

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

293 105

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1994 - 3032

(22) Přihlášeno: 28.05.1993

(30) Právo přednosti:
08.06.1992 US 1992/895300

(40) Zveřejněno: 14.06.1995

(Věstník č. 6/1995)

(47) Uděleno: 04.12.2003

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 18.02.2004
(Věstník č. 2/2004)

(86) PCT číslo: PCT/US1993/005136

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 1993/025670

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 9/22

C 07 K 1/00

A 61 K 38/46

(73) Majitel patentu:

Genentech, Inc., San Francisco, CA, US;

(72) Původce vynálezu:

Frenz John, Millbrae, CA, US;

Shire Steven J., Belmont, CA, US;

Sliwkowski Mary B., San Carlos, CA, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA, a.s., Jívanská 1, Praha 4,
14021;

(54) Název vynálezu:

**Způsob oddělování deamidované lidské DNÁzy od
nedeamidované lidské DNÁzy, čistá
nedeamidovaná a deamidovaná lidská DNÁza a
farmaceutický prostředek obsahující tyto formy**

(57) Anotace:

Řešení se týká vyčištěné deamidované lidské DNÁzy a
vyčištěné nedeamidované lidské DNÁzy. Je popsán způsob
dělení těchto složek, farmaceutický prostředek, který obsahuje
tyto složky a jeho použití u pacientů, kteří trpí plicními
obtížemi.

CZ 293105 B6

Způsob oddělování deamidované lidské DNÁzy od nedeamidované lidské DNÁzy, čistá nedeamidovaná a deamidovaná lidská DNÁza a farmaceutický prostředek obsahující tyto formy

5

Oblast techniky

10 Tento vynález se týká výsledků získaných při výzkumu deoxyribonukleázy (DNÁzy), fosfodiesterázy, která je schopna hydrolyzovat polydeoxyribonukleovou kyselinu. Tento vynález se týká forem DNÁzy, způsobu jejich čištění, a farmaceutického prostředku obsahující tyto formy.

Dosavadní stav techniky

15 Tato přihláška souvisí s předmětem popsaným v mezinárodní patentové přihlášce č. WO 90/07 572, jejíž obsah je zde zahrnut jako citace. DNÁza je fosfodiesteráza, která je schopna hydrolyzovat polydeoxyribonukleovou kyselinu. DNÁza byla čištěna z různých zdrojů do různého stupně. Úplná aminokyselinová sekvence savčí DNÁzy byla poprvé dostupná v roce 1973. Viz např. Liao a spol.: J. Biol. Chem. 248, 1489 (1973).

20

DNÁza má četná známá použití a je používána pro terapeutické účely. Jejím základním terapeutickým použitím je snížení viskoelastivity pulmonárních sekrecí u takových onemocnění, jako je pneumonie a cystická fibróza, čímž se napomáhá vyčištění dýchacích cest. Viz např. Lourenco a spol.: Arch. Intern. Med. 142, 2 299 (1982), Shak a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 9 188 (1990), Hubbard a spol.: New Engl. J. Med. 326, 812 (1992).

25

Byla izolována a sekvenována DNA kódující lidskou DNasu I. Tato DNA byla získána expresí v rekombinantních hostitelských buňkách, což umožnilo získávání lidské DNÁzy v komerčně použitelných množstvích. Viz např. Shak a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 9 188 (1990). Bylo zjištěno, že rekombinantní lidská DNÁza (rhDNÁza) je klinicky použitelná, zvláště ve vyčištěné formě, v takové, v níž DNÁza neobsahuje proteinázy a další proteiny, s nimiž se obvykle vyskytuje v přírodě. Viz např. Hubbard a spol.: New Engl. J. Med. 326, 812 (1992).

30

Prostředky a způsoby, kterými se lidská DNÁza může získávat ve farmaceuticky účinné formě, jsou popsány ve shora uvedených patentových přihláškách. Odborníkům jsou známy různé specifické způsoby čištění DNÁzy. Viz např. Khouw a spol.: US patent č. 4 065 355 (vydaný 27. prosince 1977), Markey: FEBS Letters 167, 155 (1984) a Nefsky a spol.: Eur. J. biochem. 179, 215 (1989).

35

40 I když o tom v době, kdy byly podány shora uvedené patentové přihlášky, nebylo uvažováno, DNázový produkt získaný z kultur rekombinantních hostitelských buněk typicky obsahuje směs deamidované a nedeamidované formy DNÁzy. Existence deamidovaných forem DNÁzy zůstala nedocněna přesto, že je známa deaminace zbytků asparaginu a glutaminu v některých proteinech. Viz např. Eipper a spol.: Ann. Rev. Physiol. 50, 333 (1988), Kossiakoff: Science 240, 191 (1988), Bradbury a spol.: trends in Biochem. Sci. 16, 112 (1991) a Wright: Protein Engineering 4, 283 (1991).

45

Tento vynález je založen na dříve nedocněné skutečnosti, že rekombinantní lidská DNÁza může existovat jako směs deamidované a nedeamidované formy. Způsoby podle tohoto vynálezu bylo zjištěno, že deamidovaná lidská DNÁza je enzymaticky méně aktivní než nedeamidovaná lidská DNÁza. Přítomnost deamidované DNÁzy a nedeamidované DNÁzy společně ve směsi a možnost další deamidace, jako například při skladování in vitro přípravků lidské DNÁzy, může komplikovat úsilí získat stále jednotný DNázový produkt, který se podává klinicky. Jelikož existence a vlastnosti deamidované DNÁzy nebyly před tímto vynálezem známy a jelikož způsoby identifi-

50

kování deamidované DNÁzy a její oddělení od přípravků DNÁzy, v nichž se může nalézat, nebyly zřejmé, byl vypracován tento vynález.

5 Podstata vynálezu

Tento vynález se týká způsobu oddělování lidské DNÁzy deamidované v aminokyselinovém zbytku odpovídajícím Asn-74 původní lidské DNÁzy od nedeamidované lidské DNÁzy z jejich směsi, vyznačující se tím, že se směs chromatografuje a formy DNáz se oddělují na nosiči pryskyřice s imobilizovaným kationtovým iontoměničtem.

Tento způsob ve výhodných uspořádáních se vyznačuje tím, že se směs chromatografuje na pryskyřici nebo jiném nosiči, na který je navázán kationtový polymer, jako je heparin nebo nehydrolyzovatelný analog deoxyribonukleové kyseliny (DNA), nebo se chromatografuje na tak zvaném TCX nosiči (katex s prodlouženým raménkem). Tento vynález se také týká použití těchto způsobů chromatografie nelidských DNáz, jako je například hovězí DNÁza.

Tento vynález se také týká deamidované lidské DNÁzy jako vyčištěného produktu, který v podstatě neobsahuje nedeamidovanou lidskou DNÁzu. Tento vynález se týká také nedeamidované lidské DNÁzy jako vyčištěného produktu, který v podstatě neobsahuje deamidovanou lidskou DNÁzu. V tomto vynálezu bylo zjištěno, že vyčištěná nedeamidovaná lidská DNÁza je plně enzymaticky aktivní při srovnání s deamidovanou lidskou DNÁzu.

Tento vynález se týká také farmaceutických prostředků, které jako aktivní složku obsahují vyčištěnou deamidovanou lidskou DNÁzu nebo vyčištěnou nedeamidovanou lidskou DNÁzu.

Tento vynález se týká také způsobu podávání terapeuticky efektivního množství vyčištěné deamidované lidské DNÁzy nebo vyčištěné nedeamidované lidské DNÁzy při léčení pacientů, například těch, kteří mají nahromaděný viskózní materiál obsahující DNA. Podávání těchto vyčištěných DNáz se s výhodou provádí přímou inhalací do plic.

Tento vynález se zvláště týká způsobu léčení pacienta s onemocněním plic, jako je bronchitida, cystická fibróza nebo emfyzém, vyznačujícího se tím, že se podává terapeuticky efektivní množství vyčištěné nedeamidované lidské DNÁzy, zvláště přímo do cest, kterými prochází vzduch.

Tento vynález se také týká farmaceutických prostředků, které obsahují nedeamidovanou lidskou DNÁzu, která je k dispozici v ampulkách z umělé hmoty, popřípadě v přítomnosti farmaceuticky přijatelného vehikula.

40 Obrázek 1 zobrazuje sekvenci aminokyselin vzorce I

Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Ala	Leu	Lys	Cys	Phe	Phe	Arg	Asp	Leu	Ser
1				5					10				15	
Ser	Xaa	Thr	Thr	Phe	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Lys	Arg	Arg	Lys	Leu
				20					25				30	

Ser Ser Lys Asp Ile Pro Asp Ser Xaa Gln His Ser Arg His Leu	35	40	45
Xaa Gly His His His His Leu Arg Met Arg Gly Met Lys Leu Leu	50	55	60
Gly Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ala Leu Leu Gln Gly Ala Val Ser	65	70	75
Leu Lys Ile Ala Ala Phe Asn Ile Gln Thr Phe Gly Glu Thr Lys	80	85	90
Met Ser Asn Ala Thr Leu Val Ser Tyr Ile Val Gln Ile Leu Ser	95	100	105
Arg Tyr Asp Ile Ala Leu Val Gln Glu Val Arg Asp Ser His Leu	110	115	120
Thr Ala Val Gly Lys Leu Leu Asp Asn Leu Asn Gln Asp Ala Pro	125	130	135
Asp Thr Tyr His Tyr Val Val Ser Glu Pro Leu Gly Arg Asn Ser	140	145	150
Tyr Lys Glu Arg Tyr Leu Phe Val Tyr Arg Pro Asp Gln Val Ser	155	160	165
Ala Val Asp Ser Tyr Tyr Tyr Asp Asp Gly Cys Glu Pro Cys Gly	170	175	180
Asn Asp Thr Phe Asn Arg Glu Pro Ala Ile Val Arg Phe Phe Ser	185	190	195
Arg Phe Thr Glu Val Arg Glu Phe Ala Ile Val Pro Leu His Ala	200	205	210
Ala Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Ile Asp Ala Leu Tyr Asp Val	215	220	225
Tyr Leu Asp Val Gln Glu Lys Trp Gly Leu Glu Asp Val Met Leu	230	235	240
Met Gly Asp Phe Asn Ala Gly Cys Ser Tyr Val Arg Pro Ser Gln	245	250	255
Trp Ser Ser Ile Arg Leu Trp Thr Ser Pro Thr Phe Gln Trp Leu	260	265	270
Ile Pro Asp Ser Ala Asp Thr Thr Ala Thr Pro Thr His Cys Ala	275	280	285
Tyr Asp Arg Ile Val Val Ala Gly Met Leu Leu Arg Gly Ala Val	290	295	300

Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly	
					305				310					315	
Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val	
				320					325					330	
Glu	Val	Met	Leu	Lys	Xaa	Ala	Ala	Pro	Pro	His	Thr	Ser	Xaa	Thr	
				335					340					345	
Ala															
346	(I)														

a DNA sekvence vzorce II

```

TCCTGCACAG GCAGTGCCTT GAAGTGCTTC TTCAGAGACC TTTCTTCATA 50
GACTACTTTT TTTTCTTTAA GCAGCAAAAG GAGAAAATTG TCATCAAAGG 100
ATATTCCAGA TTCTTGACAG CATTCTCGTC ATCTCTGAGG ACATCACCAT 150
CATCTCAGGA TGAGGGGCAT GAAGCTGCTG GGGGCGCTGC TGGCACTGGC 200
GGCCCTACTG CAGGGGGCCG TGTCCCTGAA GATCGCAGCC TTCAACATCC 250
AGACATTTGG GGAGACCAAG ATGTCCAATG CCACCCTCGT CAGCTACATT 300
GTGCAGATTC TGAGCCGCTA TGACATCGCC CTGGTCCAGG AGGTCAGAGA 350
CAGCCACCTG ACTGCCGTGG GGAAGCTGCT GGACAACCTC AATCAGGATG 400
CACCAGACAC CTATCACTAC GTGGTCAGTG AGCCACTGGG ACGGAACAGC 450
TATAAGGAGC GCTACCTGTT CGTGTACAGG CCTGACCAGG TGTCTGCGGT 500
GGACAGCTAC TACTACGATG ATGGCTGCGA GCCCTGCGGG AACGACACCT 550
TCAACCGAGA GCCAGCCATT GTCAGGTTCT TCTCCCGGTT CACAGAGGTC 600
AGGGAGTTTG CCATTGTTCC CCTGCATGCG GCCCCGGGGG ACGCAGTAGC 650
CGAGATCGAC GCTCTCTATG ACGTCTACCT GGATGTCCAA GAGAAATGGG 700
GCTTGAGGA CGTCATGTTG ATGGGCGACT TCAATGCGGG CTGCAGCTAT 750
GTGAGACCT CCCAGTGGTC ATCCATCCGC CTGTGGACAA GCCCCACCTT 800
CCAGTGGCTG ATCCCCGACA GCGCTGACAC CACAGCTACA CCCACGCACT 850
GTGCCTATGA CAGGATCGTG GTTGCAGGGA TGCTGCTCCG AGGCGCCGTT 900
GTTCCCGACT CGGCTCTTCC CTTTAACTTC CAGGCTGCCT ATGGCCTGAG 950
TGACCAACTG GCCCAAGCCA TCAGTGACCA CTATCCAGTG GAGGTGATGC 1000
TGAAGTGAGC AGCCCCTCCC CACACCAGTT GAACTGCAG 1039

```

(II)

5 lidské DNázy I. Sekvence přírodního signálu na obrázku 1 je podtržena, potenciální iniciační kodony jsou uvedeny v obdélníku a maturovaná sekvence je uvedena v hranatých závorkách.

Obrázek 2 zobrazuje korelaci mezi enzymatickou aktivitou a rozsahem deamidace vzorků lidské DNázy. Specifická aktivita byla stanovena normalizováním DNázové aktivity stanovené testem s methylzelení (MG) (v koncentračních jednotkách vzhledem ke standardní křivce) na koncent-

raci DNázy změřené testem ELISA. Procenta deamidace byla stanovena mapováním po štěpení trypsinem. Vzorky lidské DNázy v „den izolace“ byly vyčištěny z kultury rekombinantních buněk CHO (buněk z vaječníků čínského křečka) expresí DNA kódující lidskou DNázu I. Tyto vzorky byly odebrány 3, 5, 7, 9, 11, 13 a 20 dnů po počátku kultivace. Vzorky s „vysokým pH“ byly vzorky vyčištěné DNázy z 13. Dne, které byly inkubovány in vitro dva dny při pH 8 a teplotě 37 °C. Vzorky „stability“ byly vzorky vyčištěné DNázy z 13. Dne, které byly různou dobu skladovány in vitro při teplotě 5,25 nebo 37 °C. Obrázek 3 je příkladem mapy štěpení trypsinem DNázy použité pro stanovení rozsahu deamidace. Vzorek, který je zde uveden, znamená ze 65 % hmotn. deamidovanou DNázu. Označení „mAU“ znamená jednotky miliabsorbance při 214 nm.

Obrázek 4 je schematické znázornění deamidace asparaginového zbytku v poloze 74 aminokyseliny (Asn-74) v přírodní lidské DNáze. Deamidace převádí Asn-74 buď na zbytek kyseliny aspartové (Asp) nebo izoaspartátu (izo-Asp). Každá z těchto tří forem DNáz poskytuje štěpením trypsinem pár peptidů, což ukazuje na identitu s příslušnou formou DNázy.

Obrázek 5 je chromatogram vzorku lidské DNázy frakcionované na TCX koloně. Tento vzorek má 67 % hmotn. deamidované DNázy.

Obrázek 6 ukazuje mapu po štěpení trypsinem dvou frakcí z dělení na TCX uvedeném na obrázku 5. Nepřítomnost trypsinového peptidu T6-7 na mapě štetu maxima 2 označuje nepřítomnost deamidované DNázy.

Obrázek 7 ukazuje chromatogramy několika vzorků lidské DNázy frakcionované na TCX koloně. Vzorek, který je označen „M1-28 STD“, je přípravek lidské DNázy získané z kultury buněk CHO transformovaných DNA kódující přírodní lidskou DNázu I. Vzorek označený „DNázový ASP mutant“ znamená DNázu, která má zbytek kyseliny aspartové (spíše než zbytek asparaginu) v poloze 74 aminokyseliny a který má stejnou sekvenci aminokyselin jako Asp forma deamidované DNázy uvedené na obrázku 4. DNázový ASP mutant byl získán z kultury buněk transformovaných DNA, která kóduje tuto formu mutantu lidské DNázy. DNA kódující DNázový ASP mutant byla připravena místně řízenou mutagenezí DNA kódující přírodní lidskou DNázu. Srovnání chromatogramů ukazuje, že jedna z těchto forem lidské DNázy v M1-28 STD se eluuje z TCX kolony ve stejné poloze jako DNázový ATP mutant.

Obrázek 8 ukazuje chromatogramy několika vzorků lidské DNázy frakcionované na koloně TSK-heparin (Toso-Hass, Montgomeryville, Pensylvánie, USA). Vzorek označený „12K#8“ je přípravek lidské DNázy získané z kultury buněk CHO transformovaných DNA kódující přírodní lidskou DNázu I. Vzorek označený „deamidovaný standard“ znamená vyčištěnou deamidovanou lidskou DNázu. Vzorek označený „nedeamidovaný standard“ se týká vyčištěné nedeamidované lidské DNázy. Vyčištěná deamidovaná lidská DNáza a vyčištěná nedeamidovaná lidská DNáza byly připraveny TCX chromatografií.

Obrázek 9 ukazuje chromatogramy několika vzorků DNázy frakcionovaných na imobilizované koloně s DNA analogem. Vzorek označený „M1-28“ znamená přípravek lidské DNázy získané z kultury buněk CHO transformovaných DNA kódující přírodní lidskou DNázu. Vzorek označený „deamidovaný standard“ znamená vyčištěnou deamidovanou lidskou DNázu.

Vzorek označený „nedeamidovaný standard“ se týká vyčištěné nedeamidované lidské DNázy. Vyčištěná deamidovaná lidská DNáza a vyčištěná nedeamidovaná lidská DNáza byly připraveny TCX chromatografií. Vzorek označený „DNázový ASP mutant“ znamená DNázu, která má zbytek kyseliny aspartové (spíše než zbytek asparaginu) v poloze 74 aminokyseliny.

Pojem „lidská DNáza“ tak, jak se zde používá, znamená polypeptid s aminokyselinovou sekvencí lidské maturované DNázy I vzorce I uvedeného na obrázku I a také varianty této aminokyselinové sekvence (včetně alelických variant), které jsou enzymaticky aktivní při hydrolyzování

DNA. Pojem „lidská DNÁza“ zde tedy označuje definici těch materiálů, které jsou popsány a připraveny ve shora popsaných patentových přihláškách.

Pojem „lidská DNÁza“ nutně zahrnuje přírodní maturovanou lidskou DNÁzu, která má v poloze 74 polypeptidu zbytek asparaginu (Asn). Bylo zjištěno, že tento asparagin je citlivý na deamidaci, kterou se může připravit směs deamidované a nedeamidované formy lidské DNÁzy.

Deamidovaná DNÁza má na místo Asn zbytku v poloze 74 aminokyseliny zbytek kyseliny aspartové (Asp) nebo izoaspartátu (izo-Asp) (viz obrázek 4).

Pojem „deamidovaná lidská DNÁza“ tak, jak je zde používán, tedy znamená lidskou DNÁzu, která je deamidována na asparaginovém zbytku, který se nachází v poloze 74 aminokyselinové sekvence přírodní maturované lidské DNÁzy. Bylo zjištěno, že deamidovaná lidská DNÁza může vznikat při produkci lidské DNÁzy rekombinantními prostředky a že se může nalézat v přípravcích lidské DNÁzy získané z rekombinantních hostitelských buněk. Deamidovaná lidská DNÁza může vznikat také in vitro při skladování nedeamidované lidské DNÁzy.

I když asparaginový zbytek v poloze 7 aminokyselinové sekvence přírodní maturované lidské DNÁzy může být také deamidován (vedle asparaginového zbytku v poloze 74 aminokyseliny), bylo zjištěno, že taková dvojnásobně deamidovaná DNÁza je enzymaticky neaktivní.

Pojem „směs“ tak, jak se zde tento pojem používá v souvislosti s přípravky lidské DNÁzy, znamená přítomnost jak deamidované tak nedeamidované formy lidské DNÁzy. Například bylo zjištěno, že v přípravcích lidské DNÁzy získané rekombinantní expresí je deamidováno až 50 až 80 nebo více % hmotn. lidské DNÁzy.

Pojem „vyčištěná deamidovaná lidská DNÁza“ tak, jak se zde používá, znamená deamidovanou lidskou DNÁzu, která v podstatě neobsahuje nedeamidovanou lidskou DNÁzu. Jinými slovy, nedeamidovaná lidská DNÁza bude představovat méně než 10, s výhodou méně než 5, nejvýhodněji méně než 1 % hmotn. z celkové DNÁzy v prostředku vyčištěné deamidované lidské DNÁzy.

Pojem „vyčištěná nedeamidovaná lidská DNÁza“ tak, jak se zde používá, znamená nedeamidovanou lidskou DNÁzu, která v podstatě neobsahuje deamidovanou lidskou DNÁzu. Jinými slovy, deamidovaná lidská DNÁza bude představovat méně než 25, s výhodou méně než 5, nejvýhodněji méně než 1 % hmotn. z celkové DNÁzy v prostředku vyčištěné nedeamidované lidské DNÁzy.

Pojem „vehikulum (excipient)“ tak, jak se zde používá, znamená farmaceuticky přijatelný materiál, který se používá společně s DNázou pro patřičné a úspěšné podávání DNÁzy pacientovi. Vhodná vehikula jsou dobře známa odborníkům. Jsou popsána například v příručkách „Physicians Desk Reference“, „Merck Index“ a „Remington's Pharmaceutical Sciences“.

Výhodným prostředkem pro lidskou DNÁzu je pufrovaný nebo nepufrovaný vodný roztok, s výhodou izotonický solný roztok, jako je 150 mM chlorid sodný obsahující 1,0 mM chlorid vápenatý s pH 7. Tyto roztoky jsou zvláště přizpůsobeny pro použití v komerčně dostupných rozprašovačích, včetně tryskových rozprašovačů a ultrazvukových rozprašovačů, pro podávání, například přímo do dýchacích cest nebo do plic zasaženého pacienta. Pro další podrobnosti týkající se přípravy prostředků s lidskou DNázou a jejich podávání pro efektivní použití lze odkázat na shora uvedené patentové přihlášky.

Pojem „terapeuticky efektivní množství“ tak, jak se zde používá, znamená dávky od 1 µg do 100 mg lidské DNÁzy na kilogram tělesné hmotnosti pacienta, podávané ve formě farmaceutických prostředků, jak je to zde popsáno. Terapeuticky efektivní množství lidské DNÁzy bude záviset například na terapeutických podmínkách, na cestě podávání a na stavu pacienta. Pro lékaře tedy bude nutné přesně stanovit dávku a modifikovat způsob podávání podle potřeby tak, aby se dosáhlo optimálního terapeutického účinku. Vzhledem k rozdílu enzymatické akti-

vity deamidované a nedeamidované DNázy množství vyčištěné nedeamidované DNázy potřebné pro dosažení stejného terapeutického účinku za stejných podmínek bude menší než množství vyčištěné deamidované lidské DNázy nebo množství směsi těchto dvou forem.

- 5 Vyčištěné DNázy, zvláště nedeamidovaná forma, se používají pro enzymatickou změnu viskoelasticity (pružnost) sliznic. Tak vyčištěné lidské DNázy jsou zvláště užitečné pro léčení pacientů s chorobami plic, kteří mají abnormální viskózní hnisavé sekrece, a stavů, jako je akutní nebo bronchiální onemocnění plic včetně infekčního zánětu plic, bronchitidy nebo tracheobronchitidy, bronchiektázie, cystické fibrózy, astma, tuberkulózy a plísňových infekcí. Při této léčbě se roztok
10 nebo jemně rozemletý suchý přípravek vyčištěné deamidované lidské DNázy nebo vyčištěné nedeamidované lidské DNázy vnese konvenčním způsobem do průdušek, například vdechním jako aerosol.

- 15 Po úspěšném klonování a expresi lidské DNázy v rekombinantních hostitelských buňkách a po usilovném výzkumu bylo objeveno, že DNázový produkt získaný touto rekombinantní expresí typicky existuje jako směs až dosud ještě nedefinovaných složek. Zvláště analýza izoelektrickou fokusací (IEF) lidské DNázy vyčištěné z kultur rekombinantních buněk CHO odhalila složitou sestavu DNázových částí. Byly stanoveny různé DNázy jako výsledek několika posttranslačních modifikací DNázy, včetně deamidace.

- 20 Pro stanovení přítomnosti a množství deamidované DNázy v těchto přípravcích byly použity dva typy analýz. Jednou metodou je štěpení výchozího přípravku DNázy trypsinem a analýza výsledných peptidů HPLC na obrácených fázích. Při této metodě bylo změřením množství šesti deamidací indukujících peptidů rozštěpených trypsinem stanoveno množství deamidované DNázy ve
25 výchozím přípravku.

- Další způsob zahrnuje chromatografii výchozího přípravku DNázy na TCX koloně. Bylo objeveno, že TCX kolona je schopna oddělit deamidovanou lidskou DNázu od nedeamidované DNázy. Každá tato forma může být tedy účinně oddělena od druhé a získána tak ve vyčištěném stavu.
30 Při tomto způsobu se množství deamidované DNázy a nedeamidované DNázy ve výchozím přípravku stanovuje změřením ploch maxim, které odpovídají odděleným formám DNázy na chromatogramech.

- 35 I když tyto dva způsoby jsou při stanovování a kvantitativním vyhodnocení deamidované DNázy přibližně stejně účinné, TCX způsob je zvláště účinný, vyžaduje daleko méně času a práce než druhý způsob. Navíc TCX chromatografie poskytuje prostředky pro oddělení deamidované formy od nedeamidované formy DNázy, zatímco konvenční katexy a různé další chromatografické pryskyřice, které byly analyzovány, nejsou schopny toto dělení provést.

- 40 Obecné principy TCX chromatografie byly popsány například Millerem: J. Chromatography 510, 133 (1990), Janzenem a spol.: J. Chromatography 522, 77 (1990) a Hearnem a spol.: J. Chromatography 548, 117 (1991). Aniž bychom tento vynález omezili nějakým zvláštním mechanismem nebo teorií, předpokládá se, že zbytek Asn-74 lidské DNázy, který je citlivý na deamidaci, je umístěn uvnitř DNA vazebné drážky enzymu, analogicky jako je tomu u známé krystalové struktury hovězí DNázy. Tato DNA-vázající drážka obsahuje bazické aminokyselinové zbytky (aby
45 navázala DNA) a tato drážka je zřejmě přístupná pro ligandy použitého TCX, ale nikoliv pro mnohem kratší ligandy konvenčních katexů. Ligandy TCX pravděpodobně napodobují substráty přírodní nukleové kyseliny. Očekává se tedy, že TCX chromatografie bude užitečná pro čištění dalších nukleáz, jako je ribonukleáza (RNáza) nebo restriční endonukleázy, a také proteinů
50 vázajících DNA.

- Oddělení deamidovaných a nedeamidovaných forem DNázy může být doprovázeno chromatografií na pryskyřici nebo jiné nosné matici, která obsahuje kovalentně navázané kationtové polymery, jako je heparin nebo syntetický nehydrolyzovatelný analog DNA. Chromatografické
55 kolony s imobilizovaným heparinem jsou komerčně dostupné (např. od firmy Toso Haas Co.,

Montgomeryville., Pensylvanie, USA). Nehydrolyzovatelné DNA analogy byly popsány například Spitzerem a spol.: Nucl. Acid: Res. 16, 11 691 (1988). Kolona s imobilizovaným nehydrolyzovatelným analogem DNA se konvenčně připravuje tak, že se syntetizuje DNA analog se skupinou aminové kyseliny na 3'-konci jednoho nebo obou jeho doplňkových vláken. Aminová skupina je pak dostupná pro kondenzaci s kolonou aktivovanou epoxidovou skupinou, jak je to popsáno například v literatuře publikované firmou Rainin Biochemical LC Products (Woburn, Massachusetts, USA).

Po úspěšném oddělení deamidované a nedeamidované lidské DNÁzy způsoby podle tohoto vynálezu bylo zjištěno, že deamidovaná DNÁza má sníženou enzymatickou aktivitu ve srovnání s nedeamidovanou lidskou DNázou podle analýzy methylzelení (MG). Kurnick: Arch. Biochem. 29, 41 (1950). Bylo zjištěno, že deamidovaná lidská DNÁza vykazuje právě přes polovinu enzymatické aktivity nedeamidované lidské DNÁzy. Spojením vyčištěné deamidované DNÁzy a vyčištěné nedeamidované DNÁzy podle tohoto vynálezu v různých poměrech je tedy možné připravit farmaceutické prostředky lidské DNÁzy, které mají žádanou specifickou aktivitu v rozmezí mezi specifickými aktivitami jednotlivých složek, což může být optimální pro léčení příslušných onemocnění.

Následující příklady jsou pouze způsobem ilustrace vynálezu. Nejsou zamýšleny jako jakékoliv omezení tohoto vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

25

Příklad 1

Mapování štěpením trypsinem

Postup použitý pro mapování lidské DNÁzy štěpením trypsinem je souhrnně shrnut do následujících stupňů:

Stupeň 1:

Koncentrace vzorku (1 mg) DNÁzy se upraví na 4 mg/ml koncentraci na zařízení Amicon Centricon-10 nebo zředěním vehikulem. Konečný objem: 250 μ l.

Stupeň 2:

Ke vzorku se přidá 250 μ l předem připraveného pufru (40 mM bis-ris, 10 mM EGTA, pH 6,0). Směs se inkubuje 1 hodinu při teplotě 37 °C.

Stupeň 3:

Pufrovaný vzorek se dá do štěpicího pufru (100 mM Tris, pH 8) pomocí kolony Pharmacia NAP-5. Konečný objem: 1 ml.

Stupeň 4:

Ke vzorku se přidá 10 μ l roztoku trypsinu (1 mg/ml trypsinu, 1 mM HCl) a směs se inkubuje 2 hodiny při 37 °C.

Stupeň 5:

Ke vzorku se přidá 10 μ l podíl roztoku trypsinu a směs se inkubuje další 2 hodiny při 37 °C.

Stupeň 6:

- 5 Štěpení se zastaví přidáním 6 μ l trifluoroctové kyseliny (TFA). Vzorek se skladuje při teplotě 5 °C nebo nižší dokud se nechromatografuje.

Stupeň 7:

- Směs peptidů se rozdělí HPLC za následujících podmínek:
- 10 kolona: Nucleosil C18, 5 μ m, 1 000 nm, 2,0 x 150 mm (Alltech, Co., Deerfield, Illinois, USA),
- teplota kolony: 40 °C,
- 15 eluent A: 0,12 % TFA ve vodě,
- eluent B: 0,10 % TFA v acetonitrilu,
- gradientový profil:

20

doba (min)	% A	% B
0	100	0
5	100	0
65	40	60
69	5	95
70	5	95

- průtok: 0,25 ml/min,
- objem injektovaného roztoku: 250 μ l,
- 25 doba reekvilibrace po eluci při 100 % A: 20 minut,
- teplota komůrky automatického zásobníku: 5 °C,
- 30 detekce: absorpance při 214 a 280 nm.

Stupeň 8:

- 35 Identifikují se peptidy (získané štěpením trypsinem): T7, (D)T7, T7–8, (D) T708, T6–7–8 a T6–7 podle retenčního času ve srovnání se standardem.

Stupeň 9:

- 40 Integruje se chromatogram získaný při 280 nm. Zkontroluje se kvalita integrace kontrolou základní čáry a oddělení blízko sebe se eluujících maxim. Zvláštní pozornost se musí věnovat rozdělení brzy vycházejících peptidů T7 a (D)T7, které nemusí být dobře rozděleny.

Stupeň 10:

- 45 Normalizují se plochy maxim šesti reporterových peptidů na obsah tyrosinu. Každý z peptidů T7, (D)T7, T7–8, a (D) T7–8 obsahuje jeden zbytek Tyr, zatímco T6–7–8 a T6–7 obsahují tři zbytky Tyr. Vypočte se poměr deamidovaných částí na základě normalizovaných ploch maxim (D)T7, (D)T7–8, T6–7–8 a T6–7 vzhledem k celkové normalizované ploše maxim šesti peptidů.

Pro přesné provedení mapování štěpení trypsinem ke stanovení deamidované DNázy podle shora uvedeného postupu je potřeba jeden miligram DNázy v objemu 250 μ l. počáteční příprava vzorku pro tento způsob tedy vyžaduje buď zahuštění nebo zředění vzorku. DNáza je v přítomnosti vápníku velice odolná vůči proteinázám, včetně trypsinu. Dalším stupněm tohoto postupu je tedy

5 částečné odstranění vápenatých iontů zpracováním s [ethylenbis(oxyethylenitрил)]tetraoctovou kyselinou (EGTA). Nadbytečné zpracování s EGTA může denaturovat a agregovat DNázu, takže tento stupeň se musí provádět pečlivě. Vzorek zpracovaný s EGTA v objemu 0,15 ml se potom vnese do 1 ml štěpicího pufru, přidá se trypsin a vzorek se inkubuje dvě hodiny při 37 °C. přidá se druhý podíl trypsinu a vzorek se inkubuje další dvě hodiny. Štěpení se zastaví okyselením.

10 Vzorek se buď skladuje pro pozdější analýzu nebo se přímo nanese na HPLC kolonu.

250 μ l (250 μ g) směsi peptidů získané štěpením trypsinem se rozdělí na HPLC koloně s obrátcenými fázemi podle shora popsáných podmínek. Typická mapa štěpení trypsinem je uvedena na obrázku 3. HPLC byla prováděna na přístroji Hewlett-Packard model 1090M HPLC. Výtok

15 z kolony byl sledován detektorem současně při 214 a 280 nm. Jelikož je pro kvantitativní vyhodnocení deamidované DNázy rozhodující první část peptidové mapy, jak je to popsáno níže, nejsou pro tuto analýzu vhodné jiné přístroje s větším zpožděním gradientu a dalšími objemy kolony. Každá analýza podle tohoto postupu vyžaduje 70 minut pro gradientové oddělení a 20 minut pro reekvilibraci kolony, celkový čas HPLC je tedy 90 minut. Princip a postup

20 integrace maxim pro stanovení deamidované DNázy ve vzorku jsou popsány níže.

K deamidaci lidské DNázy dochází alespoň na asparaginovém zbytku, který je přítomen v poloze 74 aminokyseliny (Asn-74) v přirozené maturované lidské DNáze. Asn-74 je na C-

25 konci místa štěpení trypsinem na argininovém zbytku v poloze 73 aminokyseliny (Arg-73), jak je vidět ze seznamu očekávaných peptidů lidské DNázy při štěpení trypsinem, který je uveden v tabulce I.

Tabulka I

Peptidy, od kterých se očekává, že budou vznikat při štěpením přírodní maturované lidské DNázy trypsinem

id.č.	zbytky	sekvence aminokyselin peptidu
T1	1 až 2	LK
T2	3 až 15	IAAFNIQTFGETK (sekvence vzorce III)
T3	16 až 31	MSNATLVSYIVQILSR (sekvence vzorce IV)
T4	32 až 41	VDIALVQEVN (sekvence vzorce V)
T5	42 až 50	DSHLTAVGK (sekvence vzorce VI)
T6	51 až 73	LLDNLNQDAPDTYHYVSEPLGR (sekvence vzorce VII)
T7	74 až 77	NSYK (sekvence vzorce VIII)
T8	78 až 79	ER
T9	80 až 111	YLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNR (sekvence vzorce IX)
T10	112 až 117	EPAIVR (sekvence vzorce X)
T11	118 až 121	FFSR (sekvence vzorce XI)
T12	122 až 126	FTEVR (sekvence vzorce XII)
T13	127 až 157	EPAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEK (sekvence vzorce XIII)
T14	158 až 185	WGLEDVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIR (sekvence vzorce XIV)
T15	186 až 213	LWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAVDR (sekvence vzorce XV)
T16	214 až 222	IVVAGMLLR (sekvence vzorce XVI)
T17	223 až 260	GAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQAI SDHYPVEVMLK (sekvence vzorce XVII)

5

Místo zbytku Asn (v jednopísmenném označení „N“) v poloze 74 v přírodní nedeamidované lidské DNáze má deamidovaná lidská DNáza buď zbytek Asp nebo izo-Asp, jak je to uvedeno na obr. 4. Izo-Asp je izomerní, – aminokyselinová forma kyseliny aspartové. Peptidová vazba mezi Arg-73 a izo-Asp je odolná vůči štěpení trypsinem, takže deamidovaná lidská DNáza poskytuje při štěpení trypsinem charakteristický peptid, který obsahuje zbytky 51 až 77 a nazývá se T6–7, protože jde o spojené peptidy T6 a T7. Za podmínek, které jsou použity pro štěpení trypsinem,

10

peptidová vazba Arg-73-Asn-74 v nedeamidované lidské DNáze a peptidová vazba Arg-73-Asp-74 v Asp formě deamidované lidské DNázy jsou štěpeny trypsinem.

5 Nedeamidovaná DNáza v mapě štěpení trypsinem je tedy indikována přítomností peptidu T7 uvedeného v tabulce I, zatímco Asp-74 forma deamidované lidské DNázy je v této mapě indikována přítomností deamidovaného T7 peptidu, který se nazývá (D)T7. Tyto tři formy reportérové peptidy jsou označeny na obrázku 3. Naneštěstí trypsin pouze částečně štěpí peptidovou vazbu na C-konci T7, mezi zbytky 77 a 78, takže každý z reportérových peptidů T7, (D)T7 a T6-7 mají T8-konjugát, T7-8, (D)T7-8 a T6-7-8. Těchto šest reportérových peptidů
10 musí být tedy objasněno, aby se kvantitativně vyhodnotila deamidovaná lidská DNáza štěpením trypsinem. V zásadě peptidy (D)T7, (D)T7-8, T6-7 a T6-7-8 představují deamidovanou lidskou DNázu a peptidy T7 a T7-8 představují nedeamidovanou lidskou DNázu. Znalosti relativních poměrů těchto peptidů umožňují přímý výpočet rozsahu deamidace při přípravě frakce vzorku, kterou představuje deamidovaná DNáza, je potřeba znát molární poměry deamidovaných a nedeamidovaných částí.
15

Při způsobu mapování štěpením trypsinem existují dva další problémy, které musí být překonány. Jedním je chromatografický problém, druhým je problém detekce. Chromatografický problém spočívá v tom, že peptid T2 je eluován současně s peptidem T6-7, což zabraňuje integraci přesné plochy maxima tohoto peptidu indukujícího deamidaci. Tento problém lze překonat integrací chromatogramu získaného při 280 nm, neboť všech šest relevantních peptidů má alespoň jeden trypsinový zbytek (Tyr), takže silně absorbují při 280 nm, zatímco peptid T2 neobsahuje žádný Tyr nebo tryptofanový (Trp) zbytek a tedy při této vlnové délce absorbuje pouze zanedbatelně. Detekční problém spočívá v tom, že peptidy T6-7 a T6-7-8 obsahují po třech Tyr zbytcích, zatímco další čtyři peptidy pouze po jednom zbytku. Peptidy obsahující T6 mají tedy vyšší molární absorptivitu než peptidy, které obsahují pouze T7. Jednoduché srovnání ploch maxim vede tedy k tendenci přeceňovat obsah deamidovaných částí ve vzorku. Tento problém se překoná normalizováním ploch maxim šesti peptidů na počet Tyr zbytků v peptidu. Normalizování ploch maxim tímto způsobem v sobě zahrnuje to, že všechny tyrosinové zbytky v každém z peptidů
20 mají ekvivalentní chemické okolí, což je možná dobrý předpoklad u relativně malých peptidů, jako jsou ty, které jsou zde uvažovány. Po normalizaci se mohou srovnávat plochy maxim deamidovaných a nedeamidovaných peptidů, čímž se dojde k posouzení obsahu deamidované DNázy ve vzorku.
25

35

Příklad 2

Chromatografie na TCX

40 TCX-pryskyřice (katex s prodlouženým raménkem) na rozdíl od konvenčních katexů má polyiontové ligandy navázané na povrch oxidu křemičitého. O ligandech kolony LiChrospher^(R) 1000 SO₃⁻ (EM Separations, Gibbstown, New Jersey, USA) používaných v tomto příkladu se uvádí, že obsahují mezi 25 a 50 sulfopropyllovými skupinami podél polyethylenového základního řetězce, který je napojen na jeden konec povrchu oxidu křemičitého. TCX chromatogram vzorku rekombinantní lidské DNázy na koloně LiChrospher^(R) 1000 SO₃⁻ je uveden na obr. 5. Rekombinantní lidská DNáza se vyčistí z kultur buněk CHO transformovaných DNA kódující lidskou DNázu. Shak a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 9 198 (1990), Shak a spol.: spis mezinárodní patentové přihlášky č. WO 90/07 572 (publikované 12. července 1990).
45

50 Dvě získaná maxima byla spojena a podrobena několika analýzám, aby byla identifikována jako formy DNázy lišící se pouze zbytkem v poloze 74 aminokyseliny. Obrázek 6 ukazuje mapy štěpení trypsinem těchto dvou maxim izolovaných z TCX kolony. Tyto mapy potvrzují, že jde o deamidovanou a nedeamidovanou formu lidské DNázy. Mapa štěpení trypsinem také ukázala, že v prvním maximu z TCX dělení jsou přítomny obě formy deamidované DNázy (s Asp a iso-Asp v poloze 74 aminokyseliny). Tabulka II ukazuje specifické aktivity změřené pro tato
55

dvě maxima, které potvrzují vzájemný vztah mezi deamidací a specifickou aktivitou, na kterou je usuzováno z korelace uvedené na obr. 2, a dále podrobují identifikaci TCX frakci. Aktivita DNázové frakce byla stanovena testem s methylzelení (MG).

5

Tabulka II

Aktivity frakcí získaných z TCX kolony (koncentrace MG a ELISA jsou průměrem ze stanovení dvou vzorků).

10

vzorek	MG ($\mu\text{g/ml}$)	ELISA ($\mu\text{g/ml}$)	specifická aktivita
výchozí přípravek rekombinantní lidské DNázy (náplň)	8315	7828	1,06
TCX maximum 1 (deamidovaná)	85,3	119,7	0,71
TCX maximum 2 (nedeamidovaná)	149,2	99,4	1,50

Mutovaná forma lidské DNázy, která má zbytek Asp v poloze 74 aminokyseliny, se připravuje místně řízenou mutagenézí DNA kódující přírodní maturovanou DNázu. Tento mutant současně s prvním maximem získaným ve shora uvedené chromatografii, jak ukazuje obrázek 7.

15

Následující postup je postup s TCX LiChrospher^(R) 1000 SO₃⁻. Jiným TCX nosičem s podobnými použitím pro dělení deamidované a neamidované formy DNázy je TCX Fractogel^(R) (EM Separations, Gibbstown, New Jersey, USA). LiChrospher a Fractogel jsou registrované obchodní značky EM Industries, Inc. m Hawthorn, N.Y., USA nebo E. Merck, Darmstadt, SRN. Zdá se, že

20

nejlepší výsledky v dnešní době poskytují "silné" formy TCX (ať jde o DiChrospher nebo Fractogel), které mají funkční skupinu SO₃⁻.

Příklad 3

25

Postup plnění HPLC kolony nosičem LiChrospher^(R) 1000 SO₃⁻

a) Materiály a zařízení

30

1. Superúčinná skleněná kolona (1,0 cm krát 5,0 cm).

2. Plnicí pufr: 10mM octan sodný, 1mM chlorid vápenatý, upravit pH do 4,5 kyselinou octovou, zfiltrvat 0,2 μ filtrem.

35

3. Zásobní nádržka pro kolonu o obsahu 20 ml (Alltech díl č. 9501 nebo ekvivalentní).

4. Prázdná kolona z nerez oceli (4,6 mm krát 50 mm) s 0,5 μm uzavřenými fritami.

40

5. HPLC pumpa, která má schopnost udržovat tlak 14MPa (model Waters 510 nebo ekvivalentní).

b) Postup plnění

1. Definování pryskyřice:

45

a) Rozbalí se skleněná kolona s vysokou účinností (1,0 cm krát 5,0 cm) (základní objem: 3,93 ml pryskyřice). Pryskyřice se resuspenduje na objem 20 ml v průhledné, skleněné, uzavřené nádobce plnicím pufrem. Rozmíchá se na kaši tak, aby se vytvořila jednotná suspenze, která se rozdělí na dva 10 ml podíly. Ke každému podílu se přidá 10 ml plnicího pufru, takže se získají

50

suspenze o objemu přibližně 1,95 ml pryskyřice ve 20 ml plnicího pufru.

b) Pryskyřice se rozmíchá na kaši tak, aby se získala jednotná suspenze. Tato suspenze se nechá usazovat, dokud částice nevytvoří pevný základ na dně nádoby (2 až 4 hodiny). Supernatant, který obsahuje jemné částice, se pečlivě odlije.

c) K pryskyřici se přidá 20 ml plnicího pufu a zopakuje se stupeň ad b). Tento postup by se měl zopakovat alespoň čtyřikrát, aby se zajistilo odstranění všech jemných částíček pryskyřice.

2. Plnění kolony:

a) Spojí se prázdná HPLC kolona (4,6 mm x 50 mm) s plnicí zásobní nádobkou. Pryskyřice se rozmíchá ve 20 ml plnicího pufu.

b) Kašovitá pryskyřice se přidá do zásobní nádoby a rychle se uzavře. Plnicí pufr se pumpuje za tlaku, který nepřevyšuje 14 MPa. Průtok se upraví tak, aby plnicí tlak zůstal konstantní kolem 14 MPa a po stabilizování tlaku se nechá téci 15 minut. Kolona se odpojí a připojí se horní konec. Tato kolona se může používat přímo nebo se může skladovat v 0,02 % (hmotn.) azidu sodném.

U většiny vzorků, včetně DNázy připravené ve 150 mM chloridu sodném, není před injektováním vzorku na kolonu potřeba žádná příprava vzorku. Kolona se ekvilibruje octanovým puffem o pH 4,5, který obsahuje vápenaté ionty, vzorek se nanese na kolonu injekční jehlou a kolona se pak eluuje solným gradientem. Pro dělení deamidované od nedeamidované formy lidské DNázy v malém měřítku se použije následující postup. Poměry ploch maxim na výsledném chromatogramu jsou shodné s poměry deamidované a nedeamidované DNázy ve vzorku.

Stupeň 1:

Naplní se vzorek obsahující až 150 mM NaCl při pH až 9 do nádoby automatického zásobníku. Vzorky kapaliny kultury izolovaných buněk vyžadují úpravu pH na 4,5 a odstředování, aby se odstranily proteiny, které nejsou rozpustné v puffech používaných v tomto postupu.

Stupeň 2:

Dvě formy DNázy se dělí na HPLC za následujících podmínek:

kolona: TCX LiChrospher^(R) 1000 SO₃⁻ se opětovně naplní do kolony z nerezavějící ocele. Plní se kolona o rozměrech 4,6 x 50 mm a 4,6 x 150 mm, teplota kolony: teplota místnosti,

eluent A: 10 mM octan sodný, 1 mM chlorid vápenatý, pH 4,5,

eluent B: 1 M chlorid sodný v puffu A,

gradientový profil:

doba (min.)	% hmot. A	% hmot. B
0	100	0
4	100	0
30	30	70
30,1	5	95
37	5	95

průtok: 0,8 ml/min (50 mm kolona), 0,5 ml/min (150 mm kolona),

objem injektovaného vzorku: až 250 µl,

reekvilibrační doba kolony při 100 % hmotn. A: 20 min,

teplota komůrky automatického zásobníku vzorků: 5 °C,

5

detekce: absorbance při 280 nm.

Stupeň 3:

- 10 Integruje se chromatogram. Vypočte se podíl deamidovaných částí na základě ploch maxim dříve eluované deamidované DNázy vzhledem k celkové ploše obou forem.

- 15 TCX chromatografie poskytuje také prostředky pro dělení deamidované a nedeamidované DNázy ve velkém měřítku. Dělení ve velkém měřítku se výhodněji provádějí za jednodušších elučních podmínek než jsou shora popsané eluční podmínky pro analytická dělení obou forem DNázy v malém měřítku. Dělení ve velkém měřítku se tedy provádí na TCX nosiči Fractogel podle následujícího postupu:

Stupeň 1:

20

Kolona 31.6 (1,6 cm vnitřní průměr krát 15,7 cm výška) se naplní TCX nosičem Fractogel EMD SO_3^- 650M (EM Separations, Gibbstown, New Jersey, USA).

Stupeň 2:

25

DNázová náplň se diafiltruje ekvilibračním pufrem (30 mM octan sodný (NaOAc), 1 mM chloridem vápenatým (CaCl_2), 50 mM chloridem sodným (NaCl), pH 5). Ultrafiltrací se zahustí na objem 355 ml a koncentraci 2,5 mg/ml.

30

Stupeň 3:

Kolona se promyje 2,5 objemy kolony (CV) 2 % (hmotn.) hydroxidu sodného (NaOH).

Stupeň 4:

35

Kolona se promyje 2,5 CV předekvilibračního pufru (300 mM NaOAc, 1 M NaCl, pH 5).

Stupeň 5:

40

Kolona se promyje 2,5 CV ekvilibračního pufru.

Stupeň 6:

- 45 Kolona se naplní 1 až 1,3 g diafiltrované/ultrafiltrované DNázy (ze stupně 2). Po naplnění DNázou se začnou shromažďovat frakce eluentu z kolony.

Stupeň 7:

Kolona se promyje 5 CV ekvilibračního pufru.

50

Stupeň 8:

Kolona se promyje 5 CV promývacího pufru (25 mM sukcinát, 1 mM chlorid vápenatý, pH 5,3).

55

Stupeň 9:

Kolona se promyje 10 CV promývacího pufru o pH 5,4 (25 mM sukcinát, 1 mM chlorid vápenatý, pH 5,4).

Stupeň 10

Kolona se promyje 10 CV promývacího pufru o pH 6 (24 mM MES, 1 mM chlorid vápenatý, pH 6,0).

Stupeň 11:

Spojí se frakce shromážděné během stupňů 6 až 8. Získá se tak směs, která převážně obsahuje deamidovanou DNÁzu. Spojí se frakce shromážděné ve stupni 10. Získá se tak nedeamidovaná DNÁza. Frakce, které se shromáždí během stupně 9, obsahují směs dvou forem DNÁzy a mohou se recyklovat. Shora popsáný protokol je jedním příkladem použití TCX nosiče pro preparativní vyčištění dvou forem rekombinantní lidské DNÁzy způsobem, kterým je možno provádět izolaci vyčištěné deamidované a vyčištěné nedeamidované DNÁzy ve velkém měřítku.

Příklad 4

Chromatografie na heparinu a imobilizovaném analogu DNA. Na chromatogramech na obr. 8 jsou analýzy na koloně s nosičem TSK–Heparin (Toso Haas, Montgomeryville, Pensylvanie, USA) vzorků, které obsahují buď směs deamidovaných a nedeamidovaných forem lidské DNÁzy, vyčištěnou deamidovanou lidskou DNÁzu nebo vyčištěnou nedeamidovanou lidskou DNÁzu. Kolona s nosičem TSK–Heparin byla podrobena stejným podmínkám jako je shora popsáno pro analytickou TCX kolonu. Seřazené chromatogramy ukazují, že kolona s imobilizovaným heparinem dělí deamidovanou a nedeamidovanou formu DNÁzy.

Jak bylo shora uvedeno, jiným způsobem dělení deamidované a nedeamidované formy DNÁzy je používat kolonu, která obsahuje imobilizovaný analog DNA, který je rezistentní na hydrolyzu působením DNÁzy. Jedním příkladem tohoto přístupu ke koloně s imobilizovaným analogem DNA je syntéza fosforthoátového oligonukleotidu 5'–GCGCGCGCGCGCGCGCGCGC–NH₃^{–3}. Tato samo–doplňková sekvence se může anelovat na dvouvláknovou formu a navázat na Rainin HydroporeEP kolonu (Rainin Co., Woburn, Massachusetts, USA). Obrázek 9 ukazuje seřazené chromatogramy analýz vzorků, které obsahují buď směs deamidované a nedeamidované formy lidské DNÁzy, vyčištěné deamidované lidské DNÁzy, vyčištěné nedeamidované lidské DNÁzy nebo vyčištěné mutované lidské DNÁzy se zbytkem kyseliny aspartové (spíše než asparaginovým zbytkem) v poloze 74 aminokyseliny, z této kolony. Analýzy na této koloně se provádějí v pufru, který obsahuje 1 mM chlorid vápenatý a 5 mM MES při pH 6, a eluují se lineárním gradientem do 1M koncentrace chloridu sodného 20 minut při průtoku 1 ml/min. Jak je uvedeno na obrázku 9, za těchto podmínek se od sebe částečně oddělí deamidovaná a nedeamidovaná forma DNÁzy. Navíc se na této koloně rozdělí také dvě izomerní formy deamidované DNÁzy, které se liší v poloze 74 sekvence aminokyselin DNÁzy tím, že v této poloze mají buď kyselinu aspartovou nebo kyselinu izoaspartovou. Další výhodou tohoto chromatografického způsobu je tedy to, že umožňuje izolaci dvou izomerů, které vznikají při deamidaci lidské DNÁzy.

Příklad 5

Enzymatická aktivita deamidované lidské DNázy a nedeamidované lidské DNázy

- 5 Pro zkoumání vlivu deamidace na enzymatickou aktivitu lidské DNázy bylo použito několik analytických metod. Vyčištěná deamidovaná lidská DNáza a vyčištěná nedeamidovaná lidská DNáza pro použití v těchto studiích byly připraveny shora popsanou TCX chromatografií.

10 Podle jednoho způsobu stanovení enzymatické aktivity DNázy se syntetická dvouvláknová DNA o délce 25 párů nukleotidů na jednom konci označí dinitrofenolem (DNP) a na druhém konci biotinem. Hydrolyza substrátu DNázou se detekuje zachycením reakčních produktů na mikrotitrovací desce s jamkami potaženými protilátkou na DNP a kvantitativním vyhodnocením neporušené sondy streptavidin–křenuvou peroxidázou. Specifická aktivita stability vzorků byla korelována ($r^2 = 0,613$; $n = 5$) s rozsahem deamidace DNázy (v rozsahu 27 až 95 % hmot.). Extrapolace

15 lineární rovnice nejmenších čtverců poskytla očekávaný výsledek, že specifická aktivita deamidované lidské DNázy byla přibližně o 77 % nižší než nedeamidované lidské DNázy.

Jiný způsob stanovení enzymatické aktivity DNázy zahrnuje hydrolyzu chromogenního substrátu p–nitrofenyl–fenylofosfátu (PNPP), jak to popsali Liao a spol.: *Biochem. J.* **255**, 781 (1988). Kinetiky PNPP hydrolyzy lidskou DNázou jsou esovitě a odpovídají Hillově rovnici nelineární regrese. Tímto způsobem byla stanovena $V_{\max}$ plně deamidované lidské DNázy jako o 77 % menší než u nedeamidované lidské DNázy. Koncentrace substrátu pro polovinu maximální aktivity ($S_{0,5}$) se významně nelišila pro vzorky deamidované a nedeamidované lidské DNázy.

20

Jiným způsobem stanovení enzymatické aktivity DNázy je test popsáný Kunitzem: *J. Gen. Physiol.* **33**, 349 (1950), s výhodou modifikovaný tak, že enzymatická reakce se provádí při pH 7,0 až 7,5. Také podle tohoto způsobu byla enzymatická aktivita deamidované lidské DNázy nižší než aktivita nedeamidované lidské DNázy.

25

30

Příklad 6

In vitro skladování lidské DNázy

35 Lidská DNáza vyčištěná z rekombinantních buněk CHO se rozpustí na koncentraci 4 mg/ml v nepufrovaném vodném roztoku 150 mM NaCl a 1 mM CaCl_2 . Vzorky výsledného roztoku DNázy se pak přenesou do skleněných ampulek a ampulek z umělé hmoty. Byly použity dva různé typy ampulek z umělé hmoty, jeden vyrobený z umělé pryskyřice Dupont 20 (vyráběné E.I. du Pont de Nemours and Co., Inc., Wilmington, Delaware, USA), druhý vyrobený z umělé pryskyřice Escorene (vyráběné firmou Exxon Corp.). Obě tyto umělé hmoty jsou polyethylen o nízké hustotě. Mohou se však používat nádoby vyrobené z jiných umělých hmot, jako je polypropylen, polystyren nebo další polyolefiny. Ampulky obsahující roztok DNázy se skladují

40

buď při -70°C , 2 až 8°C nebo 25°C . Původně se deamidovalo 60 až 65 % hmotn. DNázy v roztocích.

45

Roztoky DNázy v ampulkách byly po počátečním uložení několikrát analyzovány, aby se stanovil rozsah deamidace DNázy. Výsledky těchto analýz jsou uvedeny v tabulce III.

Tabulka III

Deamidace (%hmotn.) rekombinantní lidské DNázy skladované ve skleněných ampulkách a ampulkách z umělé hmoty

vzorek	den	-70 °C	2 až 8 °C	25 °C
sklo	83	66	66	78
	174	63	66	81
Dupont 20	83	65	66	71
	174	63	63	70
Escorene	83	65	66	71
	174	64	62	70

Při skladování při teplotě -70 °C nebo při teplotě 2 až 8 °C nebyl po 83 a 174 dnech nalezen žádný rozdíl v množství deamidované DNázy v ampulkách z umělé hmoty a množství deamidované DNázy v ampulkách ze skla. V všech těchto případech množství deamidované DNázy v ampulkách bylo přibližně 64 % hmotn. (± 2 % hmotn.) z celkové DNázy.

Po 83 nebo 174 dnech skladování při teplotě 25 °C byl však nečekaně zjištěn rozdíl mezi množstvím deamidované DNázy v ampulkách z umělé hmoty a množstvím deamidované DNázy ve skleněných ampulkách.

Významně méně deamidované DNázy bylo přítomno v ampulkách z umělé hmoty. Zvláště po 83 dnech skladování při teplotě 25 °C bylo ve skleněných ampulkách zjištěno 78 % hmotn. deamidované DNázy, zatímco v ampulkách z umělé hmoty pouze kolem 70 % hmotn. Po 174 dnech skladování při 25 °C ve skleněných ampulkách bylo 81 % hmotn. deamidované DNázy, zatímco v ampulkách z umělé hmoty pouze kolem 71 % hmotn. deamidované DNázy z celkového množství DNázy.

Aniž by se brala v úvahu jakákoliv teorie nebo mechanismus, rozdíly v deamidacích DNázy v ampulkách ze skla a z umělé hmoty mohou být důsledkem rozdílného pH roztoku v ampulkách. Původní pH roztoku DNázy ve skleněných ampulkách bylo nepatrně vyšší než pH v ampulkách z umělé hmoty (přibližně 6,7 a 6,5). Hodnota pH roztoků DNázy ve skleněných ampulkách se časem nepatrně zvyšovala (na přibližně 6,9 po 83 dnech skladování při 25 °C a na přibližně 7,0 po 174 dnech skladování při téže teplotě), možná jako důsledek křemičitanů nebo iontů z povrchu skal rozpouštějících se v roztoku. Při vyšším pH se rychlost deamidace lidské DNázy zvyšuje. Jelikož nebylo vyhodnoceno, že k deamidaci lidské DNázy dochází při zvýšeném pH, uspořádáním tohoto vynálezu je připravovat a/nebo skladovat lidskou DNázu v roztocích, které mají kyselé pH, typicky 4,5 až 6,8 nejvýhodněji 5,0 až 6,8.

Významného zvýšení stability lidské DNázy v roztoku se tedy dosáhne tím, že se tento roztok DNázy umístí raději do ampulek z umělé hmoty než do ampulek skleněných. Časem zřetelně dochází k nižší deamidaci DNázy v ampulkách z umělé hmoty než v ampulkách skleněných. Toto zjištění může být zvláště důležité při výběru adjustace lidské DNázy pro terapeutické použití, kde je zvláště žádoucí, aby lidská DNáza byla skladovatelná po prodlouženou dobu bez významné ztráty enzymatické aktivity. Stejně užitečné budou i skleněné ampulky s neskleněnými potahy, například s vložkami z umělé hmoty. Co je důležité je to, aby se skladovaná DNáza vyhnula kontaktu se sklem, zvláště při skladování přesahujícím 15 až 30 dnů.

Předcházející popis podrobně specifikuje způsoby, které se mohou používat při praktickém využívání tohoto vynálezu. Jakmile existují podrobné specifické způsoby používané pro identifikování, charakterizování, dělení a používání čisté deamidované a nedeamidované lidské DNázy a další popis specifických modelových systémů, zručný odborník je schopen odvodit alternativní způsoby získání stejných informací využitím plodů tohoto vynálezu. I když předchází text je

jakkoliv podrobný, nebyl konstruován jako omezení celkového rozsahu tohoto vynálezu; spíše je rozsah tohoto vynálezu stanoven pouze zákonnou konstrukcí připojených nároků.

5

PATENTOVÉ NÁROKY

- 10 1. Způsob oddělování lidské DNÁzy deamidované v aminokyselinovém zbytku odpovídajícím Asn-74 původní lidské DNÁzy od nedeamidované lidské DNÁzy z jejich směsi, **v y z n a č u j í - c í s e t í m**, že se směs chromatografuje a formy DNáz se oddělují na nosiči pryskyřice s imobilizovaným kationtovým iontoměničem.
- 15 2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se směs chromatografuje a formy DNáz se oddělují na nosiči pryskyřice s imobilizovaným heparinem.
3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se směs chromatografuje a formy DNáz se oddělují na nosiči pryskyřice s nehydrolyzovatelným analogem DNA.
- 20 4. Čištěná částečně deamidovaná lidská DNÁza, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje lidskou DNÁzu nedeamidovanou v aminokyselinovém zbytku odpovídajícím ASn-74 přirozené lidské DNÁzy a lidskou DNÁzu deamidovanou v aminokyselinovém zbytku, kde je deamidovaná DNÁza přítomna v množství menším než 25 % hmotn., vztaženo na celkovou hmotnost DNÁzy v kompozici.
- 25 5. Čištěná částečně deamidovaná lidská DNÁza, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje lidskou DNÁzu nedeamidovanou v aminokyselinovém zbytku odpovídajícím ASn-74 přirozené lidské DNÁzy a lidskou DNÁzu deamidovanou v aminokyselinovém zbytku, kde je deamidovaná DNÁza přítomna v množství menším než 5 % hmotn., vztaženo na celkovou hmotnost DNÁzy v kompozici.
- 30 6. Čištěná částečně deamidovaná lidská DNÁza, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje lidskou DNÁzu nedeamidovanou v aminokyselinovém zbytku odpovídajícím ASn-74 přirozené lidské DNÁzy a lidskou DNÁzu deamidovanou v aminokyselinovém zbytku, kde je deamidovaná DNÁza přítomna v množství menším než 1 % hmotn., vztaženo na celkovou hmotnost DNÁzy v kompozici.
- 35 7. Farmaceutický DNázový prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje lidskou DNÁzu nedeamidovanou v aminokyselinovém zbytku odpovídajícím Asn-74 původní lidské DNÁzy a lidskou DNÁzu deamidovanou v aminokyselinovém zbytku, kde deamidovaná lidská DNÁza je přítomna v množství menším než 25 hmotn. % vztaženo na celkovou hmotnost DNÁzy v prostředku.
- 40 8. Farmaceutický DNázový prostředek podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že deamidovaná lidská DNÁza je přítomna v množství menším než 5 hmotn. % vztaženo na celkovou hmotnost DNÁzy v prostředku.
- 45

9. Farmaceutický DNázový prostředek podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že deamidovaná lidská DNÁza je přítomna v množství menším než 1 hmotn. % vztaženo na celkovou hmotnost DNÁzy v prostředku.
- 5
10. Farmaceutický DNázový prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje jako farmaceuticky účinnou složku deamidovanou DNÁzu podle nároku 4 a farmaceuticky přijatelný nosič.
- 10
11. Farmaceutický DNázový prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje jako účinnou složku nedeamidovanou lidskou DNÁzu podle nároků 5 a 6 a farmaceuticky přijatelný nosič.

15

10 výkresů

```

1 TCCTGCACAG GCAGTGCCTT GAAGTGCTTC TTCAGAGACC TTTCTTCATA
AGGACGTGTC CGTCACGGAA CTTACGAAG AAGTCTCTGG AAAGAAGTAT
1 SerCysThrG lySerAlaLe uLysCysPhe PheArgAspL euSerSerAM

101 ATATTCCAGA TTCTTGACAG CATTCTCGTC ATCTCTGAGG ACATCACCAT
TATAAGGTCT AAGAACTGTC GTAAGAGCAG TAGAGACTCC TGTAGTGGTA
35 IleProAs pSerOP*Gln HisSerArgH isLeuOP*Gl yHisHisHis

201 GGCCCTACTG CAGGGGGCCG TGTCCCTGAA GATCGCAGCC TTCAACATCC
CCGGGATGAC GTCCCCCGGC ACAGGGGACTT CTAGCGTCGG AAGTTGTAGG
68 AlaLeuLeu GlnGlyAlaV alSerLeuLy sIleAlaAla PheAsnIleG

301 GTGCAGATCC TGAGCCGCTA TGACATCGCC CTGGTCCAGG AGGTCAGAGA
CACGTCTAGG ACTCGGCGAT ACTGTAGCGG GACCAGGTCC TCCAGTCTCT
101 ValGlnIleL euSerArgTy rAspIleAla LeuValGlnG luValArgAs

401 CACCAGACAC CTATCACTAC GTGGTCAGTG AGCCACTGGG ACGGAACAGC
GTGGTCTGTG GATAGTGATG CACCAGTCAC TCGGTGACCC TGCCTTGTGCG
135 ProAspTh rTyrHisTyr ValValSerG luProLeuGl yArgAsnSer

501 GGACAGCTAC TACTACGATG ATGGCTGCCA GCCCTGCCGG AACGACACCT
CCTGTCGATG ATGATGCTAC TACCGACGCT CGGGACGCCC TTGCTGTGGA
168 AspSerTyr TyrTyrAspA spGlyCysGl uProCysGly AsnAspThrP

601 AGGGAGTTTG CCATTGTTCC CCTGCATGCG GCCCGGGGGG ACCGAGTAGC
TCCCTCAAAC GGTAACAAGG GGACGTACGC CGGGGCCCCC TGGCTCATCG
201 ArgGluPheA laIleValPr oLeuHisAla AlaProGlyA spArgValAl

701 GCTTGGAGGA CGTCATGTTG ATGGGCGACT TCAATGCGGG CTGCAGCTAT
CGAACCTCCT GCAGTACAAC TACCCGCTGA AGTTACGCCC GACGTCGATA
235 LeuGluAs pValMetLeu MetGlyAspP heAsnAlaGl yCysSerTyr

801 CCAGTGGCTG ATCCCCGACA GCGCTGACAC CACAGCTACA CCCACGCACT
GGTCACCGAC TAGGGGCTGT CGCGACTGTG GTGTCGATGT GGGTGCGTGA
268 GlnTrpLeu IleProAspS erAlaAspTh rThrAlaThr ProThrHisC

901 GTTCCCGACT CGGCTCTTCC CTTTAACTTC CAGGCTGCCT ATGGCCTGAG
CAAGGGCTGA GCCGAGAAGG GAAATTGAAG GTCCGACGGA TACCGGACTC
301 ValProAspS erAlaLeuPr oPheAsnPhe GlnAlaAlaT yrGlyLeuSe

1001 TGAAGTGAGC AGCCCCTCCC CACACCAGTT GAACTGCAG
ACTTCACTCG TCGGGGAGGG GTGTGGTCAA CTTGACGTC
335 LysOP*Al aAlaProPro HisThrSerO P*ThrAla

```

Obr. 1A

GACTACTTTT TTTTCTTTAA GCAGCAAAAG GAGAAAATTG TCATCAAAGG
 CTGATGAAAA AAAAGAAATT CGTCGTTTTT CTCTTTTAAAC AGTAGTTTCC
 *ThrThrPhe PheSerLeuS erSerLysAr gArgLysLeu SerSerLysAsp

 CATCTCAGGA TGAGGGGGCAT GAAGCTGCTG GGGGCGCTGC TGGCACTGGC
 GTAGAGTCCT ACTCCCCGTA CTTCGACGAC CCCC GCGACG ACCGTGACCG
 HisLeuArgM etArgGlyMe tLysLeuLeu GlyAlaLeuL euAlaLeuAla

 AGACATTTGG GGAGACCAAG ATGTCCAATG CCACCCTCGT CAGCTACATT
 TCTGTAAACC CCTCTGGTTC TACAGGTTAC GGTGGGAGCA GTCGATGTAA
 lnThrPheGl yGluThrLys MetSerAsnA laThrLeuVa lSerTyrIle

 CAGCCACCTG ACTGCCGTGG GGAAGCTGCT GGACAACCTC AATCAGGATG
 GTCGGTGGAC TGACGGCACC CCTTCGACGA CCTGTTGGAG TTAGTCCTAC
 pSerHisLeu ThrAlaValG lyLysLeuLe uAspAsnLeu AsnGlnAspAla

 TATAAGGAGC GCTACCTGTT CGTGTACAGG CCTGACCAGG TGTCTGCGGT
 ATATTCCTCG CGATGGACAA GCACATGTCC GGACTGGTCC ACAGACGCCA
 TyrLysGluA rgTyrLeuPh eValTyrArg ProAspGlnV alSerAlaVal

 TCAACCGAGA GCCAGCCATT GTCAGGTTCT TCTCCCGGTT CACAGAGGTC
 AGTTGGCTCT CGGTCGGTAA CAGTCCAAGA AGAGGGCCAA GTGTCTCCAG
 heAsnArgGl uProAlaIle ValArgPheP heSerArgPh eThrGluVal

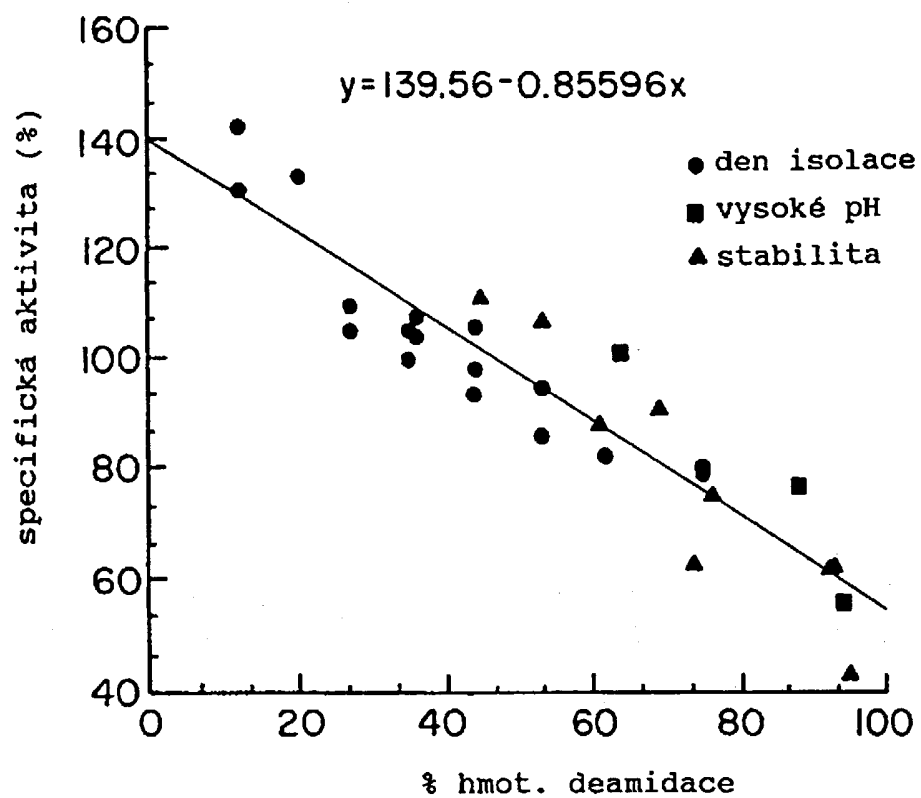
 CGAGATCGAC GCTCTCTATG ACGTCTACCT GGATGTCCAA GAGAAATGGG
 GCTCTAGCTG CGAGAGATAC TGCAGATGGA CCTACAGGTT CTCTTTACCC
 aGluIleAsp AlaLeuTyrA spValTyrLe uAspValGln GluLysTrpGly

 GTGAGACCCT CCCAGTGGTC ATCCATCCGC CTGTGGACAA GCCCCACCTT
 CACTCTGGGA GGGTCACCAG TAGGTAGGCG GACACCTGTT CGGGGTGGAA
 ValArgProS erGlnTrpSe rSerIleArg LeuTrpThrS erProThrPhe

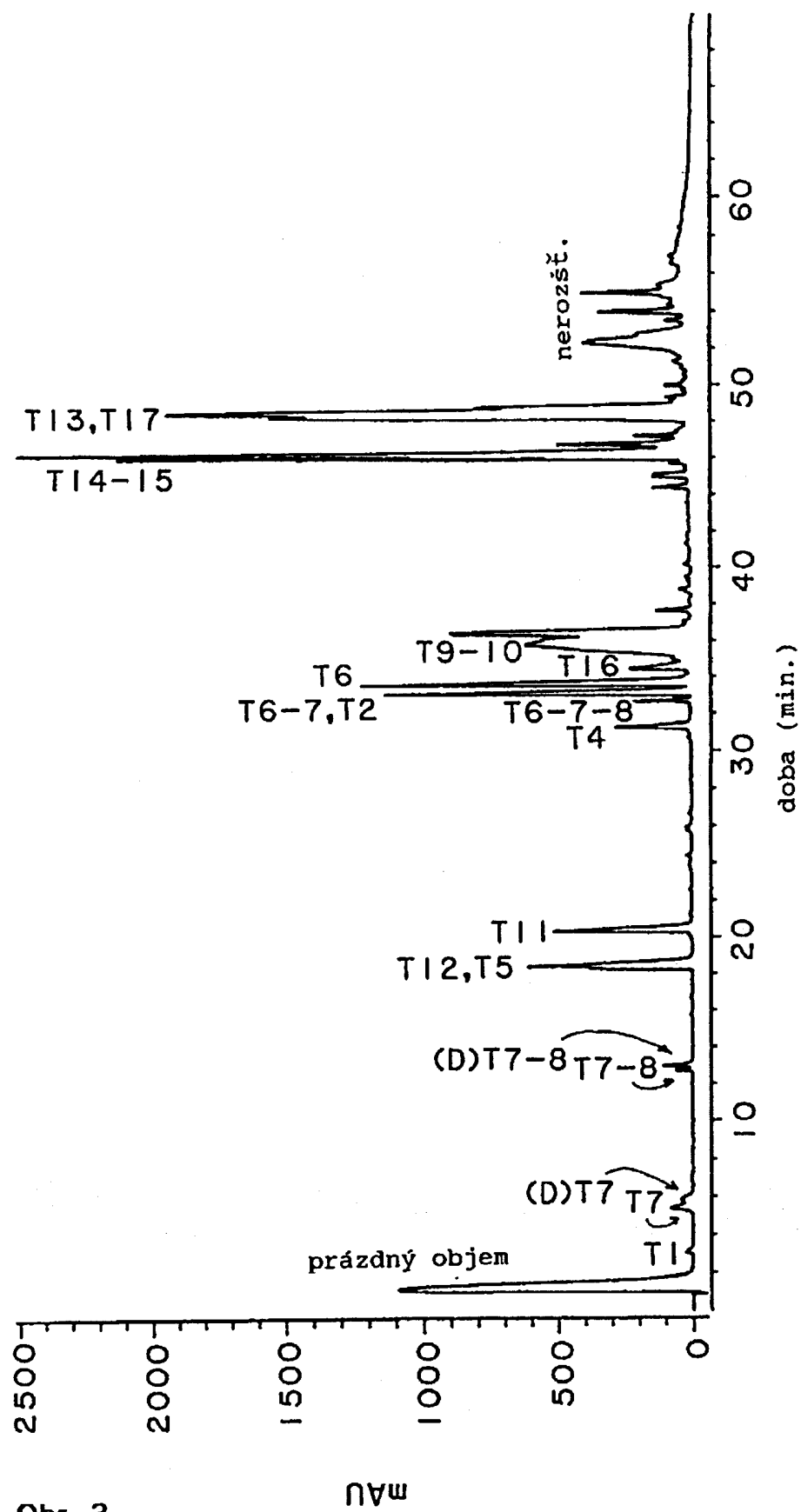
 GTGCCTATGA CAGGATCGTG GTTGCAGGGA TGCTGCTCCG AGGCGCCGTT
 CACGGATACT GTCCTAGCAC CAACGTCCCT ACGACGAGGC TCCGCGGCAA
 ysAlaTyrAs pArgIleVal ValAlaGlyM etLeuLeuAr gGlyAlaVal

 TGACCAACTG GCCCAAGCCA TCAGTGACCA CTATCCAGTG GAGGTGATGC
 ACTGGTTGAC CGGGTTCGGT AGTCACTGGT GATAGGTCAC CTCCACTACG
 rAspGlnLeu AlaGlnAlaI leSerAspHi sTyrProVal GluValMetLeu

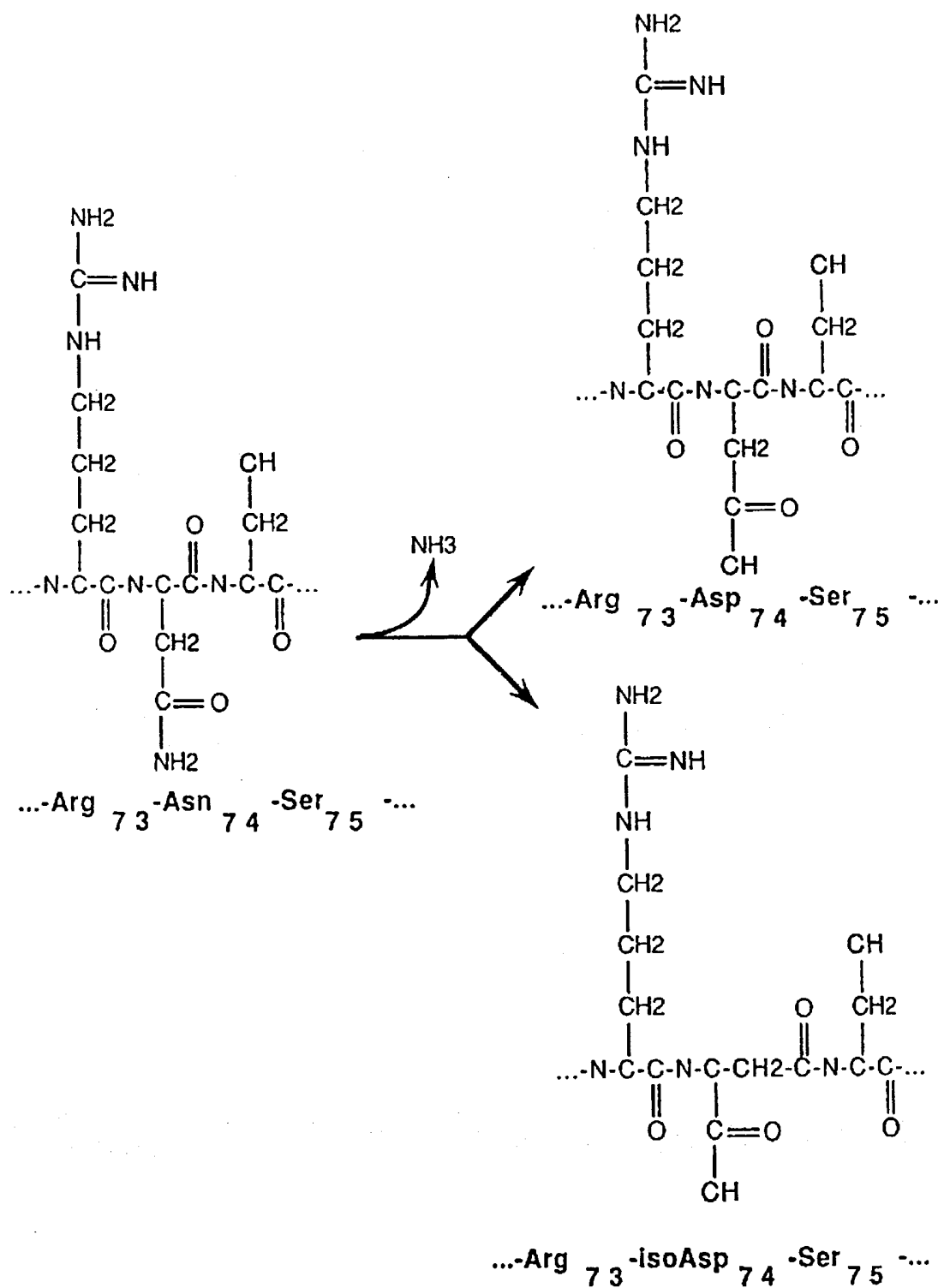
Obr. 1B



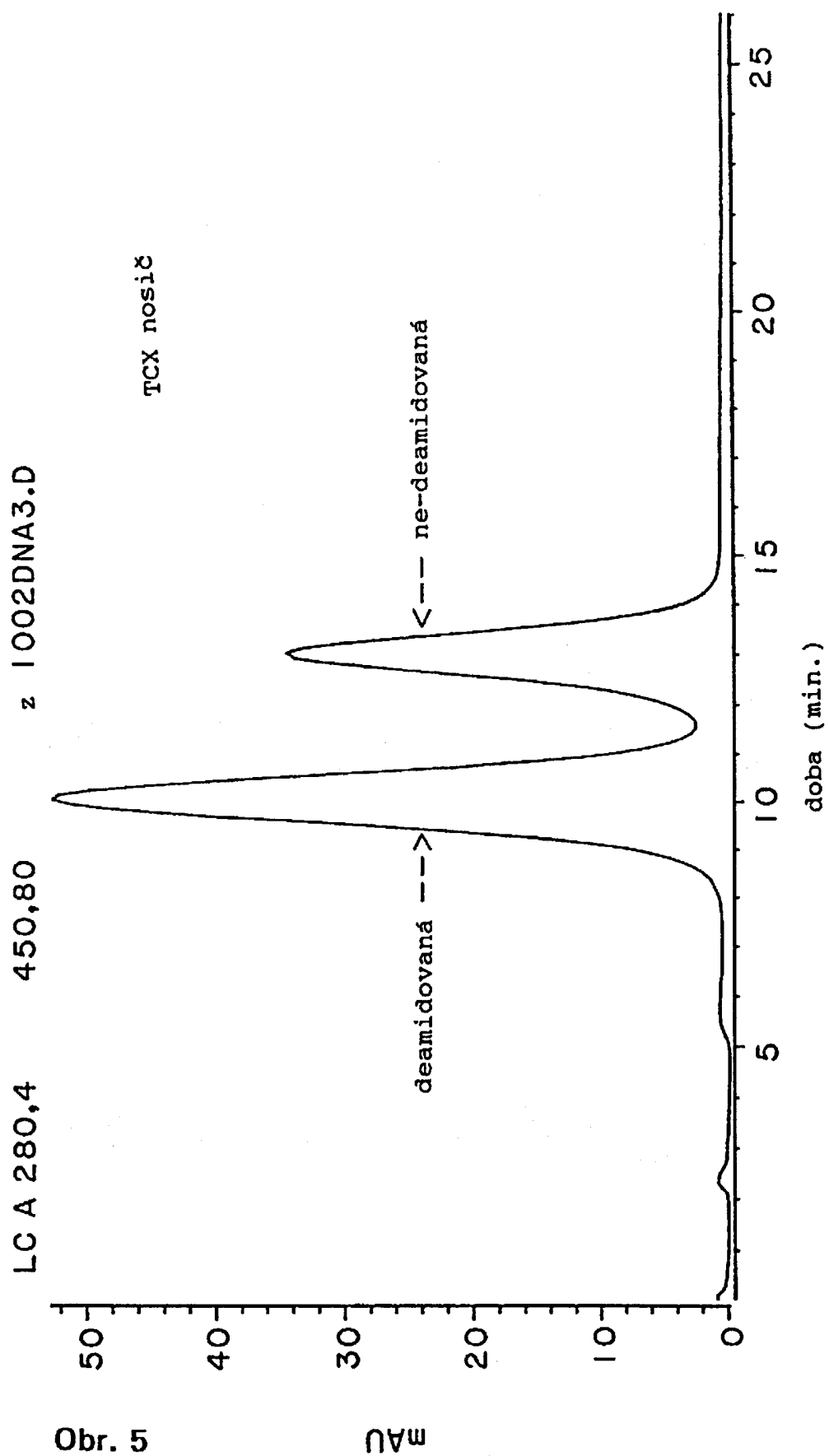
Obr. 2

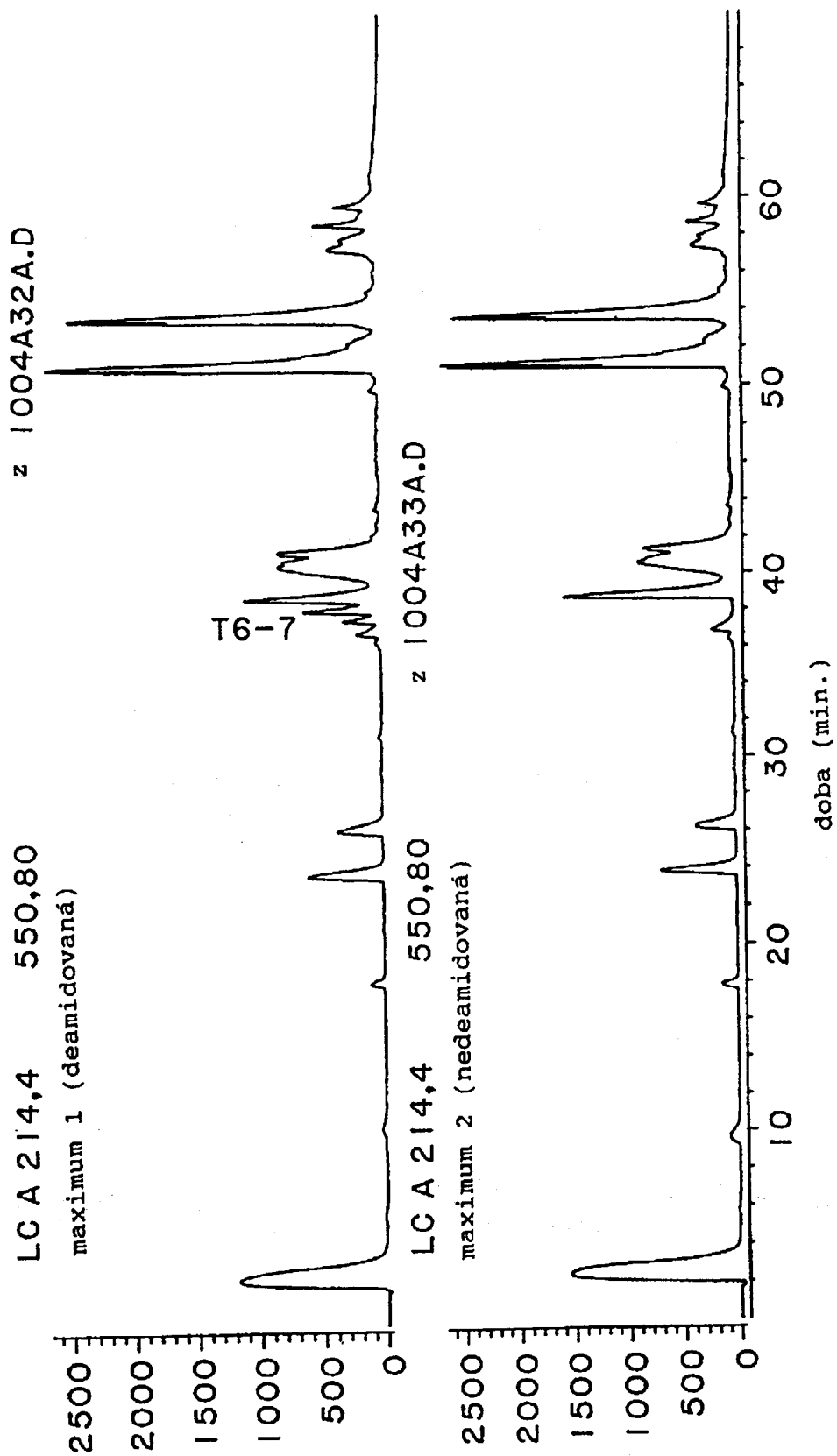


Obr. 3

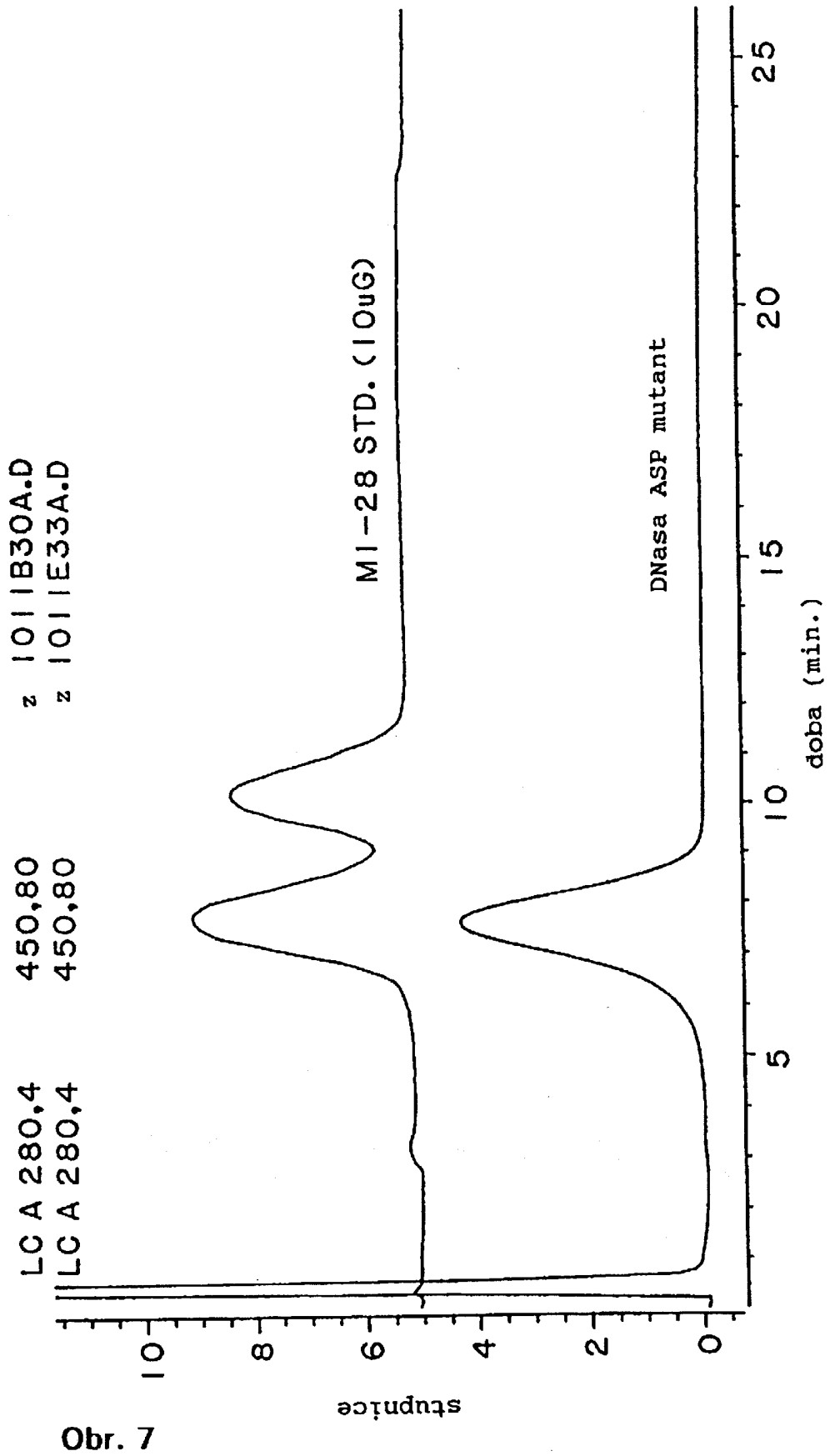


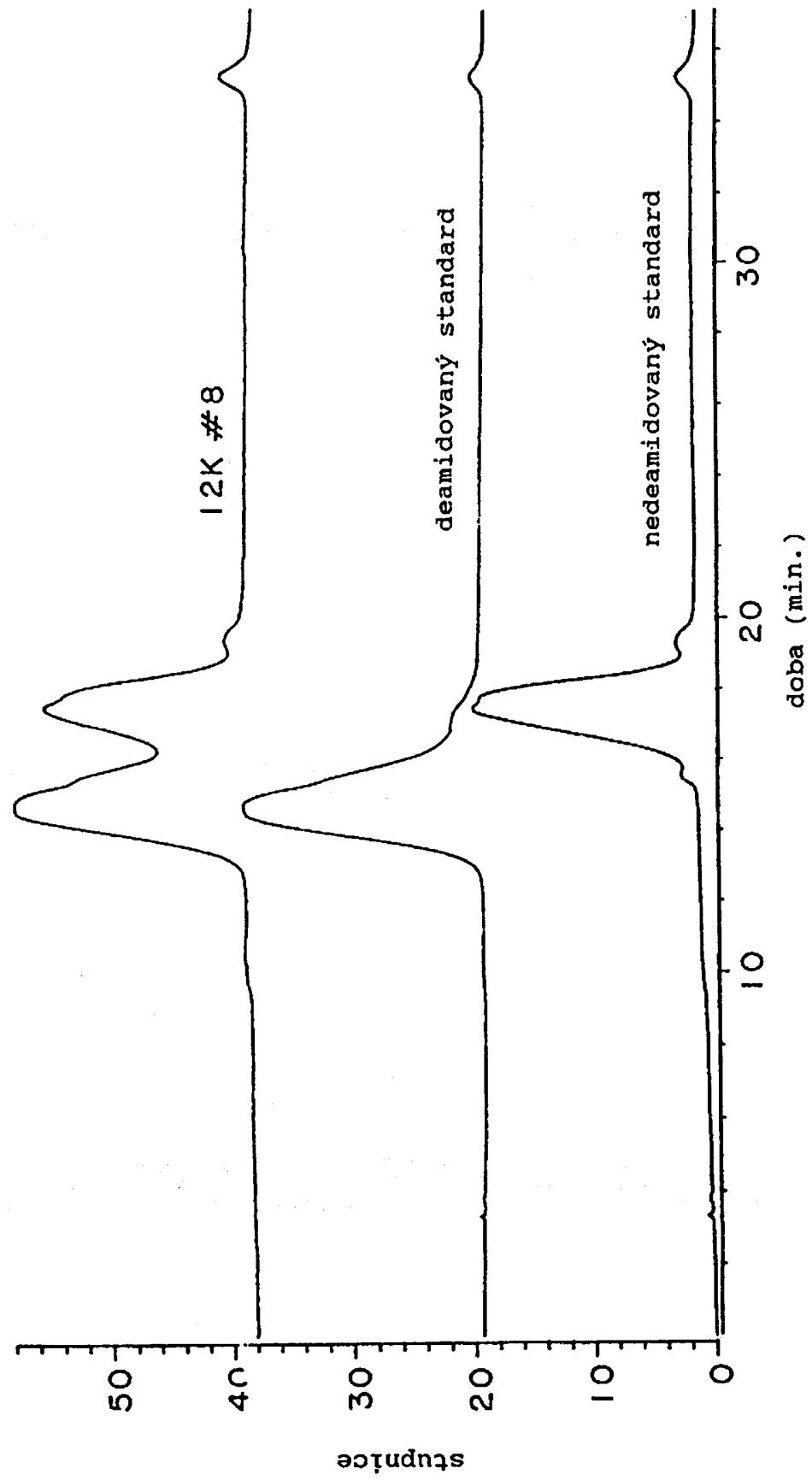
Obr. 4



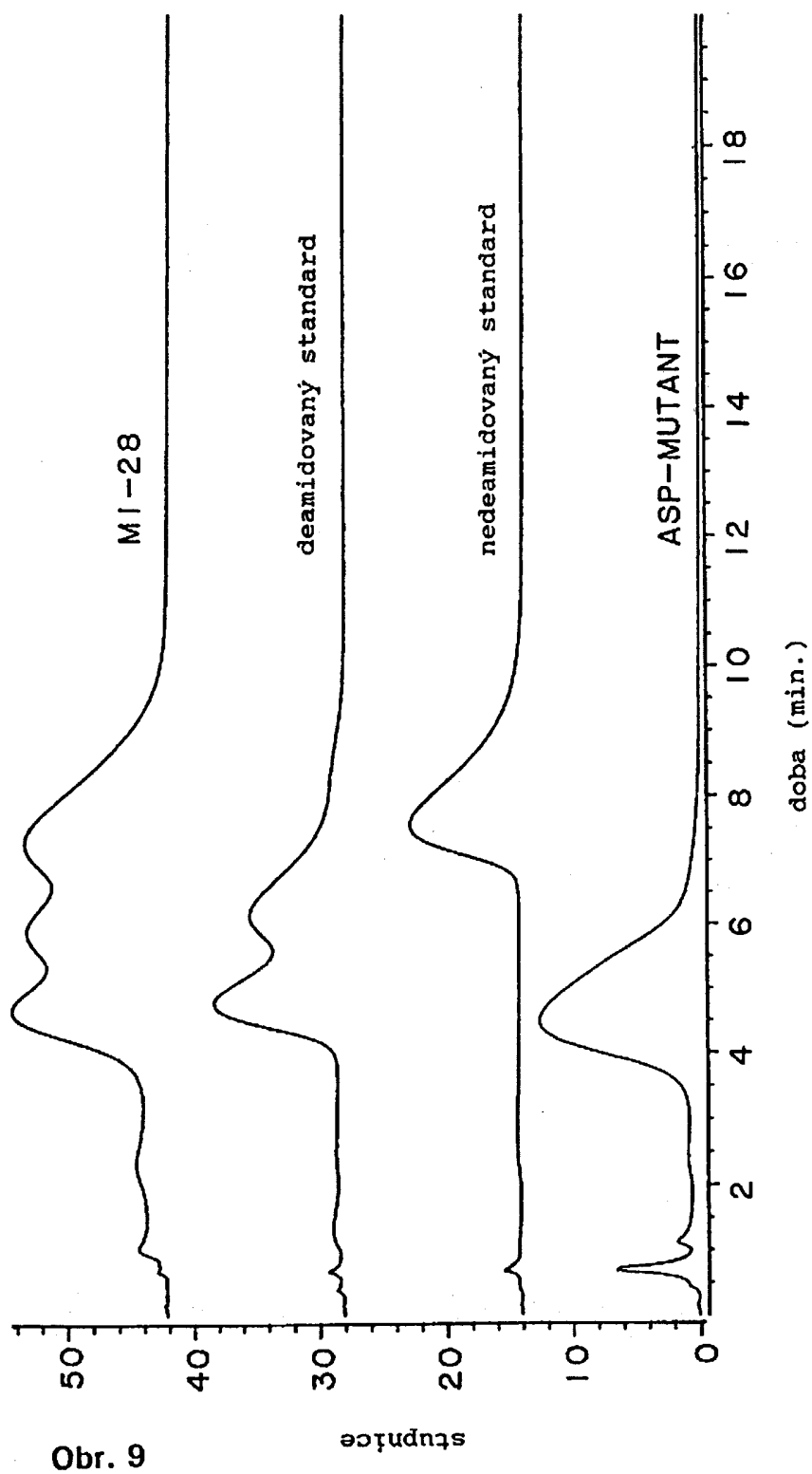


Obr. 6





Obr. 8



Konec dokumentu