP-Sephadex-Säule und anschließend auf einer 1,6 × 8 cm Phenylsepharose-Säule chromatographisch aufgetrennt. Die SakSTAR enthaltenden Fraktionen, die durch SDS-Gelelektrophorese lokalisiert wurden, wurden zur weiteren Analyse vereinigt.

5. Biochemische Analyse

[0104] Die Proteinkonzentrationen wurden gemäß Bradford (29) bestimmt. SDS-PAGE wurde mit dem Phast System (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mittels 10-15%igen Gradientengelen und Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung durchgeführt, und die spezifischen Aktivitäten der SakSTAR-Lösungen wurden mit einem in Mikrotiterplatten (wie in Beispiel 2 beschrieben) durchgeführten chromogenen Substrat-Test bestimmt.

6. Chemische Vernetzung von Cystein-Mutanten von SakSTAR mit Polyethylenglycol

[0105] Die Thiolgruppe der Cystein-Mutanten wurde zur Anbindung an ein aktiviertes Polyethylenglycol, OPSS-PEG oder MAL-PEG (Shearwater Polymers Europe, Enschede, Niederlande), als Ziel verwendet. OPSS-PEG ist ein 5 kDa PEG-Molekül, das eine einzelne aktivierte Thiolgruppe an einem Ende trägt, die bei leicht alkalischem pH-Wert spezifisch mit freien Thiolen reagiert. MAL-PEG ist ein 5 kDa, 10 kDa oder 20 kDa Molekül, das eine Maleimid-Gruppe trägt, die unter schwachen Bedingungen in Gegenwart anderer funktioneller Gruppen spezifisch mit den Thiolgruppen reagiert. Die Modifikation der Varianten wurde durch Inkubation des Moleküls (100 µM) mit einem dreifachen Überschuss von OPSS-PEG oder MAL-PEG in einer 5 mM Phosphatlösung, pH-Wert 7,9, bei Raumtemperatur erzielt. Nach der Umsetzung (etwa 15 min), wurde überschüssiges OPSS-PEG oder MAL-PEG durch Reinigen der derivatisierten SakSTAR-Variante auf einer 1,6 × 5 cm SP-Sephadex-Säule, wie vorstehend beschrieben (siehe Beispiel 2), entfernt. Die die "pegylierte" SakSTAR-Variante enthaltenden Fraktionen, die durch optische Dichte bei 280 nm lokalisiert wurden, wurden zur weiteren Analyse vereinigt. Die SDS-PAGE-Analyse und Coomassie-Blue-Färbung bestätigte, dass die PEG-Vernetzung quantitativ erfolgte. Der Tabelle 20 zufolge waren die spezifischen Aktivitäten der PEG-Derivate verglichen mit der der Wildtyp-Staphylokinase nur marginal beeinflusst.

7. Fibrinolytische In-vitro-Eigenschaften der SakSTAR-Varianten in Humanplasma

[0106] Die fibrinolytischen und fibrinogenolytischen Eigenschaften von SakSTAR-Varianten wurden wie zuvor beschrieben bestimmt. Die dosis- und zeitabhängige Lyse von in Humanplasma getränkten ¹²⁵I-Fibrin-markierten Humanplasma-Gerinnseln wurden mit sämtlichen getesteten Molekülen erhalten. Gleichwirksame Konzentrationen der Test-Verbindung (welche 50% Gerinnsel-Lyse in 2 Std. verursachten; C₅₀), die graphisch aus den Auftragungen der Gerinnsel-Lyse bei 2 Std. gegen die Konzentration des Plasminogenaktivators bestimmt wurden (nicht gezeigt, waren mit der von SakSTAR vergleichbar oder nur leicht niedriger als die von SakSTAR (Tabelle 20). Der C₅₀-Wert für die Gerinnsel-Lyse durch die mit P20 (PEG mit M_r 20 kDa) derivatisierten Varianten war etwa doppelt so hoch wie die der nicht-derivatisierten Varianten. Somit beeinflusst eine Vergrößerung des Moleküls über PEG-Derivatisierung die fibrinolytische Aktivität der Staphylokinase nicht merklich. Die PEG-Moleküle scheinen zwar die Diffusion und daher die fibrinolytische Wirksamkeit der derivatisierten Staphylokinase in einem Fibringerinnsel zu verringern, jedoch ist dies anscheinend mit Varianten, die in ihrem während der Prozessierung der Staphylokinase freigesetzten NH₂-terminalen Bereich substituiert sind, weni-

ger ausgeprägt als mit Varianten, die im Zentrum des Moleküls substituiert sind (vgl. Tabellen 19 und 20).

8. Pharmakokinetische Eigenschaften von mit Polyethylenglycol chemisch modifizierten SakSTAR-Varianten nach Bolus-Injektion in Hamstern

[0107] Die pharmakokinetischen Parameter der Disposition der pegylierten Varianten aus Blut wurden in Gruppen von 4 Hamstern nach einer intravenösen Bolus-Injektion von 100 µg/kg SakSTAR-Variante bewertet. SakSTAR-bezogenes Antigen wurde mittels dem an anderer Stelle beschriebenen ELISA untersucht. Der ELISA wurde gegen jede der zu quantifizierenden SakSTAR-Varianten kalibriert. Pharmakokinetische Parameter umfassten: anfängliche Halbwertszeit (in min), $t_{1/2\alpha} = \ln 2/\alpha$; endgültige Halbwertszeit (in min), $t_{1/2\beta} = \ln 2/\beta$; Volumen des Zentral- (Plasma-)Kompartimentes (in ml), $VC = \text{Dosis}/(A+B)$; Fläche unter der Kurve (in µg.min.ml⁻¹), $AUC = A/\alpha + B/\beta$; und Plasma-Clearance (in ml.min⁻¹), $Cl_p = \text{Dosis}/AUC$ (32).

[0108] Die Dispositionsrate des Staphylokinase-bezogenen Antigens aus Blut nach der Bolus-Injektion von 100 µg/kg der ausgewählten SakSTAR-Varianten in Gruppen von 4 Hamstern konnten durch eine Summe von zwei exponentiellen Ausdrücken durch graphisches "Curve Peeling" (Ergebnisse nicht gezeigt) angemessen beschrieben werden, aus denen die in der Tabelle 20 zusammengefassten Plasma-Clearance-Werte Cl_p hergeleitet wurden. Die Clearance-Werte der pegylierten Varianten unterschieden sich deutlich von denen von Wildtyp-SakSTAR und waren umgekehrt proportional zum Molekulargewicht der PEG-Moleküle mit einer durchschnittlichen fünffachen Reduktion mit PEG 5 kDa, zehnfachen Reduktion mit PEG 10kDa und 30fachen Reduktion mit PEG 20kDa. Diese Ergebnisse können auf dem Anstieg des Stokes-Radius von SakSTAR aufgrund der Vernetzung mit PEG beruhen.

BEISPIEL 15

Vergleichende thrombolytische Wirksamkeit und Clearance von SakSTAR(S3C-P20, E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R), (SY19(S3C-P20)), in zwei Patienten mit akutem Myokardinfarkt

Reinigung und Konditionierung von SakSTAR-Varianten im Großmaßstab zur In-vivo-Verwendung.

[0109] Das Material wurde bis zur Homogenität aus 18 Liter-Kulturvolumina gereinigt. Der Endotoxin-Gehalt war unter 1 IU/mg. Die Gelfiltration auf HPLC ergab einen einzigen Haupt-Symmetrie-Peak im Chromatographiebereich der Säule, was > 98% des eluierten Materials darstellt (Gesamtfläche unter der Kurve) (nicht gezeigt). Die SDS-Gelelektrophorese einer 30 µg-Probe ergab eine einzelne Haupt-Komponente. Die durch Filtration sterilisierten Präparate erwiesen sich am Tag 3 der Untersuchung wie bei den Verfahren beschrieben als steril. Die intravenöse Bolus-Injektion der SakSTAR-Variante in 5 Mäusen (3 mg/kg Körpergewicht) provozierte keine akute Reaktion und verringerte die Gewichtszunahme innerhalb von 8 Tagen, im Vergleich zu Mäusen, denen die gleiche Menge Salzlösung gegeben wurde, nicht (nicht gezeigt).

[0110] Zwei Patienten mit akutem Myokardinfarkt erhielten eine Bolus-Injektion von 5 mg SY19(S3C-P20). Diese Patienten hatten eine vollständige Rekanalisierung der verschlossenen für den Infarkt verantwortliche Arterie, wie es durch Koronar-Angiographie 90 min nach der Bolus-Injektion bestimmt wurde. Das Material wurde aus dem Plasma mit einer anfänglichen Halbwertszeit von 3 bis 4 Std., verglichen mit 4 bis 6 min für Wildtyp-SakSTAR, geklärt. Diese Daten bestätigen, dass sich pegylierte SakSTAR-Varianten zur Thrombolyse-Therapie durch eine einzige Bolus-Injektion bei einer reduzierten Dosis eignen.

SCHLUSSFOLGERUNG

[0111] Die vorliegende Erfindung zeigt zusammengefasst, dass Staphylokinase-Varianten mit einer merklich reduzierten Antikörper-Induktion, aber intakter thrombolytischer Wirksamkeit, hergestellt werden können. Diese Beobachtung bestätigt den ersten Fall, bei dem ein heterologes Protein unter Verwendung eines gentechnologischen Protein-Verfahrens beim Mensch signifikant weniger immunogen gemacht wird, ohne dass es seine biologische Aktivität verliert. Die vorliegende Erfindung zeigt zudem, dass die selektive chemische Modifikation von Staphylokinase oder seiner Varianten mit Polyethylenglycol mit verschiedenen Molekulargewichten durchführbar ist, was zu einer Reduktion der Plasma-Clearance proportional zum Molekulargewicht führt. Bei der bevorzugten Ausführungsform wird eine Aminosäure in dem NH₂-terminalen Bereich der Staphylokinase, d.h. dem Bereich, der durch Prozessierung entfernt wird, gegen Cys ausgetauscht, und die eingeführte Thiolgruppe wird mit OPSS-PEG oder MAL-PEG chemisch modifiziert. Dies führt zu homogenen Produkten, die bei einer einzelnen intravenösen Bolus-Injektion in Versuchstieren und in Patienten eine aufrechterhaltene thrombolytische Wirksamkeit bei erheblich reduzierten Dosen haben.

Tabelle 1: Alanin-zu-Wildtyp-Umkehrvarianten von 'geladenem Cluster-zu-Alanin'-Mutanten von SakSTAR: Assoziationskonstanten ($K_A \times 10^7 \text{ mol/L}^{-1}$) für die Bindung an unlöslich gemachte monoklonale Maus-Antikörper (MAKs) und Absorption (Prozent) der Antikörper an Plasma immunisierter Patienten

Variante	Exp. mg/L	Spez. Akt. (kU/mg)	Maus-MAKs																Patientenplasma			
			Epiop. I				Epiop. II				Epiop. III				Pool		Subpool C					
			7G11	30A7	30A7	2B12	3G10	18F17	14H5	74H4	32B2	7F10	7H11	23E1	20C8	22C7	1A10	95	95			
SakSTAR	22	13	2.9	7.8	11	38	7.4	19	2.7	2.4	4.0	14	3.4	2.9	0.6	95	95					
SakSTAR(K35A.E38A)	97		15	22	4.2	11	79	110	15	13	2.2	<0.1	<0.1	<0.1	1.0	1.0	95	94				
SakSTAR(K74A.E75A.R77A)	110		11	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	130	17	28	3.3	2.4	11	4.0	2.1	0.9	55	43				
SakSTAR(K35A.E38A.K74A.E75A.R77A)	50		11	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	110	36	26	15	2.0	<0.1	<0.1	<0.1	1.5	52	41				
SakSTAR(E38A.K74A.E75A.R77A)	43		11	<0.1	<0.2	<0.1	<0.1	140	39	26	15	2.1	<0.1	3.2	3.7	1.6	50	44				
SakSTAR(K35A.K74A.E75A.R77A)	36		92	<0.1	0.15	<0.1	<0.1	52	14	29	88	2.3	<0.1	1.8	<0.1	1.8	46	43				
SakSTAR(K35A.E38A.E75A.R77A)	44		11	0.3	0.1	0.2	<0.1	75	98	12	73	1.6	<0.1	<0.1	<0.1	0.53	92	87				
SakSTAR(K35A.E38A.K74A.R77A)	47		88	2.9	<0.1	2.0	0.33	110	29	31	10	2.0	<0.1	<0.1	<0.1	0.63	56	50				
SakSTAR(K35A.E38A.K74A.E75A)	14		13	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	180	41	32	15	1.6	<0.1	<0.1	<0.1	1.2	48	41				
SakSTAR(E38A.E75A.R77A)	33		11	0.6	0.15	0.4	0.3	79	12	15	10	2.0	<0.1	2.6	4.7	1.1	95	88				
SakSTAR(E75A.E75A)	64		16	0.3	<0.1	<0.1	0.9	56	11	33	89	2.0	<0.1	20	4.8	1.3	91	90				
SakSTAR(K35A.E75A.R77A)	68		92	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	60	20	13	11	3.3	<0.1	1.5	<0.1	0.8	88	89				
SakSTAR(K35A.E75A)	150		17	0.12	<0.1	0.16	0.14	40	72	13	92	4.2	<0.1	1.8	<0.1	1.4	94	93				
SakSTAR(K74A)	100		12	7.6	0.17	4.4	2.1	55	15	33	14	3.6	2.9	14	4.9	3.4	59	45				
SakSTAR(E75A)	140		13	1.2	<0.1	<0.1	<0.1	46	8.3	14	12	3.4	4.5	18	5.0	1.2	95	93				
SakSTAR(K74A.E75A.R77A.E80A.D82A)	50		14	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	180	19	33	19	3.7	<0.1	<0.1	<0.1	1.2	49	29				
SakSTAR(E80A.D82A)	130		23	12	2.1	6.5	5.9	79	61	84	78	1.9	<0.1	<0.1	<0.1	0.44	89	83				
SakSTAR(E80A)	160		13	13	3.3	7.9	10	35	74	17	8.6	2.1	<0.1	16	3.6	<0.1	94	93				
SakSTAR(D82A)	160		17	12	4.8	7.3	11	31	78	17	12	2.7	<0.1	0.18	<0.1	<0.1	95	93				
SakSTAR(E75A.D82A)	170		20	15	3.1	6.6	7.2	60	81	15	34	4.9	0.17	9.7	0.5	0.1	93	95				

Apparente Assoziationskonstanten ≥ 10 -fach niedriger als die von Wildtyp-SakSTAR sind fett dargestellt; Spez. Akt. $\geq 100\ 000 \text{ HU/mg}$ ist fett dargestellt; $\leq 60\%$ Absorption ist fett dargestellt.

Tabelle 3: Alanin-Substitutionsvarianten von SakSTAR: Assoziationskonstanten ($K_a \times 10^3 \text{ mol/L}^{-1}$) für die Bindung an unlöslich gemachte monoklonale Maus-Antikörper (MAbs) und Absorption (Prozent) von Antikörpern aus Plasma immunisierter Patienten

Volume	Exp. Amt. (mg/L)	Unsolubility I										Unsolubility II										Empirical III				SASTAR-Patientenplasma		
		TCIT 26X7					26X7 7B12					7B12 7B12					7B12 7B12					7B12 7B12		7B12 7B12		Pos.	Subpool B	Subpool C
		TCIT	26X7	26X7	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12	7B12			
SASTAR	120	93	13	20	78	11	38	72	10	77	74	10	14	34	24	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	
SASTARIS14C16R.H13R	120	164	17	74	19	35	18	23	18	214	31	0.4	11	16	0.3	201												
SASTARIFA1	150	113	21	12	47	97	42	23	17	10	0.4	1.1	1.9	0.6	4.5	1.21												
SASTARID1A.K6A1	24	118	16	51	29	15	22	16	26	18	10	0.91	11	3.3	1.8	0.751												
SASTARIBKBA.K10A1	24	22	49	66	23	16	24	84	20	14	76	3.4	16	9.6	1.1	0.5												
SASTARIV9A1	LE																											
SASTARIK11AD1A.D1A1	6	24	61	20	17	34	11	19	45	44	87	1.5	24	11	7.6	40.1												
SASTARD1A1	11	51	13	40	66	31	38	77	12	15	22	27	6.0	3.2	5.6	40.1												
SASTARIS10A1	21	81	16	45	64	90	13	61	13	21	16	4.0	8.0	4.3	2.5	0.5												
SASTARIV17A.F18A1	27	30	13	22	31	10	95	21	46	67	73	12	18	6.5	3.4	40.1												
SASTARIE19A.P20A1	26	9	19	13	42	12	15	61	11	16	10	1.1	15	5.1	1.3	40.1												
SASTARIT21A1	34	48	15	24	87	96	71	31	24	28	13	18	9.6	2.9	5.6	9.6												
SASTARIP21A1	41	14	31	44	14	22	41	51	37	13	10	4.0	11	7.6	3.3	1.8												
SASTARIV12A1	10	17	33	43	13	11	33	43	70	42	40	10.4	14	6.6	4.8	40.1												
SASTARIL13A1	LE																											
SASTARIM26A1	LE																											
SASTARIV27A1	62	33	15	16	78	74	12	29	17	33	20	1.3	3.9	2.8	4.2	3.2												
SASTARIN28A1	90	58	29	21	70	55	27	10	20	23	21	2.1	5.6	2.1	2.1	0.7												
SASTARIN28A.V29A1	35	46	30	25	20	18	30	14	20	24	27	1.1	20	1.1	5.0	2.0												
SASTARIT30A1	52	74	13	21	70	61	76	34	51	17	33	3.6	12	3.1	5.4	4.8												
SASTARIV12A1	78	10	96	24	62	78	36	17	12	14	14	40.1	40.1	40.1	40.1	2.2												
SASTARID11A.K15A1	130	121	19	14	14	19	15	24	12	10	53	1.4	5.1	3.8	5.1	10.1												
SASTARIS11A1	29	17	24	46	93	11	28	11	22	15	29	3.1	1.8	3.8	2.0	0.2												

Tabelle 3 - Fortsetzung: Alanin-Substitutionsvarianten von SaStAR: Assoziationskonstanten ($K_A \times 10^2 \text{ mol/L}^{-1}$) für die Bindung an unlöslich gemachte monoklonale Maus-Antikörper (MAKs) und Absorption (Prozent) von Antikörpern aus Plasma immunisierter Patienten

V-Name	Exp. (mg/L)	Reas. Ant. (µl/ml)	K _A x 10 ² mol/L ⁻¹										Absorption (%)		Pool	SaStAR/immunisierte		Subpool C
			TC01	SA1	TC07	TC17	TC10	TC17	TC15	TC17	TC17	TC17	TC17	TC17	TC17	TC17	TC17	TC17
SaSTAR(K3A)	97	15	22	42	11	79	110	10	13	12	72	<0.1	<0.1	<0.1	10	93	91	95
SaSTAR(K3A.D3A)	14	32	9.8	15	2.7	6.5	32	4.2	17	9.2	14	<0.1	<0.1	0.9	3.0	86	83	78
SaSTAR(K3A)	40	110	3.6	11	1.0	20	11	20	4.1	14	10	2.9	1.4	3.2	3.6	93	93	95
SaSTAR(L3A.L40A)	8	45	14	15	1.1	3.1	8.0	27	16	6.3	12	2.7	1.2	3.4	3.2	93	93	95
SaSTAR(L3A.L40A)	24	48	10	25	4.1	13	12	11	10	1.9	27	2.7	3.2	13	4.8	93	93	95
SaSTAR(L43A)	37	69	15	38	9.7	18	26	<0.1	<0.1	<0.1	9.1	1.5	2.0	23	7.8	95	95	95
SaSTAR(L51A.L43A)	15	45	10	22	3.7	17	13	<0.1	<0.1	<0.1	14	1.0	2.3	11	5.2	95	95	95
SaSTAR(L43A)	19	45	16	5.6	1.4	2.8	6.1	2.2	0.2	1.7	32	2.6	3.1	8.3	1.1	91	92	95
SaSTAR(L46A.K30A)	LE																	
SaSTAR(L43A)	6	45	<0.1	4.0	1.0	1.4	3.7	2.7	2.8	8.3	1.7	10.4	8.8	1.0	3.0	90	81	97
SaSTAR(L40A)	2	45	2.7	1.8	2.3	2.2	3.5	4.4	11	6.2	1.1	2.0	5.7	2.0	1.7	93	93	95
SaSTAR(K30A)	15	42	<0.1	1.3	1.9	7.8	8.7	4.6	8.3	12	2.2	0.5	2.8	6.4	4.0	95	94	95
SaSTAR(L51A.L43A)	14	68	6.9	19	2.3	2.6	7.8	4.1	0.7	12	3.5	1.5	1.9	3.1	2.3	93	94	95
SaSTAR(L55A)	LE																	
SaSTAR(L56A)	17	150	5.5	15	3.2	12	13	56	3.3	42	11	2.0	3.5	5.1	2.7	94	92	95
SaSTAR(K37A.E38A.K39A)	94	14	8.2	0.0	3.1	2.7	16	14	0.7	5.6	0.31	0.26	1.7	0.42	1.0	95	95	95
SaSTAR(L60A)	11	96	12	20	2.9	1.1	13	27	6.1	23	2.1	1.5	10.7	3.8	2.9	95	95	95
SaSTAR(L63A.E63A)	80	105	>10	8.8	2.1	2.9	>11	>16	6.6	>22	4.6	0.5	4.6	2.0	5.9	89	83	95
SaSTAR(L62A.Y61A)	24	45	<0.1	4.3	0.3	2.1	1.9	11	2.2	3.1	8.4	1.7	0.6	9.2	3.6	89	83	95
SaSTAR(L63A)	4	45	<0.1	18	3.7	9.0	13	17	5.3	3.3	13	1.1	2.2	5.3	4.3	89	82	95
SaSTAR(L64A)	14	48	14	16	2.9	6.1	2.6	15	15	4.1	21	2.6	1.6	7.6	5.6	94	92	95
SaSTAR(L65A)	25	97	5.1	20	4.4	12	20	10	5.6	9.7	1.9	1.6	2.5	4.2	3.0	95	95	95
SaSTAR(L65A.D69A)	45																	
SaSTAR(L66A)	26	45	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	35	4.4	5.7	23	3.3	2.0	10	1.4	1.6	85	78	92
SaSTAR(L68A)	16	93	3.1	22	1.5	8.5	9.3	29	8.7	26	3.5	4.0	2.1	5.3	3.6	92	92	95
SaSTAR(L71A)	LE																	

Tabelle 3 - Fortsetzung: Alanin-Substitutionsvarianten von SakSAR: Assoziationskonstanten (K , $\times 10^3 \text{ mol/L}^{-1}$) für die Bindung an unlöslich gemachte monoklonale Maus-Antikörper (MAKs) und Absorption (Prozent) von Antikörpern aus Plasma immunisierter Patienten

Exp. (mmL)	Inert. At. (KJ/mole)	Enthalpies of formation										Enthalpies of formation										Enthalpies of formation											
		SASTAR (100%)					SASTAR (100%)					SASTAR (100%)					SASTAR (100%)					SASTAR (100%)											
		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%	
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40
24	45	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40	18	40										

Tabelle 3 - Fortsetzung: Alanin-Substitutionsvarianten von SaStAR Assoziationskonstanten ($K_A \cdot 10^3 \text{ mol/L}$) für die Bindung an unlöslich gemachte monoklonale Maus-Antikörper (MAbs) und Absorption (Prozent) von Antikörpern aus Plasma immunisierter Patienten

Substanz	Exp. (mg/L)	Exp. Ant. (μg/ml)	Körperphase I										Körperphase II										Substanz	
			17021	2021	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	12	89	4.0	1.5	3.7	6.5	9.4	9.1	1.9	5.9	1.3	1.3	3.6	3.9	8.3	4.7	2.8	0.9	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	67	210	9.0	10	10	9.4	9.1	1.9	5.9	1.3	1.3	3.6	3.9	8.3	4.7	2.8	0.9	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz	
SaSTAR(K10A)	14	55	5.8	19	4.8	14	22	2.1	3.0	4.4	4.8	4.0	0.4	7.6	3.4	1.1	1.3	0.5	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	2	94	2.1	1.3	3.0	2.4	6.2	5.5	3.2	1.7	1.1	1.4	1.8	3.1	1.8	1.2	0.5	0.6	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	13	130	5.2	15	1.4	9.8	4.0	3.1	8.7	4.7	1.4	1.9	3.1	6.1	1.2	3.0	0.6	0.6	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	170	170	10.6	5.1	7.2	19	5.1	2.8	1.5	2.1	1.2	1.2	0.43	6.9	3.4	1.0	1.9	0.9	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	5	46	3.2	16	1.6	1.4	2.2	2.5	8.4	1.1	2.1	0.8	2.8	7.9	1.5	1.5	0.9	0.9	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	140	140	1.2	16	1.9	1.0	2.2	1.4	5.9	1.3	8.0	0.1	1.5	4.3	2.3	3.0	0.8	0.8	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	40	34	3.1	1.4	2	1.5	1.5	1.3	1.4	1.9	6.7	4.8	1.5	4.8	2.6	1.3	0.9	0.9	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	5	52	1.1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	130	130	15.0	2.4	1.1	2.0	2.9	1.3	1.4	2.9	1.2	0.52	1.2	1.1	2.9	2.0	1.2	1.2	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	26	75	2.2	2.6	3.1	1.7	1.6	1.0	9.8	2.5	9.0	6.9	3.0	1.5	3.1	3.2	1.0	1.0	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	5	19	NT																14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	5	410	2.8	18	4.7	1.1	2.8	1.7	3.2	6.0	1.9	4.0	0.2	5.1	2.1	0.9	1.6	1.6	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	11	51	7.6	1.1	2.0	1.2	1.1	1.0	5.8	3.90	9.8	2.5	1.8	8.0	4.2	6.5	0.7	0.7	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	11	64	6.9	6.7	1.8	3.0	9.6	2.5	4.9	1.4	8.4	1.5	0.6	1.9	0.9	2.5	1.8	1.8	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	10	20	16	35	4.8	1.5	1.4	3.8	2.6	4.3	6.2	2.9	2.5	2.0	4.2	6.7	0.9	0.9	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	23	190	9.1	35	2.1	1.4	2.4	2.1	1.5	1.5	4.2	2.1	0.7	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	130	280	5.1	12	1.2	6.4	3.5	2.2	6.7	1.1	1.5	2.7	4.8	4.0	2.1	0.9	0.6	0.6	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	140	70	6.5	12	2.4	1.1	3.3	1.9	1.4	1.9	2.9	3.4	1.9	1.3	5.1	8.0	0.9	0.9	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	100	120	4.2	15	2.6	9.2	1.1	3.3	1.2	3.0	3.9	2.1	2.1	1.6	4.8	2.4	0.4	0.4	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	1	69	9.4	15	1.9	7.8	7.8	2.4	8.0	9.1	8.6	1.4	0.36	6.4	1.6	1.6	0.9	0.9	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	74	122	1.1	6.7	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	410	52	3.2	1.1	3.9	1.1	2.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz
SaSTAR(K10A)	180	76	1.6	3.6	1.2	1.1	3.4	5.3	1.2	1.6	1.2	1.2	1.5	8.0	3.9	1.8	0.5	0.5	14.10	0.6	95	95	Substanz	Substanz

E: Expressionniveau unter 3 mg/ml

I.E.: Expressionsniveau unter 3 mg/ml

Tabelle 4: Mutagenese von S34, G36 und H43: Assoziationskonstanten ($K_A \times 10^7 \text{ mol/L}^{-1}$) für Bindung an unlöslich gemachte monoklonale Maus-Antikörper (MAK) und Absorption (Prozent) der Antikörper aus Plasma immunisierter Patienten

Exp.	Spec. Akt. (µCi/mg)	S. 34.010	Merkmale										Epitopkriter II										Epitopkriter III				SASSTAR-variantenplasma																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
			Epitopkriter I					Epitopkriter II					Epitopkriter III					Epitopkriter III					Pool		Subpool B		Subpool C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
			TICIT 76X2	30X2	30T2	30T10	TBF12	14RS	28R3	32B2	7F10	7H11	33B3	40X3	20C4	1A10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				

Tabelle 5: Mutagenese von K35, Y73, K74, E80/D82, N95, K130, V132 und K135: Assoziationskonstanten ($K_a \times 10^7 \text{ mol/L}^{-1}$) für Bindung an unlöslich gemachte monoklonale Maus-Antikörper (MAK) und Absorption (Prozent) der Antikörper aus Plasma immunisierter Patienten

Antikörper	Exp. (mg/L)	Spec. Akt. ($\mu\text{g/L}$)	Epitopentyp I					Epitopentyp II					Epitopentyp III					Subpool C	
			Y7011	76A5	10A5	7B12	3G10	1B11	1B15	2B17	1B17	1B17	7B11	15E1	40C8	20C4	1A10	Pool	Subpool B
SASSTAN		120	91	19	29	78	11	11	72	19	77	24	10	18	54	79	08	95	95
SASSTAR154GDMR (H43R)		120	10	12	11	75	11	<0.1	<0.1	<0.1	20	27	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	17	87	76
SASSTAMIN15A1	330	120	94	14	11	80	34	31	11	12	11	26	<0.1	1.1	0.2	17	08	91	88
SASSTAR1K13E1	140	140	48	10	06	27	27	21	57	91	48	10	<0.1	<0.1	<0.1	15	04	95	95
SASSTAR1K13Q1	9	60	32	93	23	34	27	27	27	93	85	12	0.5	17	<0.1	19	10	95	95
SASSTAR1V13A1	20	65	95	<0.1	<0.1	<0.1	48	33	31	11	84	20	0.5	90	23	14	08	63	44
SASSTAR1V13E1	0	31	19	12	13	21	80	24	15	18	15	26	16	62	35	72	14	93	91
SASSTAR1V13H1	30	45	73	15	<0.1	<0.1	14	30	73	17	42	43	33	68	59	97	13	76	65
SASSTAR1V13L1	11	45	11	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	84	19	26	33	34	42	71	42	34	10	81	60
SASSTAR1V13I5	11	45	70	31	030	04	30	21	81	14	21	32	32	97	11	11	07	86	60
SASSTAR1V13M1	0	37	48	00	40	46	16	84	45	11	60	77	29	50	30	38	13	73	53
SASSTAR1K12A1	80	60	44	27	02	22	19	12	52	14	70	23	20	68	11	18	09	64	58
SASSTAR1K13E1	12	45	22	06	<0.1	07	01	14	18	25	93	12	30	30	12	06	10	81	43
SASSTAR1K13H1	9	10	29	45	41	13	17	10	16	48	13	15	14	40	18	14	09	63	46
SASSTAR1K13Q1	64	110	53	58	<0.1	25	11	34	59	12	54	11	20	62	23	20	04	70	62
SASSTAR1K13H1	24	150	21	75	20	41	42	24	69	80	63	13	22	78	32	21	05	75	70
SASSTAR1E80A (D82A)		120	73	12	21	65	59	39	61	24	28	10	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	04	89	83
SASSTAR1E80A1	160	160	11	15	33	29	10	35	74	17	86	21	<0.1	16	16	<0.1	17	94	91
SASSTAR1D82A1	160	160	19	12	48	73	11	31	78	12	12	22	<0.1	02	<0.1	<0.1	23	95	91
SASSTAR1N95A1	160	160	10	18	40	10	11	50	11	14	49	23	17	73	47	26	08	91	94
SASSTAR1N95E1	12	70	26	85	11	52	34	17	27	10	52	11	05	40	17	18	00	93	92
SASSTAR1N95G1	20	140	41	11	15	68	76	36	33	15	36	15	07	58	27	27	09	93	90
SASSTAR1N95K1	54	160	95	12	32	20	11	51	30	18	48	25	16	81	20	48	11	95	95
SASSTAR1N95R1	16																		

Tabelle 5 - Fortsetzung: Mutagenese von K35, Y73, K74, E80/D82, N95, K130, V132 und K135: Assoziationskonstanten ($K_A \times 10^7 \text{ mol/L}^{-1}$) für Bindung an unlöslich gemachte monoklonale Maus-Antikörper (MAK) und Absorption (Prozent) der Antikörper aus Plasma immunisierter Patienten

Antikörper	Exp. mg/L / $\mu\text{g/ml}$	Spez. Akt. / $\mu\text{g/ml}$	Epitop 1				Epitop 2				Epitop 3				Substanz		Antigen			
			74277	28320	30320	30320	18772	14333	20874	27873	17185	17853	75581	40073	14108	14108				
Substanz K130A1		280	5.1	1.2	3.2	4.1	3.5	2.7	6.7	1.1	1.5	2.7	<0.1	<0.1	2.1	0.9	0.6	92	74	71
Substanz K130L1		290	7.8	1.4	1.1	4.0	5.6	3.1	5.4	9.7	1.7	2.7	<0.1	<0.1	3.4	0.5	0.5	92	84	82
Substanz K132A1	103	130	4.2	1.5	2.6	6.2	1.1	3.1	1.2	3.0	1.9	2.1	2.1	1.6	<0.1	2.6	0.4	93	93	93
Substanz K132L1	120	120	4.8	1.4	2.1	8.0	9.7	6.1	10	4.8	2.0	2.3	2.0	1.1	<0.1	4.8	0.4	93	93	93
Substanz K132T1	78	140	4.5	1.3	2.4	7.8	9.0	3.9	10	2.5	1.6	2.0	1.1	2.0	<0.1	<0.1	0.4	93	93	93
Substanz K132N1	16	230	4.5	1.1	1.7	7.0	3.2	2.1	1.7	2.0	1.5	2.0	1.5	1.5	<0.1	4.2	0.7	93	93	93
Substanz K132R1	76	230	5.4	1.2	1.8	4.1	4.2	2.1	5.5	7.8	1.8	1.1	2.1	1.4	<0.1	0.4	0.4	93	93	93
Substanz K133A1	54	410	5.2	1.2	1.1	3.9	1.1	2.0	1.1	1.1	1.6	2.0	1.6	0.9	1.7	1.9	0.9	93	93	93
Substanz K135F1	68	34	3.9	0.3	1.0	6.1	4.1	1.3	4.5	8.4	1.6	2.1	1.6	5.8	1.9	1.5	0.9	93	93	93
Substanz K135R1	34	230	4.0	1.4	1.4	9.1	3.0	1.1	8.1	1.1	2.1	1.9	2.4	2.4	2.6	2.1	0.5	93	93	93
Substanz K135A1	20	130	NT															84	50	93
Substanz K137A1	24	45	1.8	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	1.9	0.7	2.1	9.4	1.2	2.7	1.1	4.0	1.6	1.1	47	38	87
Substanz K137L1	23	6	1.7	0.7	<0.1	2.1	<0.1	4.2	1.9	2.0	2.0	4.9	1.9	2.8	9.6	2.1	0.8	51	34	90
Substanz K130A1 K74A N95A1	84	84	5.3	2.7	<0.1	2.5	3.3	1.7	1.2	9.6	3.4	2.3	2.1	6.2	2.7	2.9	0.8	40	47	93
Substanz K130A1 K132R1	140	140	4.9	1.3	1.9	9.0	9.9	1.8	1.2	1.3	2.5	1.5	1.8	3.9	3.6	3.7	0.8	93	93	93
Substanz K130T1 K135R1	15	280	1.7	1.0	1.6	2.7	8.0	1.3	1.7	4.5	3.7	1.6	<0.1	<0.1	2.4	0.4	0.6	89	60	73

Tabelle 6: Kombinationsmutanten von SakSTAR(K130T,K135R) mit K35A, G36R, E65X,K74X und ausgewählten anderen Aminosäuren

Name	Exp mg/mL	Spez. Akt. U/mg	Enzopoolster I			Enzopoolster II			Enzopoolster III			SakSTAR-Patientenplasma			Code	
			TKGT 76A2	DA2	78T2	TKGT 76A2	DA2	78T2	TKGT 76A2	DA2	78T2	TKGT 76A2	DA2	78T2		
SakSTAR(K130T,K135R)	15	280	1.7	10	1.6	7.2	8.9	1.7	1.7	7.7	8.3	7.7	1.6	8.0	80	SY2
SakSTAR(G36R,K130T,K135R)	36	220	7.2	18	2.8	1.1	1.1	1.7	3.9	8.9	3.1	1.6	6.8	6.8	6.9	SY3
SakSTAR(K74R,K130T,K135R)	18	310	7.3	27	5.9	1.6	1.8	1.7	1.7	1.1	5.1	1.5	6.8	6.8	6.9	SY4
SakSTAR(K74Q,K130T,K135R)	24	190	4.0	3.2	1.0	7.7	0.9	3.0	5.7	7.2	8.4	1.8	6.8	6.8	6.7	SY41
SakSTAR(G36R,K74R,K130T,K135R)	5	210	7.6	26	5.7	1.7	1.9	1.1	4.7	10	5.0	1.4	6.8	6.8	6.9	SY5
SakSTAR(G36R,K74Q,K130T,K135R)	88	120	5.5	7.5	0.8	1.1	6.4	1.5	1.1	7.1	6.1	2.6	6.8	6.8	6.1	SY42
SakSTAR(G36R,K74R,K130T,K135R)	29	180	5.6	8.8	2.2	10	10	6.8	6.8	6.8	6.8	2.0	6.8	6.8	6.8	SY9
SakSTAR(S14C,G36R,K74Q,K130T,K135R)	40	70	4.6	5.9	0.5	1.1	1.5	1.8	9.7	7.5	3.1	2.1	6.8	6.8	6.1	SY43
SakSTAR(E65A,K74Q,K130T,K135R)	46	170	3.1	9.0	2.1	1.1	1.1	1.9	9.0	1.2	5.7	2.1	6.8	6.8	6.1	SY48
SakSTAR(G16R,E65A,K74Q,K130T,K135R)	70	83	4.7	1.2	1.2	1.6	2.1	3.7	1.7	10	6.9	2.0	6.8	6.8	6.1	SY44
SakSTAR(G16R,E65A,K74Q,K130T,K135R)	17	71	5.7	10	1.8	1.1	1.2	2.1	8.1	9.9	1.6	1.8	6.8	6.8	6.1	SY39
SakSTAR(E65Q,K74Q,K130T,K135R)	90	90	5.6	6.0	2.9	3.6	3.9	2.1	6.0	8.8	2.8	2.5	6.8	6.8	6.1	SY31
SakSTAR(K74Q,K86A,K130T,K135R)	20	150	6.3	18	2.1	3.5	1.6	4.0	3.1	4.1	6.3	1.3	6.8	6.8	6.1	SY40
SakSTAR(K74Q,K86A,K130T,K135R)	54	130	2.4	4.9	4.0	3.3	3.8	1.9	8.1	7.6	4.7	1.9	6.8	6.8	6.1	SY35
SakSTAR(E65Q,T71S,K74Q,K130T,K135R)	12	210	6.2	1.1	1.8	10	1.1	3.1	1.9	5.0	6.8	2.1	6.8	6.8	6.1	SY65
SakSTAR(E65Q,K74Q,K75A,K130T,K135R)	16	46	3.7	6.8	6.8	6.8	6.8	1.0	1.9	1.2	3.4	2.6	6.8	6.8	6.1	SY66
SakSTAR(E65Q,K74Q,K75D,K130T,K135R)	35	67	7.0	6.8	6.8	6.8	6.8	3.1	5.4	4.9	6.6	2.5	6.8	6.8	6.1	SY67
SakSTAR(K74Q,K130T,K135R,K137A)	19	78	4.3	2.4	4.0	2.7	5.6	2.0	9.6	7.5	5.6	2.2	6.8	6.8	6.1	SY68
SakSTAR(K74Q,K130A,K135R)	28	240	5.6	5.4	0.5	7.5	5.3	2.1	8.1	1.4	6.1	2.4	6.8	6.8	6.1	SY36
SakSTAR(E65Q,K74Q,K130A,K135R)	90	130	6.0	1.4	2.4	1.5	1.7	9.0	7.3	5.8	6.3	2.1	6.8	6.8	6.1	SY69
SakSTAR(K74Q,K130E,K135R)	46	300	4.1	4.4	0.8	6.6	3.8	1.8	8.5	7.6	5.2	2.2	6.8	6.8	6.1	SY57
SakSTAR(E65Q,K74Q,K130A,K135A)	88	170	5.1	8.0	1.7	7.7	1.1	1.6	3.4	5.8	6.2	2.4	6.8	6.8	6.1	SY70
SakSTAR(K74Q,K130E,V133R,K135R)	68	170	4.5	4.9	0.4	6.0	5.2	9.0	4.9	4.3	5.6	2.4	6.8	6.8	6.1	SY36
SakSTAR(E65Q,K74Q,T90A,K130A,K135R)	16	170	6.2	1.1	1.8	1.2	1.4	7.1	2.5	3.8	6.0	6.8	6.8	6.1	6.9	SY71

Tabelle 6 - Fortsetzung: Kombinationsmutanten von SakSTAR(K130T,K135R) mit K35A, C36R, E65X,K74X und ausgewählten anderen Aminosäuren

Name	Exp. mg/L	Spez. Akt. IU/mg	Hir-DNA										Subpool C		Code
			Epilopäster I		Epilopäster II		Epilopäster III		Epilopäster IV		Epilopäster V		Pool 10	Subpool C	
			17C1	16A7	10A7	18B17	12C10	18B17	12C10	18B17	12C10	18B17	12C10	18B17	
SakSTAR(E65Q,K74Q,N95A,K130A,K135R)	70	110	61	12	19	17	15	10	33	58	67	23	60	29	572
SakSTAR(E65Q,K74Q,E118A,K130A,K135R)	86	110	193	18	26	15	22	11	41	17	73	26	56	28	573
SakSTAR(E65Q,K74Q,N95A,E118A,K130A,K135R)	33	140	16	18	24	17	21	20	39	61	66	23	48	37	574
SakSTAR(N95A,K130A,K135R)	83	410	63	13	11	18	13	37	59	96	68	23	93	81	INT1
SakSTAR(K135A,E65Q,K74Q,K130A,K135R)	29	110	NT										49	26	575
SakSTAR(K135A,H18R,E65Q,K74Q,K130A,K135R)	14	14	NT										48	23	576
SakSTAR(L15Q,K74Q,S101A,K130A,K135R)	1	90	57	15	25	14	10	80	22	39	63	23	55	27	577
SakSTAR(L15A,K135A,E65Q,K74Q,K130A,K135R)	110	110	21										50	26	578
SakSTAR(L15A,E65Q,K74Q,K130A,K135R)	389	110	21										52	31	579
SakSTAR(L15A,E65Q,K74Q,K130A,K135R)	126	110	21										57	24	580
SakSTAR(E65Q,K74Q,K109A,K130T,K135R)	40	110	73	15	21	12	12	14	23	40	58	23	50	22	581
SakSTAR(E65Q,K74Q,E108A,K109A,K130T,K135R)	126	110											51	24	582
SakSTAR(E65Q,K74Q,E108A,K109A,K130T,K135R)	62	110	93	13	14	13	17	17	30	41	68	23	55	21	583
SakSTAR(E65Q,K74Q,K121A,K130T,K135R)	73	150	57	15	15	11	14	22	31	46	12	68	61	25	585
SakSTAR(E65Q,K74Q,K121A,K130T,K135R)	3	3	NT										51	27	586
SakSTAR(E65Q,K74Q,D115A,K130T,K135R)	57	57	NT										52	35	587
SakSTAR(G16R,E65A,K74Q,K130A,K135R)	48	100	76	29	14	11	14	42	19	17	43	11	44	17	590
SakSTAR(E65Q,K74Q,N95A,E118A,K130A,K135R,K137A)	126	126											45	30	591
SakSTAR(E65Q,K74Q,N95A,E118A,K130A,K135R,K137A)	1,406	1,406											57	16	594

Assoziationskonstanten ≥ 10 -fach niedriger und Antikörperabsorption ≤ 60 Prozent von Wildtyp-SakSTAR sind fett dargestellt;
ist fett dargestellt. NT: nicht getestet

$\geq 100\ 000$ HLU/mg

Tabelle 7: Kombinationsmutanten von SakSTAR(E80A,D82A,K130T,K135R) mit K35A, G36R, E65X, K74X und ausgewählten anderen Aminosäuren

Variante	Exp (mg/mL)	Spex. Akt. (U/mg)	Mass-Action										SakSTAR(E80A,D82A,K130T,K135R)		Code
			Ergänz. cluster I		Ergänz. cluster II		Ergänz. cluster III		Ergänz. cluster IV		Ergänz. cluster V		Post 10	Post 10	
			TTG17	78A	30A	78T	30G	TTG17	78A	30A	78T	30G	TTG17	78A	
SakSTAR(E80A,D82A,K130T,K135R)	20	230	8.2	17	1.3	1.1	1.1	18	4.1	11	5.5	1.5	<0.1	<0.1	SY6
SakSTAR(K74R,E60A,D82A,K130T,K135R)	4	220	5.3	11	2.8	1.5	1.1	14	8.4	21	5.9	1.8	<0.1	<0.1	SY7
SakSTAR(K74Q,E60A,D82A,K130T,K135R)	27	110	5.1	6.5	1.2	7.9	7.3	18	6.4	19	4.6	1.7	<0.1	<0.1	SY15
SakSTAR(K35A,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)	70	100	6.9	6.7	6.4	2.7	1.4	19	16	8.2	9.0	1.8	<0.1	<0.1	SY17
SakSTAR(E65D,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)	22	140	6.4	5.1	2.9	4.6	2.1	11	11	3.7	1.4	1.8	<0.1	<0.1	SY19
SakSTAR(E65S,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)	1	110	1.2	1.2	4.6	4.1	1.5	19	5.0	1.5	6.6	1.4	<0.1	<0.1	SY20
SakSTAR(E65T,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)	10	94	7.2	9.1	9.9	5.6	3.2	11	15	8.2	11	2.6	<0.1	<0.1	SY21
SakSTAR(E65A,K74R,G36R,K74R,K130T,K135R)	250		5.0	5.4	2.9	1.8	2.5	16	6.5	1.8	5.5	1.9	<0.1	<0.1	SY10
SakSTAR(E65A,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)	40	140	8.2	10	1.3	5.7	5.5	14	2.2	11	1.5	2.7	<0.1	<0.1	SY18
SakSTAR(E65N,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)	88	120	16.5	1.2	1.1	7.0	1.6	11	13	12	7.9	2.4	<0.1	<0.1	SY21
SakSTAR(E65Q,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)	55	140	9.0	16	16	9.9	5.9	18	4.5	4.3	10	2.5	<0.1	<0.1	SY22
SakSTAR(K35A,E65A,E61A,E80A,D82A,K130T,K135R)	24	110	2.4	17	2.9	1.3	1.2	16	7.8	16	4.3	1.6	<0.1	<0.1	SY13
SakSTAR(E65A,A73S,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)	92	62	8.2	7.1	1.6	8.4	1.9	10	11	1.1	3.6	1.1	<0.1	<0.1	SY33
SakSTAR(E65Q,K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)	84	110	1.0	1.9	2.0	4.1	7.2	7.9	2.8	14	6.8	2.2	<0.1	<0.1	SY30
SakSTAR(E65Q,K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)	54	120	5.1	16	3.2	1.4	1.7	16	20	2.4	3.7	1.7	<0.1	<0.1	SY47
SakSTAR(K35A,E65D,K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)	56	148	5.1	6.8	2.6	9.5	1.7	2.8	1.7	14	8.1	2.1	<0.1	<0.1	SY40

Tabelle 7 - Fortsetzung: Kombinationsmutanten von SakSTAR(E80A,D82A,K130T,K135R) mit K35A, G36R, E65X, K74X und ausgewählten anderen Aminosäuren

E-9 mg/mL	Epoet. Akt. [10 ⁴ U/mg]	Epoetide I					Hemm-Akt. Epoetide II					Epoetide III					SakSTAR-Plasmidempfindlichkeit					Code
		170T11	26A7	30A7	3817	3010	18F17	12R5	28H1	7102	7103	7117	72E1	70E8	70C4	7A10	Post-TO	Support-8	Support-C	Post-40		
12	160	19	22	38	14	41	26	69	71	50	77	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	67	70	69	70	SY28		
9.0	89	3.8	10	20	26	10	13	16	13	12	18	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	55	10	61	47	SY12		
20	91	6.4	20	30	15	19	22	17	24	24	19	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	44	8	70	53	SY12		
1	140	8.1	9.7	6.4	4.4	39	19	31	31	14	21	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	52	11	69	-	SY11		
4.2	84	3.5	18	3.3	14	16	18	12	22	10	13	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	43	6	61	50	SY36		
60	130	9.3	6.6	6.8	4.2	28	11	12	12	17	23	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	56	10	64	53	SY17		
28	87	4.5	12	3.3	11	17	22	13	30	49	16	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	40	14	51	40	SY34		
60	100	6.8	5.8	3.4	4.5	13	33	32	14	19	20	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	46	28	67	45	SY15		
170	170	NT														45	21	60	43	SY304		
68	86	1.4	20	5.5	15	13	13	22	6.4	6.7	19	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	36	7	60	55	SY40		
72	120	6.1	3.4	2.5	3.0	39	18	14	9.8	6.8	19	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	49	16	64	48	SY28		
34	198	5.1	7.5	6.9	5.5	33	17	34	14	17	23	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	56	28	68	55	SY19		
13	33	0.7	2.1	3.1	17	23	47	19	19	5.1	20	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	53	20	18	62	SY61		
11	61	1.0	1.5	3.1	10	12	27	12	11	6.7	23	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	56	18	79	60	SY62		
23	23	0.9	2.7	3.8	22	20	29	6.6	9.7	5.4	21	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	56	17	91	60	SY64		

Assoziationskonstanten ≥ 10 -fach niedriger und Antikörperabsorption ≤ 60 Prozent von Wildtyp-SakSTAR sind fett dargestellt;
ist fett dargestellt. NT: nicht getestet.

$\geq 100\,000$ HU/mg

Tabelle 8: SakSTAR -Varianten mit intakter spezifischer Aktivität (≥ 100 kHU/mg) und ≤ 50 Prozent Absorption von Humanantikörpern, ausgelöst durch Behandlung mit Wildtyp- SakSTAR

Variante	Spez. Akt. (kU/mg)	SakSTAR-Patientenplasma				Code
		Pool 10	Subpool B	Subpool C	Pool 40	
SakSTAR(K74Q,K130T,K135R)	190	50	25	67	62	SY41
SakSTAR(E65A,K74Q,K130T,K135R)	170	45	16	77	55	SY48
SakSTAR(E65Q,T71S,K74Q,K130T,K135R)	210	49	21	64	59	SY65
SakSTAR(E65Q,K74Q,E118A,K130A,K135R)	180	50	28	72	58	SY73
SakSTAR(E65Q,K74Q,N95A,E118A,K130A,K135R)	190	48	27	74	58	SY74
SakSTAR(K35A,E65Q,K74Q,K130A,K135R)	110	49	26	63	45	SY75
SakSTAR(E65Q,K74Q,K109A,K130T,K135R)	210	50	22	68	51	SY81
SakSTAR(K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)	110	46	17	60	48	SY15
SakSTAR(E65D,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)	140	43	11	68	57	SY19
SakSTAR(E65S,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)	110	35	12	60	-	SY20
SakSTAR(E65D,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R,K136A)	100	46	28	67	45	SY35
SakSTAR(K35A,K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)	120	49	16	64	48	SY28
SakSTAR(E65D,K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)	110	43	13	64	42	SY30
SakSTAR(E65Q,K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)	120	43	21	64	42	SY47
SakSTAR(E65Q,K74Q,D82A,S84A,K130T,K135R)	170	45	21	60	45	SY50N
SakSTAR(K35A,E65D,K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)	140	35	8	58	40	SY46
SakSTAR(T21A,K35A,E65Q,K74Q,K130A,K135R)	110	50	26	72	50	SY78
SakSTAR(E65Q,K74Q,K109A,K121A,K130A,K135R)	140	50	31	73	52	SY88
SakSTAR(E65Q,K74Q,D82A,S84A,K109A,K130A,K135R)	180	43	20	62	44	SY89

Tabelle 8 - Fortsetzung: SakSTAR-Varianten mit Intakter spezifischer Aktivität (≥ 100 kHU/mg) und ≤ 50 Prozent Absorption von Humanantikörpern, ausgelöst durch Behandlung mit Wildtyp- SakSTAR

Variante	Spez. Akt. (kU/mg)	SakSTAR-Patientenplasma			
		Pool 10	Subpool B	Subpool C	Pool 40
SakSTAR(E65Q.K74Q.N95A.E118A.K130A.K135R.V137A)	120	45	30	74	60
SakSTAR(E65Q.K74Q.N95A.E118A.K130A.K135R.K136A.V137K)	1400	37	16	70	54
SakSTAR(E65Q.K74Q.D82A.S84A.E108A.K109A.K130A.K135R)	110	46	26	63	41
Antikörperabsorption ≤ 60 Prozent von Wildtyp-SakSTAR sind fett dargestellt;		$\geq 100\ 000$ HU/mg ist fett dargestellt.			
					Code
					SY93
					SY94
					SY95

Tabelle 9: Fibrinolytische Eigenschaften ausgewählter SakSTAR-Varianten in Humanplasma in vitro

Verbindung	Fibrinolytische Wirksamkeit (C50 in µg/mL)	Restliches Fibrinogen bei C50 (%, der Grundlinie)	Fibrinogenolytische Wirksamkeit (C50 in µg/mL)	Code
SakSTAR	0.18 ± 0.01	93 ± 3.5	24 ± 3.6	
SakSTAR(K74Q,F80A,D82A,K130T,K135R)	0.15 ± 0.01	97 ± 3.0	14 ± 3.2	SY15
SakSTAR(E65D,K74R,F80A,D82A,K130I,K135R)	0.24 ± 0.04	94 ± 1.0	29 ± 3.1	SY19
SakSTAR(K35A,E65D,K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)	0.11 ± 0.01	92 ± 3.0	20 ± 2.0	SY46
SakSTAR(E65Q,K74Q,N95A,E118A,K130A,K135R,K136A,∇137K)	0.13	91		SY93

Die Daten sind Mittelwert ± Standardabweichung von 3 Experimenten.
 C₅₀: Menge von Wildtyp- oder Varianten-SakSTAR, die für 50% Gerinnung oder 50% Fibrinogenabbau in 2 Std. nötig ist.

Tabelle 10: Pharmakokinetische Parameter der DispositivStaphylokinase-Inase-bezogenem Antigen aus Plasma nach Bolusinjektion von SakSTAR Varianten (100 µg/kg) in Hamstern.

Variante	C ₀ (µg/mL)	A (µg/mL)	B (µg/mL)	t _{1/2} (α) (min)	t _{1/2} (β) (min)	VC (mL)	AUC (µg·min·mL ⁻¹)	Cl _p (mL·min ⁻¹)
SakSTAR	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.0	2.8	7.0	13 ± 1.0	4.6 ± 0.4	2.2 ± 0.2
SakSTAR(K7Q.E80A.D82A.K130T.K135R)	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0	2.0	10	20 ± 2.2	2.5 ± 0.3	4.1 ± 0.5
SakSTAR(E65D.K7J.R.E80A.D82A.K130T.K135R)	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.0	10	16 ± 1.1	2.8 ± 0.2	3.7 ± 0.3
SakSTAR(K35A.E65DK7Q.E80A.D82A.K130T.K135R)	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.1 ± 0.0	2.0	24	9.6 ± 0.7	6.4 ± 0.5	1.6 ± 0.1

Daten sind Mittelwert ± SEM von 4 Experimenten.

Tabelle II: Grundlinieneigenschaften und Behandlungsergebnis der Patienten mit peripherem Arterienverschluss, die mit sakSTAR, sakSTAR(K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R) oder sakSTAR(E65D,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R) behandelt wurden

Verbindung Patienten-ID	Geschlecht	Alter (Jahre)	Klinische Ischämie	Ort des Verschlusses	Verschlusses (Länge)	Verschlusses (cm)	Rekanalisierung durch Thrombolyse	Thrombolyse (mg)	Gesamtdauer der Infusion (Std.)	Zusätzliche Therapie
sakSTAR										
PUT	M	66	Subakut	Femoro-femorale-Transplantat	0	5	vollständig	2	23	Stent linke IF-Arterie
VERA	M	73	Akut	Rechte PA	2	6	partiell	13	23	Amputation linkes oberes Bein
GEIV	V	63	Restschmerz	Linke SFA	10	5	vollständig	8	7	PTA
POL	M	46	Subakut	Rechte SFA	30	50	partiell	22	29	Lumbal-Sympathektomie
BUE	F	51	Hinken	Rechtes AF-Transplantat	1	15	vollständig	10	13	Desobstruktion
VII	F	75	Subakut	Linkes FT-Transplantat	2	34	vollständig	7	10	PTA
REN	M	48	Restschmerz	Rechtes IF-Transplantat	4	20	vollständig	6,5	5	Linkes AF-Transplantat
COR	V	78	Akut	Linke AFS	14	9	vollständig	4	3	PTA
MAN	M	67	Restschmerz	Linke Arteria tibialis	1	6	partiell	6	5	.
STRA	M	66	Hinken	Rechtes FP-Transplantat	14	16	vollständig	19	26	.
VANH	M	38	Akut	Linke Arteria radialis	4	1	vollständig	6	5	.
VANW	F	57	Akut	Rechtes FP-Transplantat	1	25	vollständig	20	24	neues rechtes FP-Transplantat
BRA	M	57	Akut	Linkes FT-Transplantat	1	30	vollständig	25	43	PTA + Stent
DON	M	60	Hinken	Linkes FT-Transplantat	1	20	vollständig	11	19	FF-Transplantat
CAM	M	77	Restschmerz	Rechtes SFA-Transplantat	8	30	vollständig	27	44	PTA + Stent
Mittelwert ± SEM		62 ± 3,7			6,6 ± 2,1	18 ± 3,5		13 ± 2,1		FF-Transplantat
sakSTAR(K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)										
INB	M	66	Hinken	Linke SFA	30	5	vollständig	24	24	PTA
AZY	M	44	Subakut	Rechte CIA	7	8	vollständig	18	23	Stent
VIN	M	51	Akut	Rechte CIA	5	70	vollständig	24	30	.
STRO	M	53	Hinken	Linke FP-Verbindung	14	5	partiell	3,5	2	Aspirationsthorombektomie, PTA
VERG	M	62	Restschmerz	Linke SFA	20	6	vollständig	19	25	FP-Bypass
GIE	M	76	Akut	Rechter FP-Bypass	2	15	vollständig	8,5	17	.
Mittelwert ± SEM		59 ± 4,7			13 ± 4,3	18 ± 10		16 ± 3,4		
sakSTAR(E65D,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)										
URB	M	57	Subakut	Rechte CIA	4	8	vollständig	8	6	Pseudoaneurysma, rechtes AF-Transplantat
CON	M	59	Restschmerz	Rechtes AF-Transplantat	7	85	vollständig	16	22	Revision
IIAC	M	70	Restschmerz	Linke Arteria tibialis anterior	1	15	vollständig	12	14	.
DEW	F	76	Restschmerz	SFA	21	6	vollständig	6	4	.
VAI	F	65	Subakut	Linke PA	25	16	partiell	8	6	Aspirationsthorombektomie
FIL	M	76	Hinken	Rechte SFA	28	8	vollständig	24	31	PTA
Mittelwert ± SEM		67 ± 3,4			15 ± 4,3	19 ± 9,4		12 ± 2,8		

AF: aorto-femorale; CABG: Koronararterien-Bypass-Transplantat; CAD: Koronarterienkrankung; CIA: Arteria iliaca communis; COPI: chronische Lungenverschlusserkrankung; DM: Diabetes mellitus; EIA: Arteria iliaca externa; FF: femorofemorale; FP: femoropopliteale; FT: femorotibiale; IA: Arteria iliaca interna; IF: iliofemorale; PA: Arteria poplitea; PTA: perkutane transluminale Angioplastie; SFA: Arteria femoralis superficialis; TA: Arteria tibialis; TF: tibiofemorale; TC: tibiofibuläre.

Tabelle 12: Absorption mit SakSTAR-Varianten von Antikörpern, die mit SakSTAR-K-Varianten in Patienten mit peripherem Arterienverschluss aufgelöst wurden

Behandlung	Absorptionsmittel	Unlöslich gemachte Verbindung		
		SakSTAR	SakSTAR(K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)	SakSTAR(E65D,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)
SakSTAR (Pool 40)				
SakSTAR		95		
SakSTAR(K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)		48		
SakSTAR(E65D,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)		57		
SakSTAR(K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R) (Inhib., Vm., Ver., Gie.)				
SakSTAR		94	95	95
SakSTAR(K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)		91	93	89
SakSTAR(E65D,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)		92	94	94
SakSTAR(E65D,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R) (Urb.)				
SakSTAR		90	88	85
SakSTAR(K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)		94	95	94
SakSTAR(E65D,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)		94	95	94

Daten sind der Mittelwert der prozentualen Absorption mit 250 nM Absorptionsmittel, durch die restliche Bindung an unlöslich gemachte Verbindung gemessen.

Tabelle 13: Additive Substitutionsmutagenese von SakSTAR(E65Q, K74Q, K130T, K135R) mit ausgewählten anderen Aminosäuren

Variante	Spez. Akt. (kU/mg)	Antikörper- absorption (Prozent)	Code
SakSTAR(E65Q, K74Q, K130T, K135R)	150	65	SY49
SakSTAR(E65Q, K74Q, D82A, S84A, K130T, K135R)	170	45	SY50
SakSTAR(E65Q, K74Q, T90A, E99D, T101S, K130A, K135R)	410	51	SY98
SakSTAR(E65Q, K74Q, E108A, K109A, K130T, K135R)	180	50	SY83
SakSTAR(E65Q, K74Q, D82A, S84A, E108A, K109A, K130T, K135R)	110	41	SY95
SakSTAR(E65Q, K74Q, D82A, S84A, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, V137K)	1.500	30	SY118
SakSTAR(E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, V137K)	2.900	28	SY128
SakSTAR(K135A, E65Q, K74Q, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, V137K)	3.700	24	SY141
SakSTAR(K135A, E65Q, K74R, D82A, S84A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R, K136A, V137K)	5.700	31	SY145

Spez. Akt. ≥ 100 kU/mg ist fett dargestellt. Absorption von Antikörpern (in Prozent) von vereinigttem Plasma immunisierter Patienten; Werte $\leq 60\%$ sind fett dargestellt.

Tabelle 14: Fibrinolytische Eigenschaften von SakSTAR -Varianten in Humanplasma in vitro

Verbindung	Fibrinolytische Wirksamkeit (C50 in µg/ml)	Restliches Fibrinogen bei C50 (% der Grundlinie)	Fibrinogenolytische Wirksamkeit (C50 in µg/ml)	Code
SakSTAR	0.18 ± 0.01	93 ± 3.5	24 ± 3.6	
SakSTAR(E65Q,K74Q,D82A,S84A,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K)	0.15 ± 0.02	90 ± 5.0	14 ± 1.0	SY118
SakSTAR(K33A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K)	0.17 ± 0.01	87 ± 3.0	7 ± 0.6	SY141
SakSTAR(K33A,E65Q,K74R,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K)	0.19 ± 0.01	82 ± 3.0	7 ± 0.9	SY145

Die Daten sind Mittelwert ± Standardabweichung von 3 Experimenten.
C50 Menge von Wildtyp- oder Varianten-SakSTAR, die für 50% Gerinnselolyse oder 50% Fibrinogenabbau in Abwesenheit von Fibrin in 2 Std. nötig sind.

Tabelle 15:

Eigenschaften der Patienten mit peripherem Arterienverschluss, die mit SukSTAR(K137K), SukSTAR(K35A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K), SukSTAR(K135R,K136A,V137K) oder SukSTAR(K35A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) behandelt wurden

Verbindung Patienten-Id.	Go- schlecht (Jahre)	Klinische Ischämie	Relevante Anamnese	Gegenwärtiges Rauchen	Ort des Verschlusses	Alter des Verschlusses (Tage)	Länge des Verschlusses (cm)
SukSTAR(E65Q,K74Q,D82A,S84A,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K)(SY118)							
VCL	M	69	Akut	Hypertonie, ischämische Herzkrankung ABF-Transplantat	Linkes AF-Transplantat	10	14
REN	M	76	Subakut	Hypertonie, ischämische Herzkrankung ABF-Transplantat	Rechte PA	18	14
HOL	M	69	Akut	Hypertonie, Hypercholesterinämie rechter Bypass	Rechter FT-Bypass	16	30
PAR	M	79	Schmerz, Schwellung		Vena poplitealis bis femoralis	50	80
FRA	M	60	Subakut	ischämische Herzkrankung, linkes FP-Transplantat	Linkes FP-Transplantat	30	14
MAC	V	73	Akut	Hypertonie, ABF-Transplantat	Linker-Ast-ABF-Transplantat	20	10
Mittelwert $\pm$ SEM			71 $\pm$ 2.7			21 $\pm$ 6.9	11 $\pm$ 1.8
SukSTAR(K35A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K)(SY141)							
VERH	F	52	Linken	Hypertonie, Hypercholesterinämie rechte IF-Endoprothese	Rechte IA	14	12
DUB	M	54	Linken	Hypertonie, Stent linke, rechte IA	Rechte EIA	30	18
VAP	M	46	Linken	Hypertonie, Hypercholesterinämie Stent linke - rechte IA	Aortenbifurkation	21	25
WYN	M	43	Linken	CAD: Hypercholesterinämie, Stent linkes FP-Transplantat	Linkes FP-Transplantat	50	30
HOR	M	57	Akut	Hypertonie, linkes FP-Transplantat	Linke CIA, linkes FP-Transplantat	70	>60
AND	M	75	Akut	Diabetes, Hypertonie, Herz- klappenersatz	Linke SF-Arterie	30	10
Mittelwert $\pm$ SEM			55 $\pm$ 4.6			13 $\pm$ 4.3	19 $\pm$ 3.5
SukSTAR(K35A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K)(SY145)							
LIN	F	48	Rechtschmerz	Hypertonie, ischämische Herzkrankung	Rechte SF-Arterie	70	16
DEL	M	68	Linken	Hypertonie	Linke PA	21	60
LAM	M	71	Akut	FP-Transplantat	Rechtes FP-Transplantat	70	26
BAS	M	64	Akut	ABF-Transplantat, ischämische Herzkrankung, Hypertonie	Rechte SFA	30	60
TOU	M	68	Akut	ischämische Herzkrankung, Hypertonie	Rechte PA	10	60
Mittelwert $\pm$ SEM			64 $\pm$ 4.1			7.8 $\pm$ 3.3	12 $\pm$ 4.0

ABF: Aortobifemorale, AF: aortofemorale, CABG: Koronararterien-Bypass-Transplantat, CAD: Koronararterienkrankung, CIA: Arteria iliaca communis, COPD: chronische obstruktive Lungenerkrankung, DM: Diabetes mellitus, EIA: Arteria iliaca externa, FF: femorofemorale, FP: femoropopliteale, FT: femorotibiale, IA: Arteria iliaca, IF: iliofemorale, PA: Arteria poplitea, SF: Arteria femoralis superficialis, TF: tibiofemorale, AMI: akuter Myokardinfarkt.

Tabelle 16: Behandlung und Ergebnis bei Patienten mit peripherem Arterienverschluss, die mit SakSTAR(E65Q,K74Q,D82A,S84A,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K), SakSTAR(K35A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) or SakSTAR(K35A,E65Q,K74R,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) behandelt wurden

Verbindung Patienten-Id.	Rekanalisierung durch Thrombolysse	Gesamtdosis des Thrombolytikums (mg)	Gesamtdauer der Infusion (Std.)	Zusätzliche Therapie	Komplikationen und Bemerkungen
SakSTAR(E65Q,K74Q,D82A,S84A,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) (SY118)					
VCL	vollständig	17	22	keine	Hämatom an Punktionsstelle
REN	vollständig	24	22	keine	Hämatom an Punktionsstelle
HOL	vollständig	14	9,0	keine	keine
PAR	partiell (normal durchgängig mit restlichen Thrombi nach erster Kontrolle)	10	6,0	.	kleines subdurales Hämatom
FRA	vollständig	24	22	neues FP-Transplantat	keine
MAC	vollständig	8,0	6,0	keine	Hirnstammhämorrhagie, Tod
Mittelwert $\pm$ SEM		$16 \pm 2,8$	$15 \pm 3,4$		
SakSTAR(K35A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) (SY141)					
VERH	vollständig	15	18	Femorofemorale Crossover	
DUB	vollständig	6,0	4,0		
VAP	vollständig	14	22	Stent, bilateraler I.A.-Stent	Hämatom an Punktionsstelle
WYN	vollständig	23	29	FP-Transplantatstößung	keine
HOR	vollständig	10	8,0	keine	keine
AND	vollständig	13	17	keine	Retropertoneales Hämatom, starb an Sepsis
Mittelwert $\pm$ SEM		$14 \pm 2,3$	$16 \pm 3,7$		
SakSTAR(K35A,E65Q,K74R,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) (SY145)					
LIN	vollständig	14	34	keine	Retropertoneales Hämatom, Hämmorrhagien
DEL	vollständig	7,0	5,0	keine	keine
LAM	vollständig	23	30	keine	Hämatom an Punktionsstelle
BAS	vollständig			keine	
TOU	vollständig			keine	
Mittelwert $\pm$ SEM		$15 \pm 4,6$	$20 \pm 7,5$		

PTA: perkutane transluminale Angioplastie; IF: iliofemorale; FT: femorofemorale; FP: femoropopliteale

Tabelle 17: Neutralisierende Antikörperaktivität vor und nach Verabreichung von SakSTAR(E65Q,K74Q,D82A,S84A,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A, V137K), SakSTAR(K135A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) or SakSTAR(K135A, E65Q,K74R,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) bei Patienten mit peripherem Arterienverschluss

Verbindung
Patienten-Id.

	Vorher		3 Wochen		4 Wochen	
	SakSTAR(E65Q,K74Q,D82A,S84A,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) (SY118)	SakSTAR(K135A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) (SY118)	SakSTAR(E65Q,K74Q,D82A,S84A,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) (SY118)	SakSTAR(K135A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) (SY118)	SakSTAR(E65Q,K74Q,D82A,S84A,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) (SY118)	SakSTAR(K135A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) (SY118)
VCL	0.2	46	50	0.9	18	15
REN	0.1	1.6	22	19	39	MAC
HOL	0.2	19	15	0.0	0.15	19
PAR	0.1	19	15	0.0	0.15	19
FRA	1.2	15	0.0	0.15	19	18
MAC	0.0	0.0	0.15	19	18	18
Mittelwert	0.15	19	18	0.15	19	18

SakSTAR(K135A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) (SY141)	VERH	0.2	0.3	0.2	0.2	1.1
	DUB	0.2	4.3	2.0	0.0	5.6
	VAP	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	WYN	0.2	10	0.1	0.0	100
	HOR	0.2	0.1	0.0	0.0	100
	AND	0.8	0.3	0.3	0.3	1.1
Mittelwert		0.2	0.3	0.3	0.3	1.1

SakSTAR(K135A,E65Q,K74R,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K) (SY145)	LIN	0.0	5.5	3.8	3.8	3.8
	DEL	0.2	1.6	1.9	1.9	1.9
	LAM	0.2	164	190	190	190
	BAS	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	TOU	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mittelwert		0.15	5.5	3.8	3.8	3.8

Tabelle 18: Immunogenität von SakSTAR-Varianten bei Patienten mit peripherem Arterienverschluss

	n	Neutralisierende Aktivität (µg/ml)	>5 µg/ml	Spezifisches IgG (µg/ml)	Code
SakSTAR	69	12 (4 - 100)	56	380 (81 - 1850)	.
SakSTAR(K74Q,E80A,D82A,K130T,K135R)	6	9.0 (0.1 - 23)	3	420 (31 - 730)	SY15
SakSTAR(E65D,K74R,E80A,D82A,K130T,K135R)	18	1.5 (0.2 - 7.0)	5	30 (24 - 100)	SY19
SakSTAR(E65Q,K74Q,D82A,S84A,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K)	6	27 (17 - 49)	5	2000 (1300 - 3600)	SY118
SakSTAR(K35A,E65Q,K74Q,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K)	6	0.7 (0.1 - 4.3)	2	7.7 (5.1 - 510)	SY141
SakSTAR(K35A,E65Q,K74R,D82A,S84A,T90A,E99D,T101S,E108A,K109A,K130T,K135R,K136A,V137K)	3	4.7	1	.	SY145

Daten sind Mittelwert und 15-85-Perzentilbereich.

Tabelle 19: Cystein-Substitutionsvarianten von SakSTAR

Variante	Spez. Akt. (kU/mg)	Dimerisierungsgrad (%)	PEG-Derivatisierung	Gerinnsel- lyse <i>in vitro</i> (C ₅₀ in µg/ml)	t1/2(α) (min)	Clp (ml/min)	Antikörper- absorption (Pool 40, %)
SakSTAR	130	0	keine	0.33	2.0	2.2	95
SakSTAR (K102C)	143	0	keine	0.29	nd	nd	95
SakSTAR (K102C-PEG)	108	0	I	0.60	3.0	0.32	
SakSTAR (K109C) monomer	100	0	keine	0.52	nd	nd	
SakSTAR (K109C) dimer	1.650	>60	keine	0.17	3.6	0.52	90
	2.235	>95	keine	0.12	nd	nd	

Tabelle 20: Cystein-Substitutionsvarianten von SakSTAR mit verringerter Immunogenität, die mit Maleimid-Polyethylenglycol substituiert sind

Code	Spezifische Aktivität (kU/mg)	Fibrinolytische Wirksamkeit		Cp (ml/min)	Antikörperabsorption P40 (%)
		Humanplasma (C ₅₀ µg/ml)	Hamster Bolus (C ₅₀ µg/kg)		
	130	0.23	120	2.2	95
SakSTAR					
SY19	140	0.24		3.7	57
SY19(S3C-SP5)	51	0.37	42	0.45	58
SY19(S3C-MP5)	20	0.65		0.28	50
SY19(S2C-SP5, S3C-SP5)	43	0.42	20	0.15	57
SY19(S3C-P20)	60	0.70	18	0.085	57
SY19(S3C-P10)	17	0.56	20	0.19	51
SakSTARIK35A, E85Q, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R					
SY141	3.700	0.19		0.95	24
SY141(S3C-SP5)	1.200	0.24	12		18
SY141(S2C-SP5, S3C-SP5)	1.400	0.28			18
SY161(S3C-MP5)	65	0.33	6	0.08	32
SY161(S3C-P20)	71	0.36	15	0.56	35
SY161(S3C-P10)	66	0.40	9	0.15	38
SY161(S3C-P20)	155	0.32	8	0.04	44

*SP5: OPSS-PEG 5 kDa, MP5: NAL-PEG 5 kDa, PIU: NAL-PEG 10 kDa, P20: MAL-PEG 20 kDa

LITERATUR

1. Lack CH: Staphylokinase: an activator of plasma protease. Nature 161: 559, 1948.
2. Lewis JH, Ferguson JH: A proteolytic enzyme system of the blood. III. Activation of dog serum profibrinolysin by staphylokinase. Am J Physiol 166: 594, 1951.
3. US 5336495 (erteilt am 08.09.94).

4. Vanderschueren S, Barrios L, Kerdsinchai P, Van den Heuvel P, Hermans L, Vrolix M, De Man F, Benit E, Muyldermans L, Collen D, Van de Werf F: A randomized trial of recombinant staphylokinase versus alteplase for coronary artery patency in acute myocardial infarction. *Circulation* 92: 2044-2049, 1995.
5. Sako T, Sawaki S, Sakurai T, Ito S, Yoshizawa Y, Kondo I: Cloning and expression of the Staphylokinase gene of *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. *Molec Gen Genet* 190: 271-277, 1983.
6. Behnke D, Gerlach D: Cloning and expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus sanguis* of a gene for staphylokinase – a bacterial plasminogen activator. *Molec Gen Genet* 210: 528-534, 1987.
7. Collen D, Silence K, Demarsin E, De Mol M, Lijnen HR: Isolation and characterization of natural and recombinant staphylokinase. *Fibrinolysis* 6: 203-213, 1992.
8. Sako T, Tsuchida N: Nucleotide sequence of the staphylokinase gene from *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 11: 7679-7693, 1983.
9. Collen D, Zhao ZA, Holvoet P, Marynen P: Primary structure and gene structure of staphylokinase. *Fibrinolysis* 6: 226-231, 1992.
10. Sakai M, Watanuki M, Matsuo O: Mechanism of fibrin-specific fibrinolysis by staphylokinase: participation of α_2 -plasmin inhibitor. *Biochem Biophys Res Comm* 162: 830-837, 1989.
11. Matsuo O, Okada K, Fukao H, Tomioka Y, Ueshima S, Watanuki M, Sakai M: Thrombolytic properties of staphylokinase. *Blood* 76: 925-929, 1990.
12. Lijnen HR, Van Hoef B, De Cock F, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Collen D: On the mechanism of fibrin-specific plasminogen activation by staphylokinase. *J Biol Chem* 266: 11826-11832, 1991.
13. Lijnen HR, Van Hoef B, Matsuo O, Collen D: On the molecular interactions between plasminogen-staphylokinase, α_2 -antiplasmin and fibrin. *Biochim Biophys Acta* 1118: 144-148, 1992.
14. Silence K, Collen D, Lijnen HR: Interaction between staphylokinase, plasmin(ogen) and α_2 -antiplasmin. Recycling of staphylokinase after neutralization of the plasmin-staphylokinase complex by α_2 -antiplasmin. *J Biol Chem* 268: 9811-9816, 1993.
15. Silence K, Collen D, Lijnen HR: Regulation by α_2 -antiplasmin and fibrin of the activation of plasminogen with recombinant staphylokinase in plasma. *Blood* 82: 1175-1183, 1993.
16. Sakharov DV, Lijnen HR, Rijken DC: Interactions between staphylokinase, plasmin(ogen), and fibrin. *J Biol Chem* 271: 27912-27918, 1996.
17. Schlott B, Ghys KH, Hartmann M, Rcker A, Collen D: Staphylokinase requires NH_2 -terminal proteolysis for plasminogen activation. *J Biol Chem* (in press).
18. Collen D, De Cock F, Vanlinthout I, Declerck PJ, Lijnen HR, Stassen JM: Comparative thrombolytic and immunogenic properties of staphylokinase and streptokinase. *Fibrinolysis* 6: 232-242, 1992.
19. Collen D, De Cock F, Stassen JM: Comparative immunogenicity and thrombolytic properties toward arterial and venous thrombi of streptokinase and recombinant staphylokinase in baboons. *Circulation* 87: 996-1006, 1993.
20. White H: Thrombolytic treatment for recurrent myocardial infarction. *Br Med J* 302: 429-430, 1991.
21. Gase A, Hartmann M, Ghys KH, Rcker A, Collen D, Behnke D, Schlott B: Functional significance of NH_2 - and COOH -terminal regions of staphylokinase in plasminogen activation. *Thromb Haemost* 76: 755-760, 1996.
22. EP 95200023.0 (6. Januar 1995) and US 08/499,092 (6. Juli 1995).
23. Schlott B, Hartmann M, Ghys KH, Birch-Hirschfeld E, Pohl HD, Vanderschueren S, Van de Werf F, Michoel A, Collen D, Behnke D: High yield production and purification of recombinant staphylokinase for thrombolytic therapy. *Bio/technology* 12: 185-189, 1994.
24. Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR: Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77: 61-68, 1989.
25. BIAcore-System Handbuch, 5-2, Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden.
26. Karlsson R, Michaelsson A, Mattsson L: Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods* 145: 229-240, 1991.
27. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual. 2. Aufl. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
28. Tartof KD, Hobbs CA: Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res Lab Focus* 9: 12, 1987.
29. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248, 1976.
30. Deutsch DG, Mertz ET: Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. *Science* 170: 1095-1096, 1970.
31. Collen D, Moreau H, Stockx L, Vanderschueren S: Recombinant staphylokinase variant with altered immunoreactivity. II. Thrombolytic properties and antibody induction. *Circulation* 94: 207-216, 1996.
32. Vanderschueren S, Stockx L, Wilms G, Lacroix H, Verhaeghe R, Vermeylen J, Collen D: Thrombolytic therapy of peripheral arterial occlusion with recombinant staphylokinase. *Circulation* 92: 2050-2057, 1995.
33. Gibaldi M, Perrier D. Pharmacokinetics, Marcel Dekker, New York, N. Y., 1983, 45-111.

34. Inada Y, Furukawa M, Sasaki H, Kodera Y, Hiroto M, Nishimura H, Matsushima A. Biomedical and biotechnological applications of PEG- and PM-modified proteins, TIBTECH 13: 86-91,1995.
35. Collen D, Bernaerts R, Declerck P, De Cock F, Demarsin E, Jenn S, Laroche Y, Lijnen HR, Silence K, Verstreken M. Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. I. Construction and characterization. Circulation 94: 197-206,1996.
36. Rabijns A, De Bondt HL, De Ranter C. Three-dimensional structure of staphylokinase, a plasminogen activator with therapeutic potential. Nature Struct Biol 4: 357-360,1997

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Leuven Research & Development VZW

<120> Identifikation, Produktion und Verwendung neuer
Staphylokinase-Derivate mit verringerter Immunogenität
und/oder verringerter Clearance

<130> leuvresdev102

<140> PCT/EP/00748

<141> 1999-02-04

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<400> 1

caggaaacag aattcaggag

20

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: mutagener
Primer LY58

<400> 2

caaaacagcc aagcttcatt cattcagc

28

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Selektions-
Primer LY34

<400> 3
caaaacagcc gagcttcatt cattcagc 28

<210> 4
<211> 41
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: mutagener
Primer LY58

<400> 4
ttcagcatgc tgcagttatt tctttctctgc aacaaccttg g 41

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer 818D

<400> 5
caaacagcca agcttcattc attcagc 27

<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Rückwärts-
Primer zur Konstruktion von K102C

<400> 6
tatgataaga attgcaaaaa agaagaa 27

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Vorwärts-Primer
zur Konstruktion von K102C

<400> 7

ttcttttttt ttgcaattct tatcata

2

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Rückwärts-
Primer zur Konstruktion von K109C

<400> 8

aaaaagaaga aacgtgctct ttcccta

2

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Vorwärts-Primer
zur Konstruktion von K109C

<400> 9

tagggaaaga gcacgtttct tcttttt

2

<210> 10

<211> 136

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus "

<400> 10

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Ala Ser
1 5 10 15

Tyr Phe Glu Pro Thr Gly Pro Tyr Leu Met Val Asn Val Thr Gly Val
20 25 30

Asp Ser Lys Gly Asn Glu Leu Leu Ser Pro His Tyr Val Glu Phe Pro
35 40 45

```

Ile Lys Pro Gly Thr Thr Leu Thr Lys Glu Lys Ile Glu Tyr Tyr Val
  50                      55                      60

Glu Trp Ala Leu Asp Ala Thr Ala Tyr Lys Glu Phe Arg Val Val Glu
  65                      70                      75                      80

Leu Asp Pro Ser Ala Lys Ile Glu Val Thr Tyr Tyr Asp Lys Asn Lys
          85                      90                      95

Lys Lys Glu Glu Thr Lys Ser Phe Pro Ile Thr Glu Lys Gly Phe Val
          100                      105                      110

Val Pro Asp Leu Ser Glu His Ile Lys Asn Pro Gly Phe Asn Leu Ile
          115                      120                      125

Thr Lys Val Val Ile Glu Lys Lys
  130                      135

```

Patentansprüche

1. Staphylokinase-Derivat, im wesentlichen mit der in **Fig. 1** gezeigten Aminosäuresequenz, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Derivat mindestens die Aminosäuresubstitutionen K130T und K135R aufweist, und dass das Derivat aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus:

SakSTAR (K130T, K135R),
 SakSTAR (G36R, K130T, K135R),
 SakSTAR (K74R, K130T, K135R),
 SakSTAR (K74Q, K130T, K135R),
 SakSTAR (G36R, K74R, K130T, K135R),
 SakSTAR (G36R, K74Q, K130T, K135R),
 SakSTAR (G36R, H43R, K74R, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65A, K74Q, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65Q, K74Q, K130T, K135R),
 SakSTAR (K74Q, K86A, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65Q, T71S, K74Q, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65Q, K74Q, E108A, K109A, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65Q, K74Q, K121A, K130T, K135R),
 SakSTAR (E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (K74R, E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (K35A, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65S, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (S34G, G36R, K74R, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65A, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65N, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65Q, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (K57A, E58A, E61A, E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65Q, K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (K35A, E65D, K74Q, E80A, D82A, K130T, K135R),
 SakSTAR (K74R, E80A, D82A, S103A, K130T, K135R),
 SakSTAR (E65D, K74R, E80A, D82A, K109A, K130T, K135R),
 SakSTAR (K35A, E65Q, K74R, E80A, D82A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R).

2. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 1, wobei bei dem Derivat zusätzlich eine Aminosäure gegen Cys ausgetauscht ist.

3. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 1 oder 2 mit Polyethylenglycol-Substitution, gekennzeichnet durch eine aufrechterhaltene spezifische Aktivität und eine signifikant verringerte Plasma-Clearance.

4. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 2 oder 3, wobei das Cys mit Polyethylenglycol mit Molekulargewichten bis zu 20 kDa chemisch modifiziert ist.
5. Staphylokinase-Derivate nach Anspruch 2, 3 oder 4, wobei ausgewählte Aminosäuren im NH₂-terminalen Bereich von 10 Aminosäuren durch Cys substituiert sind, welches mit Polyethylenglycol mit Molekulargewichten bis zu 20 kDa chemisch modifiziert ist, wobei die Derivate gekennzeichnet sind durch eine signifikant verringerte Plasma-Clearance und eine aufrecht erhaltene thrombolytische Wirksamkeit nach einer einzelnen intravenösen Bolus-Verabreichung bei einer verringerten Dosis.
6. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 5, wobei das Serin in Stellung 2 und/oder 3 gegen ein Cystein ausgetauscht ist und das Cystein mit Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von 5, 10 oder 20 kDa chemisch modifiziert ist.
7. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 6, wobei das Derivat SakSTAR(S3C-MP5, K35A, E65Q, K74R, E80A, D82A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R) ist und wobei MP5 Maleimid-Polyethylenglycol mit 5 kDa ist.
8. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 6, wobei das Derivat SakSTAR(S3C-P10, K35A, E65Q, K74R, E80A, D82A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R) ist und wobei P10 Maleimid-Polyethylenglycol mit 10 kDa ist.
9. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 6, wobei das Derivat SakSTAR(S3C-P20, K35A, E65Q, K74R, E80A, D82A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T, K135R) ist und wobei P10 Maleimid-Polyethylenglycol mit 20 kDa ist.
10. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 6, wobei das Derivat SakSTAR(S3C-MP5, E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) ist und wobei MP5 Maleimid-Polyethylenglycol mit 5 kDa ist.
11. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 6, wobei das Derivat SakSTAR(S3C-SPS, E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) ist und wobei SP5 OPSS-PEG mit 5 kDa ist.
12. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 6, wobei das Derivat SakSTAR(S2C-SP5, S3C-SP5, E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) ist und wobei SP5 OPSS-PEG mit 5 kDa ist.
13. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 6, wobei das Derivat SakSTAR(S3C-P20, E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) ist und wobei P20 Maleimid-Polyethylenglycol mit 20 kDa ist.
14. Staphylokinase-Derivat nach Anspruch 6, wobei das Derivat SakSTAR(S3C-P20, E65D, K74R, E80A, D82A, K130T, K135R) ist und wobei P20 Maleimid-Polyethylenglycol mit 20 kDa ist.
15. Dimer aus zwei Staphylokinase-Derivaten nach Anspruch 2.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens eines der Staphylokinase-Derivate nach einem der Ansprüche 1 bis 15, zusammen mit einem geeigneten Exzipienten.
17. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 16 zur Behandlung von arterieller Thrombose.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

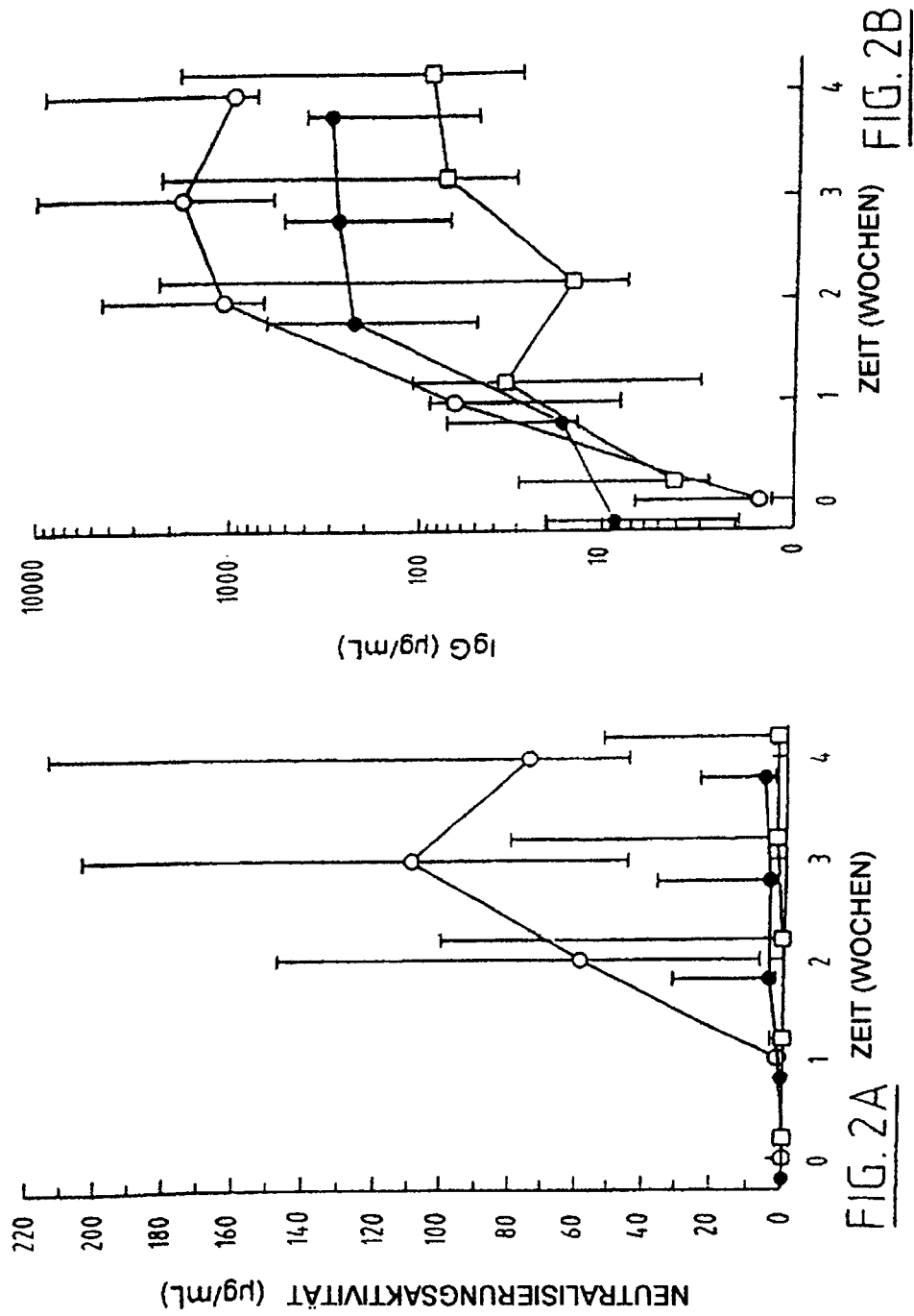
Anhängende Zeichnungen

1	Ser	Ser	Ser	Phe	Asp	Lys	Gly	Lys	Tyr	Lys	Gly	Lys	Asp	14
15														28
Ala	Ser	Tyr	Phe	Glu	Pro	Thr	Gly	Pro	Tyr	Leu	Met	Val	Asn	
29														42
Val	Thr	Gly	Val	Asp	Ser	Lys	Gly	Asn	Glu	Leu	Leu	Ser	Pro	
43														56
His	Tyr	Val	Glu	Phe	Pro	Ile	Lys	Pro	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	
57														70
Lys	Glu	Lys	Ile	Glu	Tyr	Tyr	Val	Glu	Tyr	Ala	Leu	Asp	Ala	

FIG. 1-I

71	Thr	Ala	Tyr	Lys	Glu	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Leu	Asp	Pro	Ser	84
85	Ala	Lys	Ile	Glu	Val	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Lys	Asn	Lys	Lys	Lys	98
99	Glu	Glu	Thr	Lys	Ser	Phe	Pro	Ile	Thr	Glu	Lys	Gly	Phe	Val	112
113	Val	Pro	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Ile	Lys	Asn	Pro	Gly	Phe	Asn	126
127	Leu	Ile	Thr	Lys	Val	Val	Ile	Glu	Lys	Lys					136

FIG. 1-II



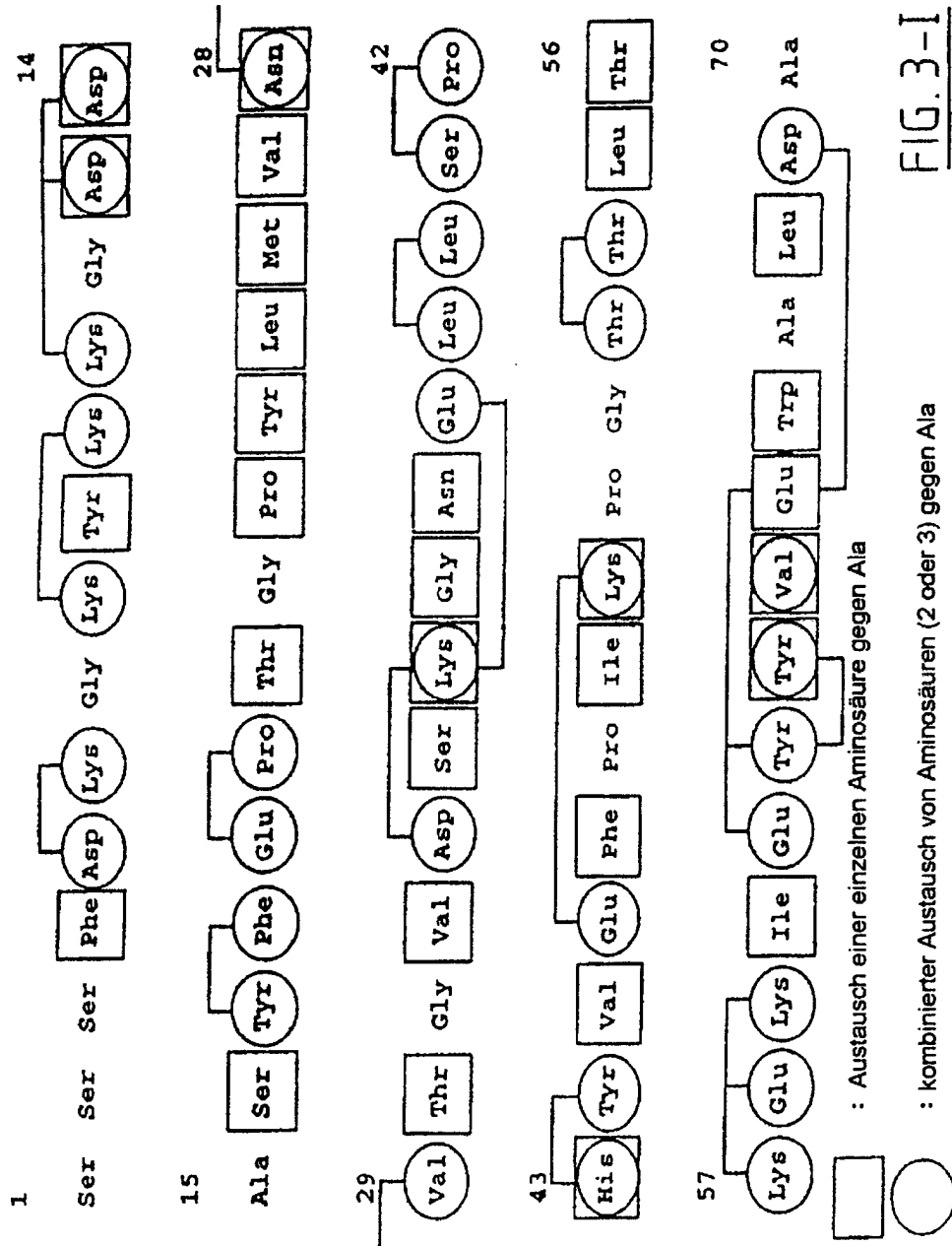


FIG. 3-I

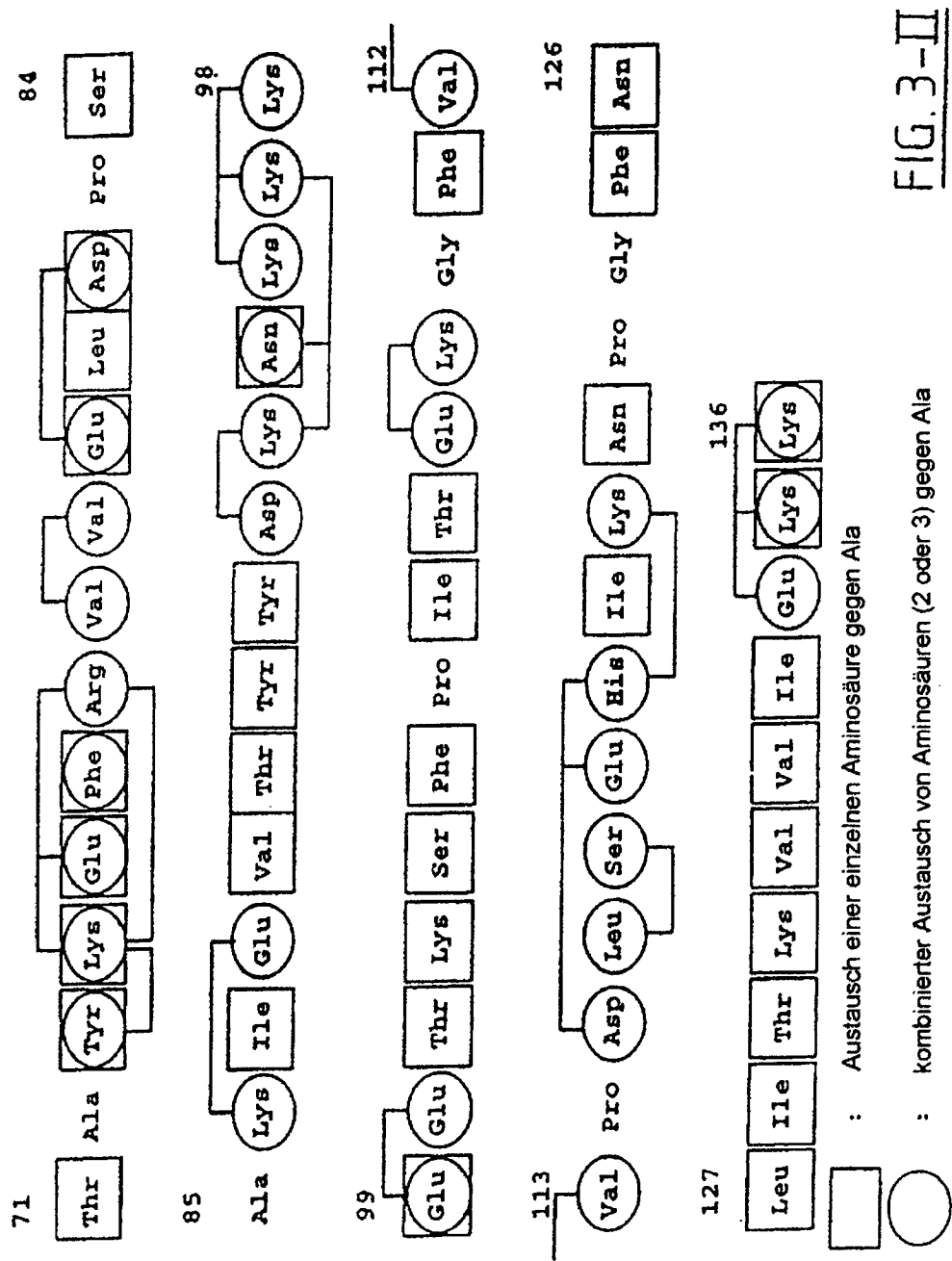


FIG. 3-II

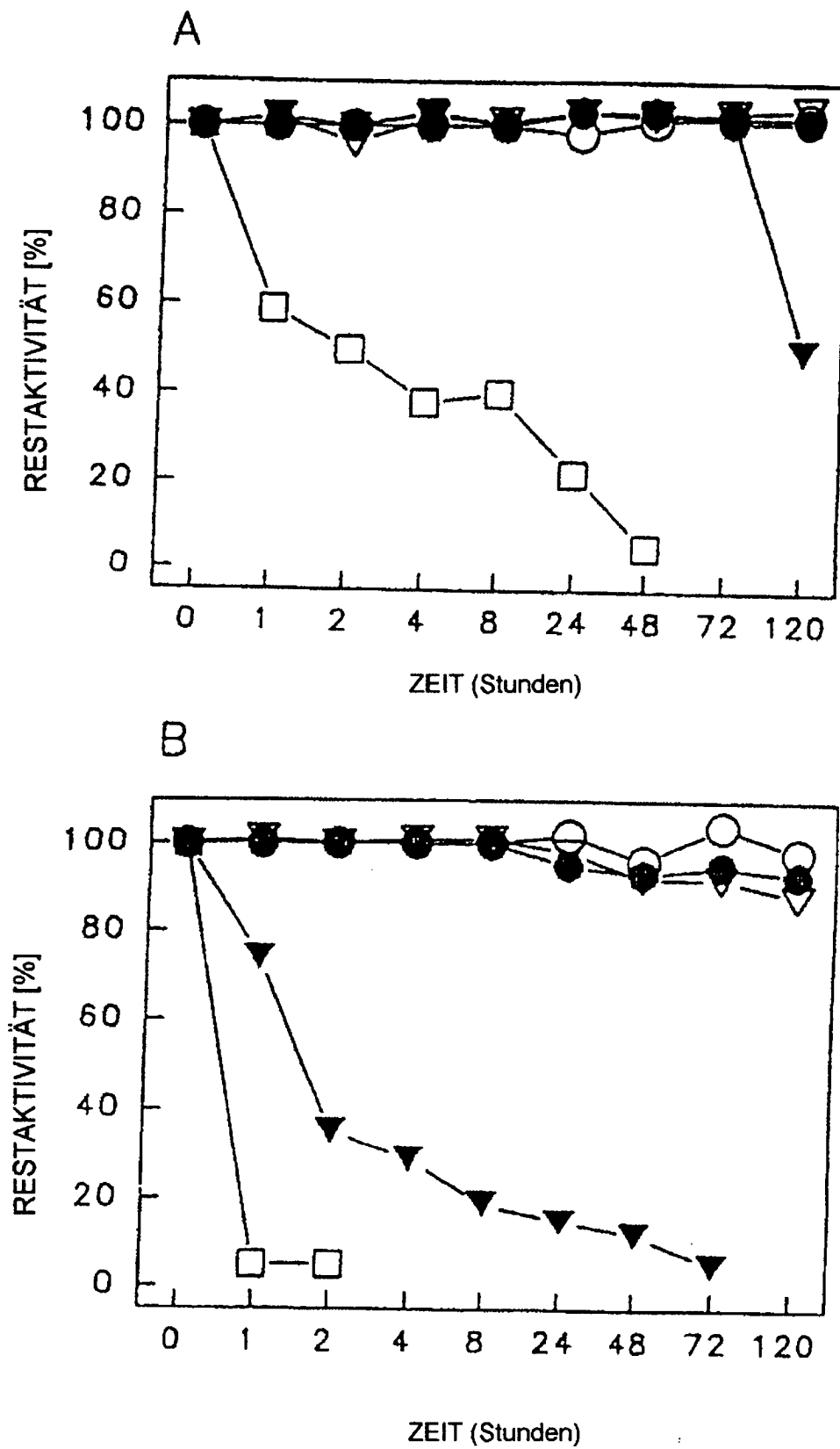


FIG. 4-I

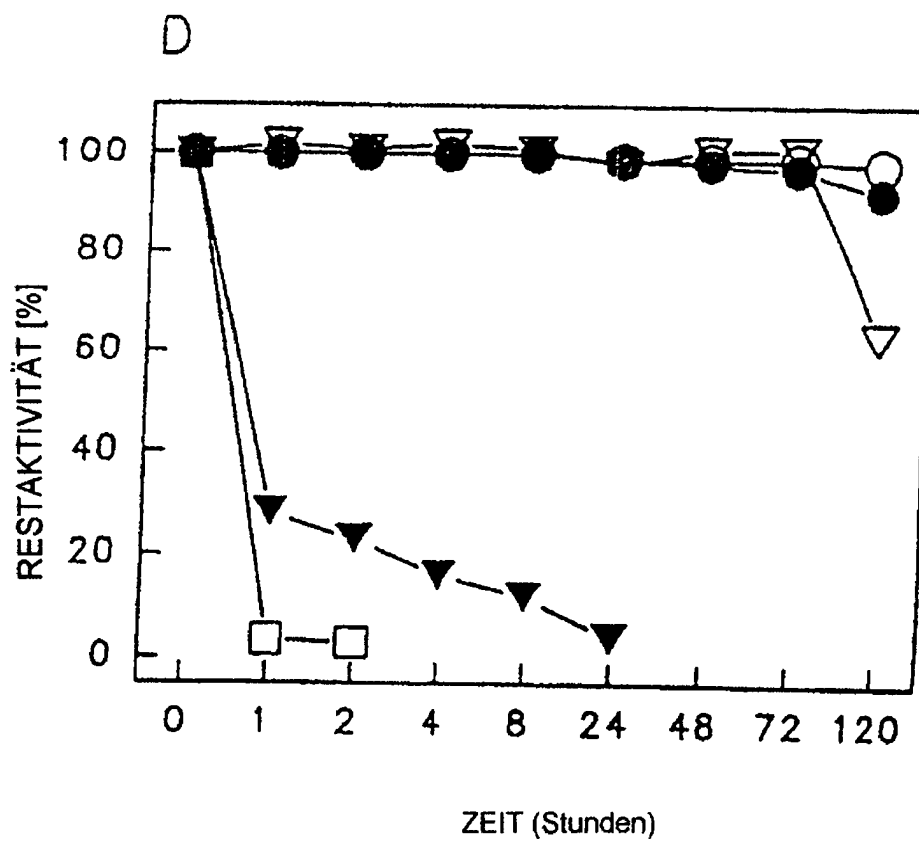
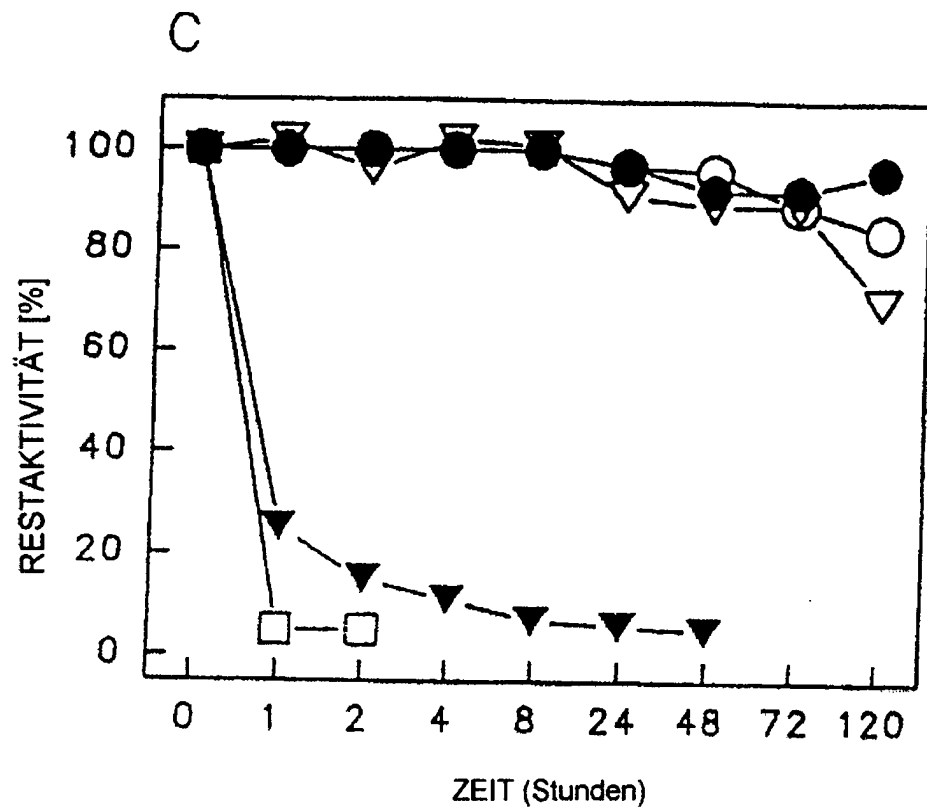


FIG. 4-II

