

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 -75

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷ :

C 07 K 14/00

A 61 P 1/16

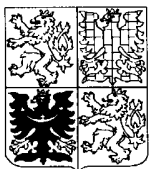
A 61 P 35/00

A 61 K 38/04

A 61 P 1/16

A 61 P 35/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.07.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.07.1997 30.12.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/121284 1997/122818**

(33) Země priority: **IL IL**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.08.2000**
(Věstník č. 8/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/IL98/00321**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/02552**

(71) Přihlašovatel:

YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
COMPANY LIMITED, Rehovot, IL;

(72) Původce:

Revel Michel, Rehovot, IL;
Chebath Judith, Rehovot, IL;
Lapidot Tsvee, Ness-Ziona, IL;
Kollet Orit, Ramat Gan, IL;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Chimérový rozpustný protein receptor/ligand
interleukinu-6, jeho analogy a použití**

(57) Anotace:

Chimérové proteiny konstruované fúzí přirozeně se vyskytující formy rozpustného receptoru IL-6 a IL-6, které jsou použitelné při léčbě zhoubného bujení a jaterních poruch, zlepšení transplantace kostní dřeně a léčbu jiných stavů spojených s IL-6.

CZ 2000 - 75 A3

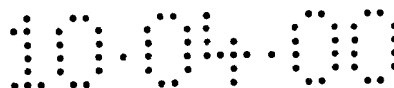
Chimérový rozpustný protein receptor/ligand interleukinu-6, jeho analogy a použití

Oblast techniky

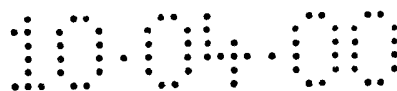
Vynález obecně popisuje biologické aktivity interleukinu 6 (IL-6), které závisí na agonistickém působení rozpustného receptoru IL-6 (sIL-6R). Vynález popisuje nové chimérové proteiny sIL-6R/IL-6 konstruované z fúze podstatně přirozeně se vyskytující formy sIL-6R a IL-6 a jejich biologicky aktivních analogů, které jsou zvláště použitelné v případě léčby zhoubného bujení prostřednictvím inhibice růstu karcinogenních buněk, transplantace kostní dřeně, léčby poruch jater a jiných stavů, které souvisí s IL-6.

Dosavadní stav techniky

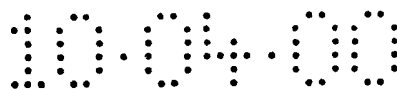
Interleukin 6 (IL-6) je dobře známý cytokin, jehož biologické aktivity zprostředkovává membránový receptorový systém, který obsahuje dva různé proteiny. Jeden se nazývá IL-6 Receptor (IL-6R nebo gp80) a druhý je gp 130 (Hirano T, Matsuda T and Nakajima K. Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. Stem Cells, 12: 262-277, 1994). Rozpustné formy IL-6R (sIL-6R) odpovídající extracelulární oblasti gp80 jsou přirozené produkty lidského těla a vyskytují se jako glykoproteiny v krvi a v moči (Novick D, Englemann H, Wallach D, Leitner O, Revel M and Rubinstein M. Purification of soluble cytokine receptors from normal urine by ligand-affinity and immunoaffinity chromatography. J. Chromatogr., 510:331-337, 1990; Novick D, Shulman LM, Chen L and Revel M. Enhancement of interleukin-6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibodies. Cytokine, 4:6-11, 1992). Výjimečnou vlastností molekul sIL-6R je, že působí jako silné



agonisty IL-6 u mnoha typů buněk. Uvedené buňky zahrnují lidské buňky (Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T and Kishimoto T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer gp130. *Cell*, 58: 573-581, 1989; Novick D, Shulman LM, Chen L and Revel M. Enhancement of interleukin-6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibodies. *Cytokine*, 4:6-11, 1992). To způsobuje skutečnost, že dokonce bez intracytoplazmatické oblasti gp80, je sIL-6R stále schopna spustit dimerizaci gp130, jako odezvu na IL-6, který naopak zprostředkovává podstatný transdukční signál specifický pro IL-6 a biologické účinky (Murakami H, Hibi M, Nakagawa N, Nagakawa T, Yasukawa K, Yamashi K, Taga T and Kishimoto T. IL-6 induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*, 260: 1808-1810, 1993). Komplex aktivního receptoru IL-6 ve skutečnosti vykazuje hexamérovou strukturu, kterou tvoří dva řetězce gp130, dva IL-6R a dva ligandy IL-6 (Ward L. D, Howlett G. J, Discolo G, Yasakawa K, Hammacher A, Moritz R. L and Simpson R. J. High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor and gp130. *J. Biol. Chem.*, 269: 23286-23289, 1994; Paonessa G, Graziana R, DeSerio A, Savino R, Caipponi L, Lahmm A, Salvati A. L, Toniatti C and Ciliberto G. Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp130 dimer formation and signalling. *EMBO J.*, 14: 1942-1951, 1995). sIL-6R má dva typy interakce s gp130, přičemž obě uvedené interakce jsou podstatné při biologické aktivitě specifické pro IL-6 (Halimi H, Eisenstein M, Oh J, Revel M and Chenath J. Epitop peptides from interleukin-6 receptor which inhibit the growth of human myeloma cells. *Eur. Cytokine Netw.*, 6: 135-143, 1995).

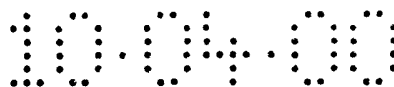


Léčba sIL-6R vede k zesílení biologické aktivity IL-6 u mnoha typů buněk. Příkladem jsou nádorové buňky, jejichž růst IL-6 inhibuje silněji v případě, že se přidá sIL-6R. Příkladem uvedených nádorových buněk jsou myši myeloleukémické buňky M1 (Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T and Kishimoto T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer gp130. *Cell*, 58: 573-581, 1989), lidské buňky T47D karcinomu prsu (Novick D, Shulman LM, Chen L and Revel M. Enhancement of interleukin-6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibodies. *Cytokine*, 4:6-11, 1992) nebo lidské buňky karcinomu plic (buňky „Non-small“) (Ganapathi M. K, Weizir A. K, Borsellino S, Bukowski R. M, Ganapathi S, Rice T, Casey G and Kawamura K. Resistance to Interleukin-6 in human Non-small cell lung carcinoma cell lines: Role of receptor components. *Cell Growth and Differentiation*, 7: 923-929, 1996). IL-6 vykazuje aktivitu proti tvorbě metastáz *in vivo* (Katz A, Shulman L. M, Porgador A, Revel M, Feldman M and Eisenbach L. Abrogation of B16 melanoma metastases by long-term low-dose Interleukin-6 therapy. *J. Immunother.* 13: 98-109, 1993), sIL-6R může také zesílit určité protinádorové účinky IL-6 *in vivo* (Mackiewicz A, Wiznerowicz M, Roeb E, Nowak J, Pawlowski T, Baumann H, Heinrich P and Rose-John S. Interleukin-6-type cytokines and their receptors for gene therapy of melanoma. *Ann. New York Acad. Sci.*, 762: 361-374, 1995). Další aktivita IL-6, k jejímuž zesílení dojde přidáním sIL-6R, stimuluje hematopoietické kmenové buňky, aby produkovaly vicerodové kolonie (Sui X, Tsuji K, Tanaka R, Tajima S, Muraoka K, Ebihara Y, Ikebuchi K, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T and Nakahata T. Gp130 and c-kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2859-2863, 1995). Také se pozorovalo, že sIL-6R a kombinace IL-6



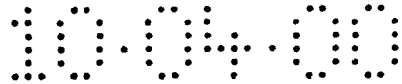
podporuje přežití primárních kultur mozkových oligodendrocytů (Oh J-W. Expression of recombinant soluble human interleukin-6 receptors and analysis of their functions. Ph.D Thesis Weizmann Institute of Science (Revel M, supervisor), 1997), zatímco samotný IL-6 je v takových kulturách pouze velmi málo aktivní (Kahn M. A and De Vellis J. Regulation of an oligodendrocyte progenitor cell line by the interleukin-6 family of cytokines. *Glia*, 12: 87-98, 1994). Toto zjištění ukazuje, že IL-6, jsetliže se kombinuje s sIL-6R, může napodobovat aktivitu jiných neurotrofních cytokinů, jako je ciliární neurotropický faktor (CNTF) nebo faktor inhibující leukemii (LIF), který také působí prostřednictvím gp130, jako se také děje v případě IL-11 a onkostatinu M (Hirano T, Matsuda T and Nakajima K. Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. *Stem Cells*, 12: 262-277, 1994).

Při pokusu vytvořit molekulu, která může kombinovat shora uvedené funkce IL-6 a sIL-6R, se popisuje produkce fúzního proteinu mezi zkráceným segmentem sekvence lidského IL-6R a IL-6 spojených s linkerem, který je bohatý na glycin, v rekombinantních buňkách kvasinek (Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff J. P. G, Kallen K-J, Wollmer A, Grotzinger J and Rose-John S. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature Biotechnology* 15: 142-145, 1997). Tento fúzní protein zahrnuje v podstatě pouze N-oblast receptoru cytokinu IL-6R a C-oblast receptoru cytokinu a tak mu chybí v podstatě celá oblast podobná imunoglobulinu (Ig) interleukinu IL-6R a pre-membránová oblast receptoru (oblast mezi C-oblastí a trans-membránovou doménou). To reprezentuje zkrácenou formu sIL-6R. Tento zkrácený sIL-6R je ve fúzním proteinu spojen prostřednictvím shora v textu uvedeného linkeru v podstatě s celou přirozenou formou IL-6. Vedle chybějících částí přirozeného sIL-6R, tento fúzní protein produkovaný v kvasinkách nemá glykosylační



patern, který by měl, kdyby se produkoval v savčích buňkách, zvláště například v lidských buňkách. Ve skutečnosti tento fúzní protein produkovaný v kvasinkách má molekulovou hmotnost pouze přibližně 57 000 na rozdíl od fúzního produktu, který obsahuje v podstatě celý přirozený sIL-6R a aminokyselinové zbytky IL-6 a je v savčích (například v lidských) buňkách zcela glykosylován. Jeho očekávaná molekulová hmotnost je přibližně 85 000 (popisuje se dále v textu v příkladu 2).

Běžná zkušenost při vývoji rekombinantních proteinů, které se mohou použít při léčbě lidských pacientů ukázala, že je důležité, aby rekombinantní proteiny zůstaly co nejvíce podobné jejich přirozeným formám, které se nacházejí v lidském těle. Důvodem je zabránit vývoji protilátek a jiným vedlejším účinkům, které je možné pozorovat při použití nepřirozených rekombinantních produktů. Z tohoto důvodu je výhodné při produkci glykosylovaných proteinů, jako je interferon- β nebo faktor stimulující kolonie granulocytů (Chernajovsky Y, Mory Y, Chen L, Merks Z, Novick D, Rubinstein and Revel M. Efficient constitutive production of hman fibroblast interferon by hamster cells transformed with the IFN- β 1 gene fused to an SV40 early promotor. DNA, 3: 297-308, 1984), které jsou svou chemickou formou co nejvíce podobné přirozenému lidskému produktu, použít rekombinantní savčí buněčné systémy. Bakterie nebo mikroorganismy, jako jsou například kvasinky, kde nedochází ke správné glykosylaci, také způsobují nesprávné svinutí proteinových řetězců, což vede k imunogenní reakci. To zvláště důležité s ohledem na IL-6, jehož molekula se silně upravuje postranslačně N- a O-glykosylací, stejně jako fosforylací (Revel M. Host defence against infections and inflammation: Role of the multifunctional IL-6/IFN- β 2 cytokine. Experientia 45: 549-557, 1989) a s ohledem na přirozený sIL-6R z lidské krve a moče, kterým je glykoprotein, jehož aminokyseliny N-konce a C-konce jsou konstantní a jsou známé (Novick D, Englemann H, Wallach D, Leitner O, Revel M



and Rubinstein M. Purification of soluble cytokine receptors from normal urine by ligand-affinity and immunoaffinity chromatography. J. Chromatogr., 510:331-337, 1990; a patent č. US 5,216,128 a odpovídající EP 413908 B1).

Proto se zdá, že shora uvedený fúzní produkt mezi částí sIL-6R a IL-6 má řadu nevýhod zvláště s ohledem na jeho použití při léčbě lidí. To je způsobeno skutečností, že mu chybí část sIL-6R a že při jeho produkci v kvasinkách, může dojít k nesprávné glykosylaci proteinu.

Proto fúzní molekula obsahující sIL-6R, který se nachází v lidských tělních tekutinách, a IL-6, který produkují lidské nebo jiné savčí buňky, není popsána.

Cílem vynálezu je proto vytvořit takovou fúzní molekulu, která obsahuje přirozený sIL-6R a přirozený IL-6 (v libovolném pořadí) a která vzniká v savčích buňkách.

Dále vynález popisuje použití fúzního proteinu (chimery sIL-6R/IL-6) k inhibici růstu silně metastázuujících buněk melanomu při velmi nízké koncentraci. Tyto buňky jsou rezistentní vůči IL-6 a samotnému sIL-6R.

Dále vynález popisuje použití takového fúzního proteinu (chimera sIL-6R/IL-6) k *in vivo* štěpům lidských hematopoietických kmenových buněk při způsobech transplantace kostní dřeně.

Dále vynález popisuje použití takového fúzního proteinu při dalších poruchách spojených s IL-6, jako je například poškození jater nebo neurologické poruchy.

Dále vynález popisuje farmaceutické kompozice, které obsahují shora uvedený přirozený fúzní protein sIL-6R-přirozený IL-6 (chimera sIL-6R/IL-6) při léčbě zhoubného bujení, při transplantaci kostní dřeně a při jiných poruchách spojených s IL-6. Jsou to například poruchy jater a neurologické poruchy.



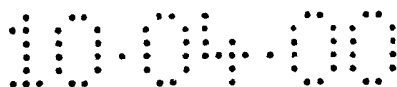
Podstata vynálezu

V souladu s vynálezem se připravilo velké množství fúzních proteinů (chimery), kdy každý protein obsahuje v podstatě všechny přirozeně se vyskytující sIL-6R z lidských tělních tekutin a v podstatě všechny přirozené formy přirozeně se vyskytujících lidských IL-6. Tyto fragmenty jsou spojeny krátkými linkerovými peptidy, které mohou tvořit pouze 3 a nebo více aminokyselinových zbytků (například 13 aminokyselinových zbytků) (popisuje se v příkladech 1 a 2). Mělo by se však poznamenat, že v těchto fúzních proteinech se mohou linkerové peptidy opomenout a část sIL-6R se může přímo spojit s částí IL-6. Protože linkery reprezentující nepřirozené aminokyselinové sekvence mohou být imunogenní epitopy vyvolávající u pacientů protilátky, upřednostňuje se použít přímo fúzovanou chimera sIL-6R/IL-6, která má požadovanou biologickou aktivitu a minimalizuje se nebezpečí vytvoření potenciálně nebezpečných protilátek v případě aplikace uvedené chiméry.

Za účelem redukce potenciální imunogenicity chimérového proteinového produktu je také důležitá konzervace celé sekvence sIL-6R zahrnující oblast podobné Ig, jak se nachází v přirozeně se vyskytující molekule, stejně jako správná glykosylace a jiné post-translační modifikace zavedené lidskými nebo savčím buňkami v případě, že uvedená chiméra se v takových buňkách tvoří.

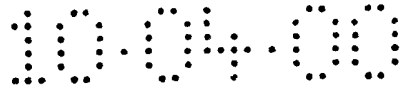
Ve spojovacím místě mezi částí sIL-6R a IL-6 chimérového proteinu je však možné použít velmi krátký linker o délce přibližně 3 aminokyselin. Tak krátký linker nebude působit jako imunogenní epitop. Je také možné pro spojení obou částí použít delší linkery, až o délce 30 aminokyselin, ale v tomto případě je nutné zaručit bezpečnost a biologickou účinnost, aby ze zjistilo, že chimérové molekuly nejsou imunogenní.

Ve skutečnosti se překvapivě ukázalo, že v souladu s vynálezem takové dlouhé linkery nejsou podstatné pro



aktivitu chimérového proteinu, což ukazuje, že správné svinutí chiméry nevyžaduje delší linker, zvláště když v podstatě všechny přirozeně se vyskytující sekvence částí sIL-6R a IL-6 jsou začleněny do chimérové molekuly (popisuje se například v příkladu 3 a na obrázku č. 5, které porovnávají chiméru sIL-6R/IL-6 vykazující velmi krátký linker (3 aminokyseliny) a podobnou chiméru s delším linkerem obsahujícím 30 aminokyselin).

Tyto fúzní proteiny nebo chiméry sIL-6R/IL-6 se účinně produkují v souladu s vynálezem v savčích buněčných expresivních systémech za vzniku glykosylovaných produktů, které mají potencionální aktivitu na nádorové buňky, jenž obvykle nejsou citlivé na IL-6 nebo samotný sIL-6R. Tyto proteiny zaručují úspěch při štěpech transplantovaných buněk lidské kostní dřeně (popisuje se dále v textu v příkladech 1 až 4). Ve skutečnosti v takových transplantátech kostní dřeně jsou chiméry sIL-6R/IL-6 podstatné pro přežití a proliferaci transplantovaných nedeterminovaných pluripotencionálních hematopoiетických kmenových buněk. Z experimentálních výsledků a dalších analýz vyplývá, že se mohou připravit různé analogy chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 podle vynálezu, které mají v podstatě stejnou biologickou aktivitu chiméry sIL-6R/IL-6. Tyto analogy jsou chiméry sIL-6R/IL-6, ve kterých se deletoval, přidal nebo substituoval jeden nebo více aminokyselinových zbytků. Existuje omezení takových analogů, musí obsahovat většinu přirozeně se vyskytující sekvence sIL-6R a IL-6. Například adice aminokyselin k sekvencím přirozeně se vyskytujících sIL-6R a IL-6 jsou přednostně omezeny na přibližně 20 aminokyselin. Přednostně tyto adice probíhají v místě spojení mezi sIL-6R a IL-6, to je v místě linkeru. Podobně delece sekvencí sIL-6R a IL-6 se přednostně omezují na 20 až 30 aminokyselin. Substituce aminokyselinových zbytků v sekvencích sIL-6R a IL-6 jinými aminokyselinovými zbytky jsou přednostně omezeny na 20 až 30 aminokyselin. Všechny tyto

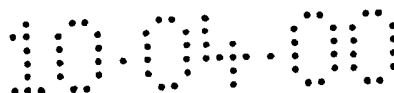


dříve v textu zmiňované delece, adice a substituce jsou přijatelné v souladu s vynálezem, když takto získané analogy exprimované v savčích buňkách si uchovávají v podstatě stejnou biologickou aktivitu jako chiméra sIL-6R/IL-6 obsahující v podstatě přirozeně se vyskytující sekvence a mají v podstatě stejný glykosylační patern chiméry složený z podstatě přirozeně se vyskytujících sekvencí.

Vynález popisuje chimérový glykosylovaný protein rozpustného receptoru interleukinu-6 (sIL-6R)-interleukin-6 (IL-6) (sIL-6R/IL-6) a jeho biologicky aktivní analogy. Uvedený protein a jeho analogy obsahují fúzní proteinový produkt mezi v podstatě celou přirozeně se vyskytující formou sIL-6R a v podstatě celou přirozeně se vyskytující formou IL-6. Uvedený sIL-6R/IL-6 a jeho analogy se glykosylují stejným způsobem jako probíhá glykosylace přirozeně se vyskytujícího sIL-6R a IL-6.

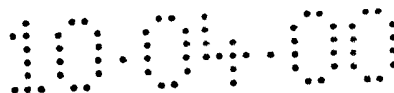
Provedení shora v textu uvedeného chimérového proteinu podle vynálezu zahrnuje:

- (i) Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy, kde uvedený sIL-6R se fúzuje s IL-6 prostřednictvím molekuly peptidového linkeru.
- (ii) Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy, jako v odstavci (i), kde uvedený linker je velmi krátký a není imunogenní a je tvořen 3 až 4 aminokyselinovými zbytky.
- (iii) Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy, jako v odstavci (ii), kde uvedený linker je tripeptid sekvence E-F-M (Glu-Phe-Met).
- (iv) Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy, jako v odstavci (i), kde uvedený linker je peptid tvořený 13 aminokyselinovými zbytky se sekvencí E-F-G-A-G-L-V-L-G-G-Q-F-M



(Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met) (SEQ ID NO: 1).

- (v) Chimérový protein sIL-6R/IL-6, který se označil sIL-6R δ Val/IL-6 a vykazuje tripeptidový linker se sekvencí E-F-M mezi C-terminální Val-356 sIL-6R a N-terminální Pro-29 IL-6. Uvedený chimérový protein má sekvenci uvedenou na obrázku č. 3.
- (vi) Chimérový protein sIL-6R/IL-6, který se označil sIL-6R δ Val/L/IL-6 a vykazuje peptidový linker v délce 13 aminokyselin se sekvencí E-F-G-A-G-L-V-L-G-G-Q-F-M mezi C-terminální Val-356 sIL-6R a N-terminální Pro-29 IL-6. Uvedený chimérový protein má sekvenci uvedenou na obrázku č. 3, kde tripeptid sekvence E-F-M mezi pozicemi 357-359 zobrazený na obrázku č. 3 je nahrazen peptidovou sekvencí uvedených 13 aminokyselin.
- (vii) Chimérový protein sIL-6R/IL-6, kde uvedený protein se produkuje v savčích buňkách ve zcela zpracované formě.
- (viii) Chimérový protein sIL-6R/IL-6, kde uvedený protein se produkuje v lidských buňkách.
- (ix) Chimérový protein sIL-6R/IL-6, kde uvedený protein se produkuje v buňkách CHO.
- (x) Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy, jak se uvádí shora v textu, kde uvedený chimérový protein a analogy se charakterizují tím, že jsou schopny inhibovat růst vysoce maligních rakovinových buněk.
- (xi) Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy, jak se uvádí shora v textu, kde uvedený chimérový protein a analogy se charakterizují tím, že jsou schopny inhibovat růst buněk vysoce maligního melanomu.



(xii) Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy, jak se uvádí shora v textu, kde uvedený chimérový protein a analogy se charakterizují tím, že jsou schopny umožnit *in vivo* štěpy lidských hematopoietických buněk při transplantaci kostní dřeně.

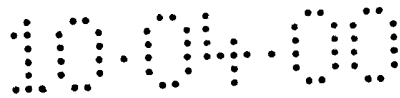
(xiii) Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy, jak se uvádí shora v textu, kde uvedený chimérový protein a analogy se charakterizují tím, že jsou schopny chránit játra proti působení hepatotoxických činidel.

Vynález dále popisuje sekvenci DNA kódující chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy, jak se popisuje shora v textu.

Vynález dále popisuje vektor DNA obsahující sekvenci DNA kódující chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy podle vynálezu, jak se popisuje shora v textu. Uvedený vektor je vhodný pro expresi uvedeného chimérového proteinu v savčích buňkách.

Provedení vektoru DNA podle vynálezu zahrnuje:

- (i) Vektor DNA, který je vhodný pro expresi uvedeného chimérového proteinu v lidských buňkách.
- (ii) Vektor DNA, který se exprimuje v savčích nebo lidských buňkách, přičemž exprimovaný chimérový protein má sekvenci, která umožňuje plné zpracování chimérového proteinu savčí nebo lidskou buňkou a vylučování zcela upraveného proteinu z buněk do kultivačního média, ve kterém se uvedené buňky kultivují.
- (iii) Vektor DNA, jak se popisuje shora v textu označený jako plazmid pcDNAsIL-6R/IL-6 obsahující vektor pcDNA3, jenž zahrnuje DNA sekvenci kódující chimérový protein sIL-6R/IL-6, který řídí cytomegalovirový promotor (CMV).



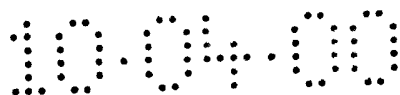
(iv) Vektor DNA, jak se popisuje shora v textu označený jako plazmid sIL-6R/L/IL-6 obsahující vektor pcDNA3, který zahrnuje sekvenci DNA kódující chimérový protein sIL-6R/IL-6, jenž je řízen cytomegalovirovým promotorem (CMV) a kde uvedená sekvence DNA kódující uvedený chimérový protein sIL-6R/IL-6 se začlenila do linkerové sekvence kódující linkerový peptid v restrikcčním místě EcoRI umístěném mezi sekvencí kódující část sIL-6R a sekvencí kódující část IL-6 proteinu.

Podobně vynález popisuje transformované savčí buňky obsahující vektor DNA, jak se popisuje shora v textu, který je schopen exprimovat sekvenci chimérového proteinu sIL-6R/IL-6, kterou nese uvedený vektor, a úpravy exprimovaného proteinu a jeho vylučování do kultivačního média, ve kterém se uvedené buňky kultivují.

V provedení těchto transformovaných buněk podle vynálezu se popisují lidské embryonální buňky ledvin 293 (HEK293) transfekované vektorem pcDNA sIL-6R/IL-6. Uvedené buňky jsou schopny exprimovat chimérový protein sIL-6R/IL-6, zcela upravit uvedený protein a vylučovat ho do kultivačního média, ve kterém se uvedené buňky kultivují. Uvedený protein je ve formě glykoproteinu o velikosti 85 000.

V jiném provedení transformovaných buněk podle vynálezu se popisují buňky CHO (buňky vaječníků čínských křečků) transfekované vektorem pcDNA sIL-6R/IL-6. Uvedené buňky jsou schopny exprimovat chimérový protein v zcela upravené formě do kultivačního média, kde buňky rostou. Protein se vyskytuje ve formě glykoproteinu o přibližné velikosti 85 000.

Vynález dále popisuje způsob produkce chimérového proteinu nebo jeho biologicky aktivních analogů, jak se popisuje shora v textu, který zahrnuje kultivaci dříve v textu popsanych transformovaných buněk za podmínek vhodných pro expresi, úpravu a vylučování uvedeného proteinu nebo analogů do

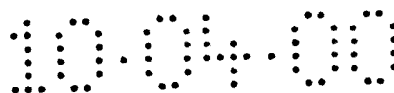


kultivačního média, ve kterém uvedené buňky rostou a čištění uvedeného proteinu nebo analogů z uvedeného kultivačního média imunoafinitní chromatografií za použití monoklonálních protilátek specifických pro sIL-6R.

Chimérový protein podle vynálezu má řadu použití, která zahrnují:

- (i) Použití chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 nebo jeho analogů nebo jejich solí a jejich směsi, jako inhibitoru rakovinových buněk.
- (ii) Použití, jak se popisuje v odst. (i) shora v textu, jako inhibitoru buněk silně maligního melanomu.
- (iii) Použití chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 nebo jeho analogů nebo jejich solí a jejich směsi, jako aktivní složky umožňující štěp lidských krvetvorných buněk při transplantaci kostní dřeně.
- (iv) Použití chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 nebo jeho analogů nebo jejich solí a jejich směsi, jako aktivní složky při zesílení krvetvorby při léčbě hepatických a neurologických poruch nebo při jiných aplikacích, kdy se používají IL-6 nebo sIL-6R.

Podobně se chimérový protein podle vynálezu může použít při přípravě medikamentů vhodných pro řadu medicínských indikací. Jmenovitě se chimérový protein sIL-6R/IL-6 nebo jeho ananlogy, jejich sole nebo jejich směsi mohou použít při přípravě medikamentů vhodných pro léčbu zhoubného bujení způsobem inhibice rakovinových buněk nebo při přípravě medikamentu vhodného pro zlepšení transplantace kostní dřeně způsobem umožňujícím štěp lidských krvetvorných buněk při transplantaci kostní dřeně nebo při přípravě medikamentu vhodného pro zesílení krvetvorby nebo pro léčbu neurologických poruch nebo pro aplikaci, tam kde se použije IL-6 nebo sIL-6R.



Vynález dále popisuje farmaceutickou kompozici obsahující jako aktivní složku chimérový protein sIL-6R/IL-6 nebo jeho analog, jak se popisuje shora v textu, a farmaceuticky přijatelný nosič, ředidlo a excipient.

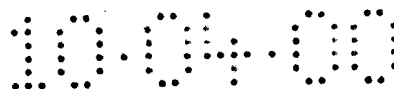
Provedení této farmaceutické kompozice podle vynálezu zahrnuje:

- (i) Farmaceutickou kompozici vhodnou pro léčbu zhoubného bujení u savců.
- (ii) Farmaceutickou kompozici vhodnou pro zlepšení transplantace kostní dřeně.
- (iii) Farmaceutickou kompozici pro léčbu poruch jater a neurologických poruch nebo po zesílení krevetvorby nebo pro jiné aplikace, při kterých se používá IL-6 nebo sIL-6R

Vynález dále popisuje způsob léčby zhoubného bujení u savců nebo zlepšení transplantace kostní dřeně nebo léčby jaterních a neurologických poruch nebo zesílení krevetvorby nebo jiné aplikace, při kterých se používá IL-6 nebo sIL-6R. Tyto aplikace zahrnují aplikaci pacientovi farmaceutické kompozice, jak se popisuje shora v textu, ve vhodné dávkové formě a vhodným způsobem.

Aby se předešlo pochybnostem, vynález popisuje chiméru mezi IL-6 a sIL-6R v libovolném pořadí. To znamená, že pořadí N-terminální a C-terminální části se může obrátit a chimérou je pak protein IL-6-sIL-6R, ačkoli se zde označuje jako protein sIL-6R/IL-6.

Vynález popisuje chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy, které v podstatě mají všechny přirozeně se vyskytující formy sIL-6R a v podstatě všechny přirozeně se vyskytující formy IL-6 fúzované dohromady. Fúze probíhá prostřednictvím linkerového peptidu, jehož délku mohou tvořit pouze 3 aminokyseliny. Chimérový protein a jeho analogy mají podobné množství a patern glykosylace, jako přirozeně se



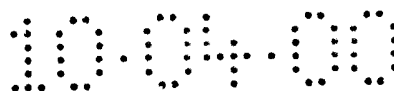
vyskytující sIL-6R a IL-6. Zjistilo se, že takový chimérový protein sIL-6R/IL-6 produkovaný v souladu s vynálezem v savčích buňkách, zvláště pak v lidských buňkách (popisuje se v příkladech 1 až 4 dále v textu) nebo v buňkách CHO (popisuje se v příkladu 6 dále v textu) se účinně exprimuje v uvedených buňkách, je vysoce glykosylován a vykazuje potencionální aktivitu na nádorové buňky, které nevykazují odezvu na žádný ze samotných IL-6 nebo sIL-6R.

V souladu s vynálezem se pozorovalo (popisuje se v příkladu 3 dále v textu), že dříve zmiňovaný chimérový protein sIL-6R/IL-6 podle vynálezu způsobuje zablokování růstu vysoce maligních savčích buněk, jako jsou buňky melanomu F10.9 v koncentracích, které jsou nižší, než jsou koncentrace nutné v případě, kdy se používá směs nefúzovaných sIL-6R a IL-6. To je zvláště podstatný výsledek s ohledem na skutečnost, že buňky melanomu F10.9 nepřestávají v normálním případě růst, když se aplikují odděleně pouze IL-6 a sIL-6R. K zablokování jejich růstu dojde pouze, když se vystaví relativně vysokým dávkám kombinace nefúzovaného IL-6 a sIL-6R.

Chimérový protein sIL-6R/IL-6 podle vynálezu je překvapivě silnější inhibitor těchto buněk maligního melanomu, než směs jeho oddělených částí. To znamená směs nefúzovaného sIL-6R a IL-6. Chimérový protein podle vynálezu je zvláště možné použít, jako aktivní složku léčby různých druhů zhoubného bujení.

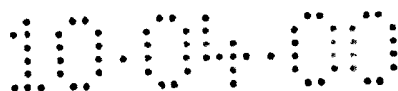
Vyšší aktivitu chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 způsobuje vyšší aktivita gp130 ve srovnání se směsí nefúzovaného IL-6 a sIL-6R (popisuje se v příkladu 7).

Dále se také zjistilo v souladu s vynálezem (popisuje se v příkladu 4 dále v textu), že chimérová molekula sIL-6R/IL-6 podle vynálezu je zvláště použitelná při zlepšení transplantace kostní dřeně. Použití známého protokolu pro provedení štěpu lidských buněk kostní dřeně u těžce imunodefictiních myši (SCID), kde faktor kmenových buněk (SCF)



a Flt3-ligand se používá pro umožnění přežití a pomnožení nejprimitivnějších pluripotenciálních krvetvorných kmenových buněk, umožňuje dlouho přetrvající štěp kostní dřeně. Zjistilo se, že tyto dva faktory SCF a Flt3-ligand nejsou dostatečné, aby vyvolaly štěp lidských buněk do kostní dřeně recipientních myši a že pouze po přidání chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 je štěp úspěšný. Toto zjištění indikuje, že chimérový protein může být podstatný při provedení takových protokolů pro zavádění štěpů. Ve stejných experimentech, když se přidaly odděleně nefúzovaný IL-6 a sIL-6R, se zjistilo, že nejsou dostatečné pro úspěšnou transplantaci kostní dřeně a když se přidaly společně, jsou daleko méně aktivní ve srovnání s chimérovým proteinem sIL-6R/IL-6. To znamená, že chimérový protein sIL-6R/IL-6 v koncentraci 100 ng/ml zaručil úspěšnou transplantaci kostní dřeně, zatímco dvě oddělené nefúzované části sIL-6R a IL-6 v případě, že se přidaly společně v dokonce ve vyšší koncentraci (koncentrace sIL-6R je v rozmezí 125 až 1259 ng/ml, koncentrace IL-6 je v rozmezí 50 až 200 ng/ml) jsou méně aktivní při průběhu uvedené transplantace.

Shora uvedený chimérový protein sIL-6R/IL-6 podle vynálezu je přednostně rekombinantní glykosylovaná chiméra sIL-6R/IL-6 produkovaná v lidských buňkách nebo v libovolném jiném savčím buněčném expresivním systému, jako jsou buňky křečků CHO, které jsou schopny glykosylovat proteiny, jak to provádějí lidské buňky a které také provádějí stejné post-translační modifikace. Důležitou charakteristikou je, že takto produkovaný chimérový glykoprotein se zpracovává a upravuje stejným způsobem, jako je tomu u přirozených molekul sIL-6R a IL-6, které se nacházejí v lidském těle, aniž dochází ke zkrácení a k přidání dalších nepřirozených polypeptidových sekvencí. Výjimku tvoří začlenění velmi krátkého tripeptidu nebo delšího linkerového peptidu mezi částí sIL-6R a IL-6 chimérového proteinu.



Aby se připravil shora uvedený preferovaný chimérový protein podle vynálezu, zvažují se následující rysy přirozeně se vyskytujících sIL-6R a IL-6:

Je známo, že IL-6R přítomný v lidských buněčných membránách se produkuje pomocí cDNA kódující 468 aminokyselin, která obsahuje signální peptid, oblast podobnou imunoglobulinu, oblast vázající cytokin, trans-membránovou oblast a cytoplazmatickou doménu (Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T and Kishimoto T. Cloning and expression of the human Interleukin-6 (BSF-2/Interferon beta-2) receptor. *Science*, 241: 825-828, 1988). Rozpustná forma sIL-6R se našla v tělních tekutinách, které mají, podobně jako zralý IL-6R z membrán, N-konec odpovídající Leu-20 (Novick D, Englemann H, Wallach D, Leitner O, Revel M and Rubinstein M. Purification of soluble cytokine receptors from normal urine by ligand-affinity and immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr.*, 510:331-337, 1990) a C-konec odpovídající Val-359 právě před trans-membránovou oblastí IL-6R (US patent č. 5,216,128 a EP 413.908 B1). Za účelem fúze sekvence sIL-6R s IL-6 se zavedlo za polohu Val-356 restriční místo EcoRI. Sekvence IL-6 začínající v poloze Pro-29 cDNA IL-6 a končící Met-212 (Zilberstein A, Ruggieri R, Korn H. J and Revel M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2 a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.*, 5: 2529-2537, 1986; Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashima S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu K, Tsunasawa S, Sakiyama F, Matsui H, Takahara Y, Taniguchi T and Kishimoto T. Complementary DNA for a novel interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulins. *Nature*, 234: 73-76, 1986) se zavedla tak, aby následovaly za tímto restričním místem EcoRI. V tomto restričním místě EcoRI se může také nacházet, ale ne nezbytně, linkerový peptid požadované délky, který od sebe



odděluje v chimérovém proteinu části sIL-6R/IL-6. Jak se popisuje v příkladech dále v textu, vytvořily se dva odlišné chimérové proteiny, jako příklady možných chimérových proteinů. Jeden má tripeptidový linker a druhý vykazuje linker s 13 aminokyselinovými zbytky v restričním místě EcoRI. Oba proteiny jsou v podstatě stejně biologicky aktivní.

Vynález také zahrnuje analogy shora uvedeného chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 podle vynálezu, jehož analogy si ponechávají v podstatě stejnou biologickou aktivitu chimérového proteinu, který má v podstatě pouze přirozeně se vyskytující sekvence sIL-6R a IL-6. Takovým analogem může být molekula s delecí 30 aminokyselinových zbytků, adicí nebo substitucí jiných zbytků v částech sIL-6R a/nebo IL-6 chimérového proteinu. Takové úpravy nemění podstatně biologickou aktivitu analogu chimérového proteinu s ohledem na samotný chimérový protein a část sIL-6R takových analogů si v podstatě ponechává přirozeně se vyskytující strukturu (před zpracováním, popisuje se na obrázku č. 3) signálního peptidu, oblasti podobné Ig, N-oblasti cytokinového receptoru, C-oblasti cytokinového receptoru a receptorové pre-membránové oblasti. Podobně takové analogy chimérového proteinu by si měly v podstatě zachovat přirozeně se vyskytující zralou formu části IL-6. Různé analogy se mohou od sebe a od základní molekuly chimérového proteinu (molekula obsahující v podstatě pouze přirozeně se vyskytující sekvence sIL-6R a IL-6) nejvíce lišit v místě linkerového peptidu, který spojuje části sIL-6R a IL-6. Takový linker může obsahovat až 30 aminokyselin a slouží k oddělení částí sIL-6R a IL-6 v chimérovém proteinu. Co se týče takového linkeru, je nutné pečlivě vybrat jeho sekvenci (a také provést biologické testy ve vhodných standardních testech s každým takovým analogem) tak, že nedojde například k nesprávnému svinutí chimérového proteinu, který by nebyl aktivní, nebo nedojde ke vzniku analogu chimérového proteinu, který je imunogenní a vyvolává tak u

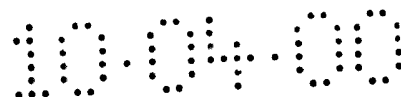


pacienta, kterému se aplikuje, protilátky nebo nevznikne analog, který by nebyl dostatečně účinný alespoň jako medikament s dlouhodobým nebo střednědobým účinkem.

Pokud jde o shora uvedené analogy chimérového proteinu podle vynálezu, jsou to analogy, kde jeden nebo více a až 30 aminokyselinových zbytků základního chimérového proteinu podle vynálezu se nahradí odlišnými aminokyselinovými zbytky nebo se deletují nebo jeden nebo více aminokyselinových zbytků se přidá k původní sekvenci chimérového proteinu podle vynálezu (kterou tvoří v podstatě pouze přirozeně se vyskytující sekvence sIL-6R a IL-6), aniž se podstatně změní aktivita výsledných produktů ve srovnání se základním chimérovým proteinem podle vynálezu. Tyto analogy se připravují známou syntézou a/nebo metodami místně řízené mutageneze nebo libovolnou jinou vhodnou známou metodou.

Libovolný takový analog má přednostně sekvenci aminokyselin dostatečně podobnou sekvenci základní chiméry sIL-6R/IL-6, aby vykazoval dostatečně podobnou aktivitu. Lze stanovit, zda libovolný daný analog má dostatečně stejnou aktivitu, jako základní chimérový protein podle vynálezu, způsoby rutinních experimentů. V takových experimentech se analog vystaví testům biologické aktivity, které se popisují dále v textu v příkladech 2 až 4.

Analogy chimérového proteinu, které se mohou použít v souladu s vynálezem, nebo nukleové kyseliny, které je kódují, zahrnují konečnou sadu dostatečně odpovídajících sekvencí, jako substituční peptidy nebo polynukleotidy, které může odborník běžně získat, aniž musí provést experimenty, na základě zde prezentovaných informací. Detailní popis chemie proteinu a struktury se uvádí v publikaci Schulz, G. E. et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York, 1978 a Creighton, T. E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1983. V publikaci Ausubel et al., paragraf A.1.1-A.1.24 a



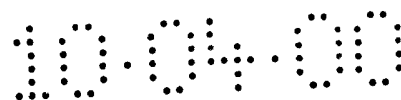
Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed. (1989), Cold Spring Harbor, New Yourk v dodatku C a D.

Preferované změny u analogů v souladu s vynálezem jsou ty, které jsou známy jako „konzervativní“ substituce. Konzervativní aminokyselinové substituce aminokyselin v chimérovém proteinu, který má v podstatě přirozeně se vyskytující sekvence sIL-6R a IL-6, zahrnují synonymní aminokyseliny ve skupině, která vykazuje dostatečně podobné fyzikálně chemické vlastnosti, přičemž substituce mezi členy skupiny zachová biologickou funkci molekuly (popisuje se v publikaci Grantham, Science, Vol. 185, pp. 862-864 (1974)). Je zřejmé, že začlenění a delece aminokyselin se může také provést do shora definovaných sekvencí, aniž se změní jejich funkce, zvláště jestliže začlenění nebo delece zahrnuje pouze několik aminokyselin, například méně než 30, upřednostňuje se méně než 10, přičemž se neodstraní nebo nenahradí aminokyseliny, které jsou nepostradatelné pro funkční konformaci, například cysteinové zbytky (popisuje se v publikaci Anfinsen, „Principles That Govern The Folding of Protien Chains,“ Science, Vol. 181, pp. 223-230 (1973)). Analogy produkované takovou delecí a/nebo inzercí vyplývají z vynálezu.

Přednostně, skupiny synonymních aminokyselin jsou ty uvedené v tabulce I. Více se upřednostňují skupiny synonymních aminokyselin uvedené v tabulce II a nejvíce se upřednostňují skupiny synonymních aminokyselin, které jsou definované v tabulce III.

Tabulka č. 1: Preferované skupiny synonymních aminokyselin

Aminokyselina	Synonymní skupina
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro



Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Tabulka č. II: Více preferované skupiny synonymních aminokyselin

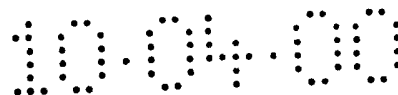
Aminokyselina	Synonymní skupina
Ser	Ser
Arg	Arg, Lys, His
Leu	Ile, Phe, Met, Leu
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Met, Ile, Val
Gly	Gly



Ile	Met, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Cys
His	Gln, Arg, His
Gln	Glu, His, Gln
Asn	Asp, Asn
Lys	Arg, Lys
Asp	Asn, Asp
Glu	Gln, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Tabulka č. III: Nejvíce preferované skupiny synonymních aminokyselin

Aminokyselina	Synonymní skupina
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Ile, Met, Leu
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Met, Leu, Ile
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Ser, Cys
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp

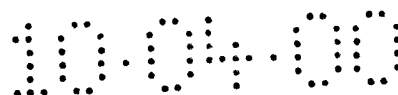


Glu	Glu
Met	Ile, Leu, Met
Trp	Met

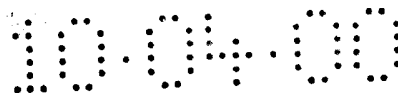
Příklady produkce aminokyselinových substitucí v proteinech, které se mohou použít za účelem získání analogů chimérového proteinu podle vynálezu zahrnují libovolné známé kroky metod, jak se popisují v US patentu RE 33,653, 4,959,314, 4,588,585 a 4,737,462 (Mark et al.), 5,116,943 (Koths et al.), 4,965,195 (Namen et al.), 4,879,111 (Chong et al.) a 5,017,691 (Lee et al.) a lyzinem substituované proteiny uvedené v US patentu č. 4,904,584 (Shaw et al.).

V jiném preferovaném provedení vynálezu má libovolný analog chimérového proteinu vhodný pro použití podle vynálezu aminokyselinovou sekvenci v podstatě odpovídající aminokyselinové sekvenci shora v textu uvedeného základního chimérového proteinu podle vynálezu. Termín „v podstatě odpovídající“ zahrnuje analogy s minoritními změnami sekvence základního chimérového proteinu, které neovlivňují jeho základní charakteristiky, zvláště jeho schopnost inhibovat proliferaci rakovinových buněk nebo podporovat transplantace kostní dřeně. Typ změn, které v obecném případě spadají do „v podstatě odpovídající“, jsou ty, které vznikly běžnými metodami mutagenese DNA kódující chimérový protein podle vynálezu, což vede k několika málo minoritním modifikacím a k testování požadované aktivity způsobem uvedeným shora v textu.

Analogy podle vynálezu zahrnují ty molekuly kódované nukleovou kyselinou, jako je DNA nebo RNA, která hybridizuje s DNA nebo RNA za přísných podmínek, kóduje chimérový protein v souladu s vynálezem a která obsahuje v podstatě všechny přirozeně se vyskytující sekvence kódující sIL-6R a IL-6. Takovými hybridizačními DNA nebo RNA mohou být například ty kódující stejný protein podle vynálezu, který vykazuje



například sekvenci uvedenou na obrázku č. 3, ale která se liší svou nukleotidovou sekvencí od přirozeně získané nukleotidové sekvence schopností degenerovat genetický kód. To znamená, že odlišná sekvence nukleové kyseliny může stále kódovat stejnou aminokyselinovou sekvenci, což způsobuje tato degenerace. Dále, jak je uvedeno shora v textu, množství změn aminokyselin (delece, adice, substituce) se omezuje až na přibližně 30 aminokyselin tak, že dokonce s maximálním množstvím změn analogy podle vynálezu budou ty, které si v podstatě zachovávají vedoucí sekvenci (před úpravou), oblast podobnou Ig, N- a C-oblasti cytokinového receptoru a receptorovou pre-membránovou oblast (oblast mezi C-oblastí a transmembránovou oblastí) v části sIL-6R a v podstatě celou část IL-6. Taková nukleová kyselina je primárním kandidátem pro stanovení, zda kóduje polypeptid, který si zachoval funkční aktivitu chimérového proteinu podle vynálezu. Termín „přísné podmínky“ znamená hybridizační a následné promývací podmínky, které odborník nazývá přísné (popisuje se v publikaci Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Interscience, N.Y., para 6.3 a 6.4 (1987, 1992) a Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Ed. (1989), Cold Spring Harbor, New York). Příklady přísných podmínek bez omezení zahrnují promývací podmínky při teplotě o 12 až 20 °C nižší než je vypočítaná T_m studovaného hybridu, například 2 x SSC a 0,5 % SDS po dobu 5 minut, 2 x SSC a 0,1 % SDS po dobu 15 minut; 0,1 x SSC a 0,5 % SDS při teplotě 37 °C po dobu 30 až 60 minut a pak 0,1 x SSC a 0,5 % SDS při teplotě 68 °C po dobu 30 až 60 minut. Odborník rozumí, že přísné podmínky také závisí na délce sekvencí DNA, oligonukleotidových sond (jako je 19 až 49 bází) nebo smíchaných oligonukleotidových sond. Jestliže se používají smíchané sondy, preferuje se použití tetramethylamoniumchloridu (TMAC) místo SSC (popisuje se v publikaci Ausubel, supra).

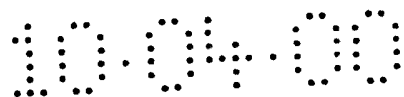


Termín „sole“ znamená sole karboxylových skupin a kyselinové adiční sole amino-skupin chimérového proteinu podle vynálezu nebo jejich analogy. Sole karboxylové skupiny se mohou tvořit způsobem, který je dobře znám v oboru, a zahrnují anorganické sole, například sole sodíku, vápníku, amoniaku, železa nebo zinku a podobně a sole s organickými bázemi, které vznikají například s aminy, jako je triethanolamin, arginin nebo lysin, piperidin, prokain a podobně. Kyselé adiční sole zahrnují například sole s minerální kyselinou, jako je například kyselina chlorovodíková nebo sírová a sole s organickými kyselinami, jako je například kyselina octová nebo kyselina šťavelová. Samozřejmě libovolné takové sole musí mít v podstatě stejnou aktivitu vztahující se k chimérovému proteinu podle vynálezu nebo k jeho analogům.

Vynález dále popisuje sekvence DNA kódující shora v textu uvedený chimérový protein podle vynálezu a jeho analogy, stejně jako vektory DNA nesoucí takové sekvence DNA vhodné pro expresi ve vhodných savčích buňkách. Upřednostňují se lidské buňky. Vektor podle vynálezu je plazmid pcDNA sIL-6R/IL-6 obsahující vektor pcDNA (Invitrogen) zahrnující fúzované sekvence sIL-6R/IL-6 řízené cytomegalovirovým promotorem (CMV).

Vynález také popisuje transformované savčí, přednostně lidské, buňky schopné exprimovat shora v textu uvedené proteiny podle vynálezu. Takové transformované buňky zahrnují lidské embryonální ledvinové buňky 293 (HEK 293, ATCC CRL 1573) transfekované pcDNA sIL-6R/IL-6, které vylučují fúzovaný chimérový glykoprotein sIL-6R/IL-6 o molekulové hmotnosti 85 000.

V dalším provedení vynálezu se popisuje plazmid pcDNA sIL-6R/L/IL-6, který se liší od shora v textu popsáního pcDNA sIL-6R/IL-6 začleněním krátkých linkerů, které kódují 10 dalších aminokyselin, do restrikčního místa EcoRI. Za účelem



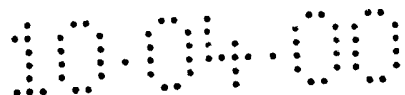
optimalizace vzdálenosti mezi sIL-6R a IL-6 je možné zavést řadu různých sekvencí různé délky.

Vynález také zahrnuje chimérový protein, ve kterém část IL-6 předchází sIL-6R (zobrazeno na obrázku č. 11).

Vynález dále popisuje způsob produkce a čištění chimérového proteinu podle vynálezu nebo jeho analogy, který zahrnuje kultivaci shora uvedených transformovaných buněk za podmínek vhodných pro expresi a vylučování chimérového proteinového produktu do kultivačního média a pak čištění vylučovaného proteinu imunoafinitní chromatografií za použití anti-sIL-6R monoklonálních protilátek 34.4, jak se popisuje v příkladu 2 a 5 dále v textu.

Vynález dále popisuje farmaceutickou kompozici obsahující jako aktivní složku chiméru sIL-6R/IL-6 nebo její analogy nebo jejich směsi nebo sole a farmaceuticky přijatelný nosič, ředidlo nebo excipient. Provedení farmaceutické kompozice podle vynálezu zahrnuje farmaceutickou kompozici pro zesílení působení typu IL-6, pro léčbu zhoubného bujení, pro transplantaci kostní dřeně, pro zesílení krvetvorby, pro léčbu neurologických poruch, pro léčbu poruch jater a pro jiné aplikace IL-6 nebo příbuzných cytokinů.

Farmaceutické kompozice podle vynálezu se pro aplikaci připravují smícháním chimérového proteinu nebo jeho analogů s fyziologicky přijatelnými nosiči a/nebo stabilizátory a/nebo excipienty a připravují se v dávkové formě například lyofilizací ve zkumavkách. Způsob aplikace se děje v libovolných přijatelných módech vhodných pro podobná činidla a bude záviset na stavu, který se léčí. Aplikace probíhá intravenózně, intramuskulárně, podkožně, lokální injekcí nebo povrchovým nanesením nebo nepřerušovaně infúzí atd.. Množství aktivní látky, která se má aplikovat závisí na způsobu aplikace, léčeném onemocnění a stavu pacienta. Lokální injekce například bude vyžadovat menší množství proteinu vzhledem ke hmotnosti ve srovnání s intravenózní infúzí.



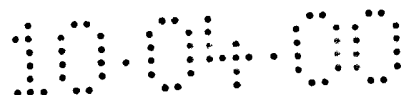
Vynález také popisuje použití chimérového proteinu podle vynálezu nebo jeho analogů nebo směsí pro léčbu zhoubného bujení, pro transplantace kostní dřeně, zesílení krevetvorby, pro léčbu neurologických stavů, pro ochranu tkáně jater u pacientů s nekrózou způsobenou chemikáliemi (například chlorid uhličitý, alkohol, paracetamol) nebo jiné případy (například virové, chirurgické nekrózy) a pro použití při jiných aplikacích IL-6 nebo příbuzných cytokinů. Podobně vynález popisuje chimérový protein nebo jeho analogy nebo směsi pro použití při přípravě medikamentů pro léčbu shora uvedených stavů nebo pro použití ve shora uvedených indikacích.

Vedle shora uvedených metod léčby vynález zahrnuje tako ex vivo postupy a genovou terapii s chimérou a/nebo s DNA ji kódující.

Popis obrázků na výkrese

Na obrázku č. 1 se nachází schéma různých vektorů, činidel a kroků používaných při konstrukci chimérové molekuly DNA kódující chimérový protein, ve kterém po konzervativní struktuře přirozené formy sIL-6R končící zbytkem Val 356 následuje sekvence přirozené, upravené formy IL-6. Detailněji se popisuje v příkladu 1.

Na obrázku č. 2 (A, B) jsou zobrazeny výsledky získané z analýzy, která se uskutečnila za účelem identifikace chiméry sIL-6R δ Val/IL-6 p86 elektroforézou na polyakrylovém gelu (A) a na základě profilu bioaktivity (B). Obrázek č. 2A ukazuje gel obarvený podle Comassie, na kterém se analyzovaly imunologicky čištěné frakce vymyté z kolony afinitní chromatografie, na kterou se naněsl vzorek vylučovaného proteinu získaného z buněčných kultur transfekovaných vektorem, který kóduje chimérový protein. Obrázek č. 2B zobrazuje graf biologické aktivity (inhibice růstu buněk melanomu F10.9) každé ze shora



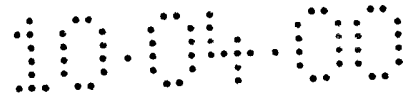
uvedených frakcí vymytých z kolon afinitní chromatografie. Detailněji se popisuje v příkladech 2 a 3.

Obrázek č. 3 znázorňuje aminokyselinovou sekvenci (jednopísmenný kód) chiméry sIL-6R δ Val/IL-6, kde jsou znázorněny různé oblasti molekuly zahrnující N-terminální signální peptid (linka nad sekvencí), oblast podobnou imunoglobulinu (Ig-like), N-oblast receptoru cytokinu (podtrženo), C-oblast cytokinu (linka nad sekvencí) a receptorovou pre-membránovou oblast (oblast mezi C-oblastí a trans-membránovou oblastí), celou část sIL-6R chiméry, stejně jako upravenou část IL-6 (podtrženo) chiméry, jak se popisuje v příkladu 1 a 2.

Na obrázku č. 4 (A, B) je fotografie melanomových buněk F10.9 v kultuře, aniž se aplikuje chimérový protein (A) a při aplikaci (B) chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 po dobu 4 dní. Na obrázku č. 4B jsou patrné morfologické změny vyvolané v takových buňkách metastáz melanomu (buňky F10.9) aplikací chiméry sIL-6R/IL-6, jak se popisuje v příkladu 3.

Na obrázku č. 5 je graf reprezentující výsledky inhibice růstu buněk melanomu F10.9 chimérovým proteinem sIL-6R/IL-6 při různých koncentracích chiméry, které se pohybují v rozmezí přibližně 0,12 ng/ml až 150 ng/ml, kde se chiméra s linkerem IL-6RIL-6 obsahující pouze 3 aminokyseliny, jak se popisuje v příkladu 3 porovnává s chimérou s linkerem obsahujícím 13 aminokyselin (IL-6RLIL-6).

Obrázek č. 6 je graf výsledků znázorňující absenci účinků inhibice růstu na buňky melanomu F10.9 při aplikaci buď samotného izolovaného IL-6 (čárkovaná horní křivka vyznačená prázdnými čtverci) při koncentraci v rozmezí 0 až 40 ng/ml IL-6 nebo samotného sIL-6R (bod konvergence všech křivek na vertikální ose, kde koncentrace IL-6 je nulová). Dále graf znázorňuje pozorované účinky inhibice růstu, kdy IL-6 a sIL-6R se přidá dohromady, ale v rozdílných koncentracích každé složky, kde koncentrace IL-6 je v rozmezí 10 ng/ml až 40 ng/ml



a sIL-6R se přidá ve třech koncentracích 100 ng/ml, 200 ng/ml a 400 ng/ml v případě každé koncentrace IL-6, což zobrazují tři spodní křivky (dvě přerušované značené křivky s prázdnými trojúhelníky a kolečky a křivka znázorněná nepřerušovanou čarou s plnými čtverci), jak se popisuje v příkladu 3.

Obrázek č. 7 znázorňuje autoradiogram Southernova blotu ukazující nutnost přítomnosti chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 při úspěšném štěpu lidských krvetvorných kmenových buněk během transplantace kostní dřeně u myši SCID-NOD (dvě dráhy po pravé ruce reprezentují myši, kterým se aplikoval chimérový protein sIL-6R/IL-6 spolu s dalšími nezbytnými faktory, SCF, FLT-3 a naopak tři dráhy po levé ruce reprezentují myši, kterým se aplikoval pouze SCF a FLT-3 a SCF, FLT-3 stejně jako izolovaný, to znamená ne fúzovaný, IL-6 a sIL-6R), jak se popisuje v příkladu 4.

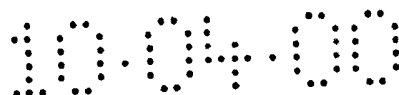
Obrázek č. 8 znázorňuje Scatchardův graf afinitních charakteristik chiméry sIL-6R/IL-6 ve srovnání se směsí IL-6 a sIL-6R. Hodnoty spojené s chimérou jsou označeny plnými čtverci a hodnoty spojené se směsí jsou označeny kosočtvercem, poměr sklonu je 4:1.

Obrázek č. 9 znázorňuje vyšší aktivitu chiméry sIL-6R/IL-6 v případě buňky melanomu F10.9 ve srovnání s jednou ze směsí sIL-6R + IL-6 nebo s jedním z sIL-6R (bez IL-6).

Obrázek č. 10 znázorňuje ochranu chimérou sIL-6R/IL-6 proti toxickým účinkům na játra. Hodnoty reprezentují průměr čtyř experimentů. Plné čtverce reprezentují myši IL-6-/-, plné kosočtverce reprezentují myši IL-6-/-, kterým se aplikoval IL-6 a plné hvězdy reprezentují myši IL-6-/-, kterým se aplikovala chiméra.

Příklady provedení vynálezu

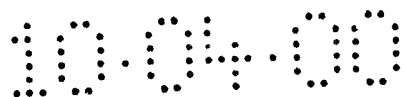
Příklad 1: Konstrukce expresivního vektoru chiméry sIL-6R δ Val/IL-6



Na obrázku č. 1 je zobrazeno schéma kroků při konstrukci expresivního vektoru, který nese sekvenci kódující chimérový protein sIL-6R δ Val/IL-6. Schéma zahrnuje všechny různé počáteční a intermediární vektory, různá činidla a reakční kroky. Postup konstrukce je v podstatě použitím metod, které jsou dobře známy v oboru a slouží ke konstrukci expresivních vektorů (popisuje se v publikaci Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Ed. (1989), Cold Spring Harbor, New York).

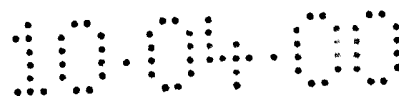
Knihovna cDNA z buněk T47D lidského karcinomu prsu se klonovala do bakteriofága lambda (λ)gt11 a testovala se oligonukleotidovými sondami odvozenými od sekvence IL-6R (popisuje se v publikaci Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T and Kishimoto T. Cloning and expression of the human Interleukin-6 (BSF-2/Interferon beta-2) receptor. *Science*, 241: 825-828, 1988). Izoloval se jeden klón cDNA (λ)gt11, který nese celou sekvenci kódující lidský IL-6R. Tento inzert se z (λ)gt11 vystříhl restričním enzymem EcoRI a klonoval se do vícenásobného klónovacího místa (MCS) fágemidu *E. coli* Blue Script pBS/SK (Stratagene Cloning Systems, LaJolla, California). Tento plazmid pBS/SK-IL-6R (obrázek č. 1) se štěpil restričním enzymem EcoRI, pak se konce fragmentu upravily na tupé konce a znovu se štěpil restričním enzymem EcoRV za vzniku 5' fragmentu IL-6R o velikosti 959 párů bazí (bp), který končí restričním místem EcoRV IL-6R (koordináta 1203). Tento fragment extrahovaný z agarózového gelu elektroforézy se klonoval do nového vektoru pBS/SK otevřeného v restričním místě EcoRV MCS (pBS/SK-sIL-6R-RV zobrazen na obrázku č. 1).

Jak se popisuje shora v textu, dříve získaná DNA pBS/SK-IL-6R se použila pro PCR za účelem amplifikace fragmentu o velikosti 368 bp mezi forvard primerem 1137-1156 a reverzním primerem 1505-1488. Reverzní primer se syntetizoval s restričním místem EcoRI, které bezprostředně následuje po



kodónu pro valin-356 IL-6R (zobrazeno na obrázku č. 1). Dříve se určilo, že valinový zbytek je aminokyselin C-konce přirozené formy rozpustného sIL-6R vylučovaného do lidské moči (Novick D, Englemann H, Wallach D, Leitner O, Revel M and Rubinstein M. Purification of soluble cytokine receptors from normal urine by ligand-affinity and immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr.*, 510:331-337, 1990; Oh J-W, Revel M and Clebath J. A soluble interleukin-6 receptor isolated from conditioned medium of human breast cancer cells is encoded by a differentially spliced mRNA. *Cytokine*, 8: 401-409, 1996; US patent č. 5,216,128 a EP patent č. 413908 B1). Produkt PCR se štěpil restričními enzymy EcoRV a EcoRI a ligoval se do pBS/SK-sIL-6R-RV mezi restriční místa EcoRV v IL-6R a EcoRI MCS (zobrazeno na obrázku č. 1). Výsledný plazmid pBS-sIL-6R- δ Val-RI se pak zkrátil tak, že se odstranily 5' nepřekládané sekvence ligací restričního místa HindIII MCS s místem NcoI v místě páru bází 410 IL-6R (konce obou míst se nejdříve upravila na tupé konce). Vznikl pBS-sIL-6R- δ Val-RI-NcoI (zobrazeno na obrázku č. 1).

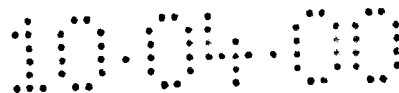
Sekvence IL-6 se získala z plazmidu pKK β 2-7, který se, jak se uvádí dříve (Chen L., Mory Y, Zilberstein A and Revel M. Growth inhibition of human breast carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines by recombinant interferon-beta 2/IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8037-8041, 1988) zkonstruoval inzercí cDNA IFN- β 2/IL-6 štěpené restričním enzymem BstNI (Zilberstein A, Ruggieri R, Korn H. J and Revel M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2 a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.*, 5: 2529-2537, 1986) do restričního místa EcoRI expresivního vektoru pKK223-3 *E. coli* (Pharmacia, Uppsala, Sweden) za použití syntetického oligonukleotidu s restričním místem EcoRI, po němž následuje kodón methioninu a kodón pro prolin-29 IL-6 a končící v restričním místě BstNI (EcoRII). Inzert cDNA IL-6 pKK β 2-7



končí 7 párů bazí po terminačním kodónu v místě NlaIV a o 11 bp dále následuje restriční místo HindIII vektoru pKK223-3 (zobrazeno na obrázku č. 1). DNA pKK β 2-7 se štěpila restričním enzymem HindIII. Konce fragmentu se upravily na tupé konce a fragment se znovu štěpil restričním enzymem EcoRI a cDNA IL-6 se začlenila do pBS-sIL-6R- δ Val-RI-NcoI tak, že fúzovala přirozená sekvence IL-6 (počátek v poloze prolin-29) bezprostředně po valinu-356 části IL-6R. Sekvence jsou odděleny pouze třemi kodóny (Glu-Phe-Met). Výsledný plazmid pBS/SK-sIL-6R/IL-6 (obrázek č. 1) se pak znovu štěpil v restričních místech SalI a NotI jeho MCS a inzerť se klónoval do restričního místa EcoRV pCDNA3 (Invitrogen Corporation, San Diego, California). Výsledný plazmid pCDNA3-sIL-6R/IL-6 (obrázek č. 1) obsahuje inzerť po směru exprese genu silného cytomegalovirového promotoru (CMV) a pak následuje polyadenylační místo, které zaručuje účinnou transkripci chiméry sIL-6R- δ Val/IL-6. Konzervace 5' konce sIL-6R v chiméře zaručuje, že při expresi v savčích buňkách je signální peptid funkční a zpracování N-konce chimérového proteinu bude stejné jako u přirozeného sIL-6R.

Jak se uvádí shora v textu výhodnou charakteristikou konstrukce sIL-6R- δ Val/IL-6 je, že je v podstatě fúzí přirozené formy sIL-6R a přirozené formy IL-6, jak se nacházejí v lidském těle, bez dalších peptidových sekvencí. Konzervace restričního místa EcoRI v konstrukci sIL-6R- δ Val/IL-6 (zobrazeno na obrázku č. 1) však jednoduše umožňuje zavést linkerové polypeptidové segmenty mezi částí sIL-6R a IL-6. Vytvořila se jedna taková konstrukce s linkerovou sekvencí obsahující 13 aminokyselin Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met zavedenou mezi Val-356 sIL-6R a Por-29 IL-6 (sIL-6R- δ Val/L/IL-6).

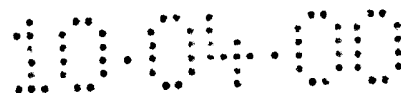
Příklad 2: Expese chiméry sIL-6R- δ Val/IL-6 v lidských buňkách



Za použití v podstatě standardních metod kultivace savčích buněk, transfekce buněk a analýzy transfekovaných buněk, kdy se zjišťovala exprese nově zavedené sekvence DNA (postupy se popisují například v publikaci Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Ed. (1989), Cold Spring Harbor, New York) se shora v textu uvedená plazmidová konstrukce (popisuje se v Příkladu 1) použila při transfekci lidských buněk a posuzovala se její exprese.

Lidské buňky HEK 293 (ATCC CRL 1573, transformované primární lidské embryonální ledvinové buňky) se transfekovaly konstrukcí pCDNA3-sIL-6R/IL-6 DNA (popisuje se v příkladu 1 shora v textu). Kultura buněk HEK 293 v log fázi se ošetřila trypsinem a buňky se nanesly na plotny Nunc o velikosti 9 cm ($2,5 \times 10^6$ buněk/plotnu). O jeden den později proběhla transfekce s 10 μ g pCDNA3-sIL-6R/IL-6 DNA postupem precipitace s CaPO_4 (popisuje se v publikaci Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Ed. (1989), Cold Spring Harbor, New York) a o hodinu později se kultivační médium nahradilo DMEM-10 % FCS a kultivace pokračovala po dalších 16 hodin. Po výměně kultivačního média za DMEM-10% FCS, se shromáždily vylučované proteiny během dvou po sobě jdoucích period o délce 48 hodin. Debris se odstranil centrifugací při 1000 ot./min. po dobu 10 minut a v supernatantu se testovala testem ELISA přítomnost sIL-6R za použití polyklonálních králičích protilátek proti sIL-6R a myších McAB 17.6 (Novick D, Engelmann H, Rvel M. Leitner O and Rubenstein M. Monoclonal antibodies to the soluble Il-6 receptor: affinity purifications, ELISA and inhibition of ligand binding. *Hybridoma*, 10: 137-146, 1991). Zjistila se přítomnost sIL-6R ekvivalentů v koncentraci 1,2 μ g/ml, což ukazuje na velmi účinnou expresi chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 v transfekovaných lidských buňkách.

Vylučovaný chimérový protein (sIL-6R/IL-6) se čistil imunologickou cestou pomocí monoklonálních protilátek 34.4



specifických pro epitop v extracelulární oblasti lidského sIL-6R (Novick D, Engelmann H, Revel M, Leitner O and Rubenstein M. Monoclonal antibodies to the soluble IL-6 receptor: affinity purifications, ELISA and inhibition of ligand binding. *Hybridoma*, 10: 137-146, 1991; Halimi H, Eisenstein M, Oh J, Revel M and Chenath J. Epitop peptides from interleukin-6 receptor which inhibit the growth of human myeloma cells. *Eur. Cytokine Netw.*, 6: 135-143, 1995). Buňky hybridomu 34.4 se kultivovaly v peritoneální dutině myši a imunoglobulinová frakce (Ig) se získala z ascitové tekutiny precipitací se síranem amonným. K imobilizaci McAB 34.4 se použil Affigel-10 (Bio-Labs, Richmond, California) (15 mg Ig se spojilo s 1 ml přípravku Affigel-10). Supernatanty obsahující proteiny vylučované z buněk HEK 293 transfekované pCDNA3-sIL-6R/IL-6 se adsorbovaly na kolony s McAB 34.4 (kolona o objemu 0,3 ml slouží pro 15 ml supernatantu). Po promytí PBS se navázané proteiny vymyly 25 mM kyselinou citronovou pH 2,5 a bezprostředně potom se neutralizovaly 1 M puforem HEPES pH 8,5. Přes noc proběhla dialýza (přibližně 8 až 12 hodin) proti PBS.

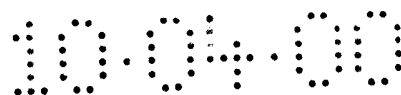
Analýza imunologicky čištěného proteinu elektroforézou na polyakrylovém gelu v SDS ukázala jediný proteinový pruh obarvený modří podle Coomassie (obrázek č. 2). Molekulová hmotnost proteinu je 85 000, jak se odhadlo z fúze glykosylované formy sIL-6R δ Val (v publikaci Oh J-W, Revel M and Clebath J. A soluble interleukin-6 receptor isolated from conditioned medium of human breast cancer cells is encoded by a differentially spliced mRNA. *Cytokine*, 8: 401-409, 1996; se uvádí molekulová hmotnost je 60 000) a glykosylované formy IL-6 (v publikaci Zilberstein A, Ruggieri R, Korn H. J and Revel M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2 a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.*, 5: 2529-2537, 1986; se uvádí molekulová hmotnost 23 000 až 26 000). Aminokyselinovou

sekvenci sIL-6R/IL-6 tvoří 543 aminokyselin. Po zpracování signálních peptidů vznikne protein tvořený 524 aminokyselinami nebo s molekulovou hmotností přibližně 58 000 (obrázek č. 3). Daleko větší velikost chiméry sIL-6R/IL-6 produkované z rekombinantní DNA v lidských buňkách ukazuje, že glykosylace tvoří výraznou část velikosti molekuly.

Příklad 3: Chiméra sIL-6R/IL-6 brání růstu a vyvolává diferenciaci metastázujiících buněk melanomu

Klón F10.9 získaný z buněk B16 melanomu tvoří vysoce metastázujiící nádory u myši C57Black/6. Zvířata umírají na základě výskytu pulmonárních metastáz ve dvou až třech měsících (Katz A, Shulman L. M, Porgador A, Revel M, Feldman M and Eisenbach L. Abrogation of B16 melanoma metastases by long-term low-dose Interleukin-6 therapy. *J. Immunother.* 13: 98-109, 1993). Vedle chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 kultura buněk F10.9 produkuje zjištěné morfologické změny a blokuje jejich růst (obrázek č. 4). Buňky F10.9 ošetřené chimérou se prodlužují vystupujícím dendritickým prodloužením a podobají se vřetenovité diferenciaci embryonálních melanocytů nebo gliových buněk.

Růst buněk se hodnotí čtyři dny po nanesení 3×10^3 buněk do prohlubně mikrotitrační destičky s 96 prohlubněmi. Buňky se kultivují v kultivačním médiu RPMI 1640 s 10 % FCS o objemu 0,2 ml. Buňky se fixovaly v 12,5 % glutaraldehydu po dobu 30 minut, promyly se vodou a barvily se 0,1 % krystalickou violetí po dobu 30 minut. Po promytí a usušení se barvivo extrahovalo 10 % kyselinou octovou a stanovila se optická hustota při vlnové délce 540 nm. Chiméra inhibovala růst v závislosti na dávce. K úplné inhibici růstu dochází při koncentraci 10 ng/ml chimérového proteinu (p85) (zobrazeno na obrázku č. 5). Oba chimérové proteiny sIL-6R δ Val/IL-6 a sIL-6R δ Val/L/IL-6 (chiméra s delším linkerem mezi sIL-6R a IL-6, popisuje se v příkladu 1) vykazují stejnou aktivitu. Tento



výsledek také ukazuje, že linkerový peptid mezi částmi sIL-6R a IL-6 v chiméře není pro aktivitu chiméry podstatný. Shora v textu uvedená chiméra sIL-6R δ Val/IL-6 má pouze velmi krátký linker tvořený pouze 3 aminokyselinami, zatímco chiméra sIL-6R δ Val/L/IL-6 má delší linkerový peptid tvořený 13 aminokyselinami, přičemž obě chiméry vykazují v podstatě stejnou aktivitu při inhibici růstu metastázujiících buněk. Naopak ani samotný IL-6 ani samotný sIL-6R δ Val neinhibují růst těchto melanomových buněk (zobrazeno na obrázku č. 6), což demonstruje jedinečnou aktivitu chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 (p85). Aby se získal podobný účinek, je nutné použít směs obsahující 200 až 400 ng/ml IL-6 a 125 ng/ml sIL-6R δ Val (zobrazeno na obrázku č. 6). Pro maximální inhibici buněk F10.9 je nutné použít 7,5nM IL-6 a 2 nM sIL-6R δ Val ve srovnání s pouze 0,12 nM chimérou sIL-6R/IL-6.

Během imunologického čištění na koloně s McAB 34.4 (popisuje se v Příkladu 2) se sledovala inhibiční aktivita růstu chimérového proteinu p85 sIL-6R/IL-6. Patern aktivity odpovídal intenzitě pruhu proteinu p85, který se objevil v různých frakcích na elektroforetickém SDS polyakrylamidovém gelu na obrázku č. 2.

Příklad 4: Chiméra sIL-6R/IL-6 je podstatná při ujetí štěpů transplantovaných buněk kostní dřeně.

Přijetí krvetvorných kmenových buněk z kostní dřeně se může studovat po transplantaci do těžce imunodeficitních (SCID) myši (Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, Risdon G, Patterson B, Broxmeyer H. E and Dick J. E. SCID mice as an in vivo model of human cord blood hematopoiesis. Blood cells 20: 316-320, 1994). Myši SCID-NOD se vystavily subletálnímu ozáření a do ocasní žíly se injekcí zavedlo 3×10^5 buněk CD34⁺ lidské kostní dřeně. Před injekcí se buňky CD34⁺ držely po dobu 3 dní v kapalně kultuře při různých kombinacích cytokinů. Po jednom měsíci se myši usmrtily a z kostí se shromáždily

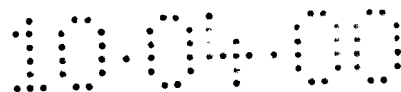


buňky kostní dřeně. Ujmutí štěpů lidských buněk u recipientních myši SCID-NOD se hodnotilo Southernovou hybridizací s repetitivy lidské DNA.

Zjistilo se, že faktor kmenových buněk (SCF, ckit-ligand) a Flt3-ligand (flt3/flk2 ligand receptoru tyrozinové kinázy) je důležitý pro přežití a proliferaci nejprimitivnějších pluripotenciálních křetvorných kmenových buněk vhodných pro dlouhodobé štěpy v recipientu kostní dřeně (McKenna H.J, de Vries P, Brasel K, Lyman S. D. and Williams D. E. Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hemtopoietic progenitor cells. Blood 86: 3413-3420, 1995). Jak je možné spatřit na obrázku č. 7 tyto dva faktory samostatně nejsou dostačující, aby vyvolaly přijetí štěpu lidských buněk v kostní dřeni recipientních myši SCID-NOD. Aby došlo k dostatečnému přijetí štěpu je nutné přidat chimérový protein sIL-6R/IL-6. Při koncentraci 100 ng/ml chiméra sIL-6R/IL-6 je daleko více aktivní ve srovnání s IL-6 (v koncentraci 50 až 200 ng/ml) a sIL-6R (v koncentraci 125 až 1250 ng/ml) (obrázek č. 7). Nutnost chiméry sIL-6R/IL-6 indikuje, že tento protein je v podstatný pro přežití a proliferaci pluripotencionálních křetvorných kmenových buněk, které mohou znovu obsadit prostředí kostní dřeně, což indikuje, že tento protein se může použít při klinických protokolech při transplantaci kostní dřeně.

Toto je první demonstrace, že chiméra sIL-6R/IL-6 má následující alespoň dvě nově nalezené aktivity:

- (i) Když se přidá dohromady s oběma faktory SCF a Flt3-ligandem k lidským křetvorným primitivním progenitálním buňkám, podpoří jejich přežití a proliferaci a
- (ii) je aktivní (a zjevně podstatná) v modelu *in vivo* transplantace lidské kostní dřeně v imunodeficitních myších.



Příklad 5: Chiméra sIL-6R/IL-6 je aktivní v případě vysoce čistých primitivních krvetvorných kmenových buněk.

Za účelem přípravy 80 % čisté populace buněk CD34+ se lidské chordové krevní jednobuněčné buňky rozdělily na jednobuněčné buňky s nízkou hustotou (NMC) na Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), pak se použil kit MACS (Miltney Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Tyto buňky pak prošly přes imobilizované monoklonální protilátky proti CD38 nebo se rozřídily pomocí třídění fluorescencí aktivovaných buněk a získala se populace CD34+CD38-, což odpovídá přibližně 0,1 % původních buněk. Tyto čištěné kmenové buňky (20 000 buněk) se umístily do suspenzních kultur do kultivačního média RPMI o objemu 0,5 ml, 10 % fetální telecí sérum (FCS), 1% bovinní sérový albumin obsahující 50 ng/ml faktoru kmenových buněk (SCF) a 100 ng/ml flt3-ligandu (FL) (R&D Systems, Minneapolis, MN). Polovina kultury se doplnila chimérou sIL-6R/IL-6 o koncentraci 100 ng/ml, další se kultivovaly bez přítomnosti chiméry. Inkubace proběhla při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO₂ po dobu 6 dní. Počet znovu obsazených buněk kostní dřeně se hodnotil tak, že se sub-letálně ozářeným myším NOD-SCID zavedly injekcí (i.v.) všechny buňky z těchto *in vitro* kultur. Myši se udržovaly v prostředí bez mikrobů. Po šesti týdnech se myši usmrtily a z jejich dlouhých kostí se získala kostní dřeň. Tyto buňky kostní dřeně (BM) se nanesly na semi-pevné plotny s 0,9% methylcelulosou s 30 % FCS, 50 µM β-merkaptioethanolem, 50 ng/ml SCF, 5 ng/ml IL-3, 5 ng/ml GM-CSF, 6 u/ml erythropoietinu (R&D Systems, Minneapolis, MN). Kultury obsahovaly také lidské sérum a kultivace probíhala za podmínek, které brání růstu myších kolonií. Výsledky (tabulka č. IV) indikovaly, že při přidání chiméry sIL-6R/IL-6 do suspenzních kultur dochází k 30 až 50 násobnému zvýšení počtu lidských buněk, které tvoří kolonie (CFU), získaných z myši, u kterých proběhla transplantace, ve srovnání se samotným SCF a FL. To reprezentuje velké zvýšení počtu kmenových buněk, které

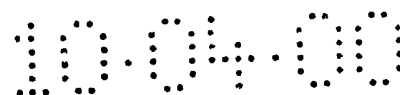
zнову obsadily SCID v suspenzních kulturách 6. den ve srovnání s 0. dnem. V nepřítomnosti chiméry sIL-6R/IL-6 SCF a FL neprodukuje zvýšené množství kmenových buněk během 6-ti dnů kultivace suspenzní kultury. DNA buněk BM získaná z transplantovaných myši NOD/SCID se analyzovala Southernovým přenosem, jako v příkladu 4. Množství získané lidské DNA bylo 10 krát vyšší než u myši, kterým se aplikovaly buňky kultivované v přítomnosti chiméry.

Progenitory CFU z kostní dřeně myši NOD/SCID, jak se uvádí v tabulce č. IV, byly příčinou zvýšení krvetvorných buněk různých myeloidů (makrofág a granulocyt) stejně jako erythroidů a lymfoidů (např. CD19+, CD56+) pouze, když lidské krevní buňky se před transplantací kultivovaly s chimérou sIL-6R/IL-6.

Tabulka IV: Lidské kmenové buňky schopné znovu obsadit kostní dřeň myši NOD/SCID

Přidání během kultivace suspenzní kultury CD34+CD38+ lidských buněk z chordové krve	Dny kultivace kultury	Počet lidských krvetvorných kolonií vytvořených z BM transplantovaných myši NOD/SCID
	0	4
SCF + FL	6	2 až 3
SCF + FL + sIL-6R/IL-6	6	50 až 100

Další experimenty porovnávaly účinek sIL-6R/IL-6 na populaci CD34+CD38+ chordové krve s účinkem na vysoce čištěné kmenové buňky CD34+CD38-. Expanze vysoce čištěných kmenových buněk *in vitro* byla daleko silnější v přítomnosti chiméry sIL-6R/IL-6 než u méně čištěných kmenových buněk (tabulka č. V). To indikuje, že nejprimitivnější kmenové buňky jsou



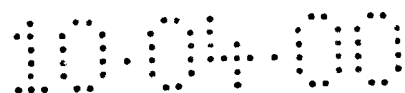
preferovaným cílem účinku chiméry sIL-6R/IL-6 na expanzi buněk.

Tabulka č. V: *In vitro* expanze krvetvorných kmenových buněk

Nanesená buněčná populace (20 000 buněk)	Počet buněk 6-tý den s SC + FL	Počet buněk 6-tý den s SC + FL + sIL-6R/IL-6
Experiment 1		
CD34+CD38+	780 000	675 000 (x 0,86)
CD34+CD38-	42 000	153 000 (x 3,6)
Experiment 2		
CD34+CD38-	330 00	507 000 (x 1,5)
CD34+CD38+	3 000	18 000 (x 6,0)

Zachování znovu obsazené kostní dřeně *in vitro* se měřilo prodloužením kultivace suspenzních kultur vysoce čistých kmenových buněk CD34+CD38- před zavedením injekcí do NOD/SCID myši. Přijetí štěpů se hodnotilo poměrem lidské DNA v kostní dřeni u recipientních myši 6 týdnů po i.v. injekci, kterou se aplikovaly kultivované buňky. Když se během kultivace kultury přidala k SCF a FL chiméra sIL-6R/IL-6, se po dvou týdnech kultivace pozorovalo vysoké přijetí štěpů (větší než 1 % lidské DNA) a příjem štěpů byl vyšší než u nekultivovaných buněk. Naopak experimenty s kulturami, které obsahují SCF, FL, GM-CSF, IL-3 ukázaly, že SCID-znova obsazené buňky nezůstávají v kultuře po jednom týdnu kultivace (Bhata, M. et al., J. Exp. Med. 186, 619-624 1997).

Tyto výsledky ukazují, že chiméra sIL-6R/IL-6 umožňuje expanzi a udržení lidských primitivních kmenových buněk schopných obsadit v recipientu kostní dřeň. Kmenové buňky zůstávají aktivní v nediferenciovaném stádiu, zatímco se dělí. Chiméra sIL-6R/IL-6 umožňuje nový způsob kultivace krvetvorných buněk, které tvoří štěpy pro transplantaci. To také umožňuje použití retrovirových vektorů pro začlenění genů



do kmenových buněk, což se využívá v metodách genové terapie. Do dnešní doby toto nebylo možné s lidskými kmenovými buňkami, protože tyto primitivní buňky se nemohly udržovat *in vitro* v cyklujícím stádiu, jak to vyžaduje integrace retrovirové DNA. Chiméra sIL-6R/IL-6 řeší tento problém.

Příklad 6: Produkce chiméry IL-6R/IL-6 v buňkách CHO

DNA plazmidu sIL-6R/IL-6 pcDNA3 zobrazená na obrázku č. 1 se ko-transfekovala do buněk vaječníků čínských křečků (CHO) spolu s DNA plazmidu pDHFR, jak popisuje v publikaci Mory et al., DNA 5, 181-193, 1986). Mezi transformanty rostoucími v 50 nM methotrexátu se izoloval klón L12-[IL-6R/IL-6]. Zjistilo se, že tento klón je stabilní po mnoho pasáží a semi-konfluentní kultury vylučují do kultivačního média chiméru IL-6R/IL-6 v množství 2,5 µg/ml.

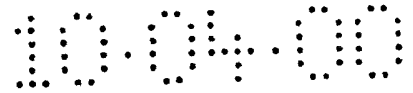
Za účelem čištění chiméry IL-6R/IL-6 se 3,25 litrů kultivačního média z kultury klónu L12 v 2 % bovinním séru zakoncentrovalo na objem 200 ml. Médium se absorbovalo na koloně o objemu 18 ml obsahující monoklonální protilátky 34.4 proti lidskému sIL-6R spojené s částicemi přípravku Affigel 10 a chiméra se eluovala způsobem, který se popisuje v publikaci Novick et al., Hybridoma, 10, 137-146, 1991). 25 mM eluát kyseliny citronové se ihned neutralizoval pufrém 1 x HEPES pH 8,6. Proteiny se zakoncentrovaly na membráně Amicon oddělující molekuly o molekulové hmotnosti 10 000 na konečnou koncentraci 1 mg/ml. Při testu SDS-PAGE se objevil jediný pruh odpovídající molekulové hmotnosti 85 000, což koresponduje s chimérou IL-6R/IL-6. Glykosylace se demonstrovala zmenšením velikosti molekuly po ošetření glykosidasy (Boehringer, Mannheim). Biologická aktivita chiméry IL-6R/IL-6 produkované buňkami CHO je stabilní po dobu alespoň 5 měsíců při teplotě 4 °C. Uchovávání probíhá při teplotě -70 °C.

Příklad 7: Afinity chiméry IL-6R/IL-6 vůči gp130

U chiméry IL-6R/IL-6 produkované buňkami CHO a směsí lidského IL-6 a sIL-6R se porovnávala jejich schopnost vázat se na rozpustnou formu gp130 (sgp 130), který je druhým řetězcem receptorového systému IL-6 (popisuje se v části dosavadní stav techniky). Mikrotitrační destička s 96 prohlubněmi (Nunc) se potáhla s monoklonálními protilátkami proti lidskému gp130 a přidalo se 50 ng/ml sgp130 ((R&D Systems, Minneapolis, MN). Po promytí fyziologickým roztokem pufovaným fosforečnanem se do různých prohlubní přidala chiméra IL-6R/IL-6 v různých koncentracích, které se pohybují v rozmezí 0,1 až 50 ng/ml. Do separátních prohlubní se přidal rhuIL-6 (Ares-Serono, Geneva) v koncentraci 500 ng/ml spolu s lidským sIL-6R δ Val v koncentracích v rozmezí 2 až 500 ng/ml. Po celonoční inkubaci při teplotě 4 °C se přidaly králičí polyklonální protilátky proti IL-6R (Oh et al., Cytokine, 8, 401-409, 1996). Pak se přidaly kozí anti-králičí Ig konjugované s křenovou peroxidasou, která se detekovala barevnou reakcí (Sigma, St. Louis). Obrázek č. 8 ukazuje Scatchardův graf výsledků. Zjistilo se, že afinita chiméry IL-6R/IL-6 vůči gp130 je více jak 4 krát vyšší než afinita dvou částí molekul, které se přidaly odděleně ($6,3 \times 10^{-11}$ M verus $2,6 \times 10^{-10}$ M). Tento výsledek vysvětluje vyšší aktivitu chiméry ve srovnání s kombinací IL-6 + sIL-6R vůči melanomu a vůči krvetvorným buňkám (zobrazeno na obrázku č. 9 a popisuje se v Příkladu 4).

Příklad 8: Chiméra IL-6R/IL-6 chrání před toxickými účinky na játra.

Zavedením chloridu uhličitého (CCl₄) injekcí do myši vzniká silná nekróza jater vedoucí k úmrtí zvířat (popisuje se v publikaci Slater T. F. et al., Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci. 311, 633-645, 1985). Když se myšim, které jsou geneticky deficitní na IL-6 (IL-6^{-/-}), aplikuje relativně malá dávka chloridu uhličitého (2 až 3 ml/kg tělesné hmotnosti)

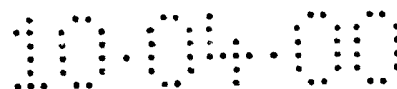


intraperitoneální injekcí, stupeň úmrtnosti během 24 hodin je přibližně 70 % (zobrazeno na obrázku č. 10). Injekce chiméry IL-6R/IL-6 produkované buňkami CHO jednu hodinu před aplikací chloridu uhličitého a opět 4 hodiny po aplikaci ochrání zvířata před smrtí po dobu 24 hodin. Naopak podobně zavedený volný rhuIL-6 nevykazuje žádný účinek (zobrazeno na obrázku č. 10). Chiméra IL-6R/IL-6 je účinná v dávkách 2 až 3 μg na jednu injekci, kde vyjádřeno v molárním poměru je 10 krát nižší než dávka IL-6, které není účinná. Při vyšších dávkách chloridu uhličitého (např. 3,5 ml/kg zobrazeno na obrázku č. 10) chiméra má také ochranný účinek, přičemž úmrtnost je nižší ve srovnání s IL-6 nebo bez aplikace cytokinu. Rozdíl v úmrtnosti mezi myšmi ošetřenými chimérou a neošetřenými myšmi, přičemž obou skupinám se aplikovala stejná dávka chloridu uhličitého, je podstatný a hodnota p je menší než 0,01. Histologické pozorování sekci jater obarvených hematoxilinem-eosinem potvrdilo, že chlorid uhličitý způsobuje nekrózu tkáně jater a že chiméra IL-6R/IL-6 chrání hepatocyty před uvedeným toxickým účinkem (není zobrazeno).

Aplikace chiméry IL-6R/IL-6 se může použít při ochraně jaterná tkáně u pacientů s nekrotickým onemocněním, které je způsobené chemikáliemi (například alkohol, paracetamol) nebo v jiných případech (například při virové hepatitidě).

Příklad 9: Konstrukce a aktivita chiméry IL-6/sIL-6R δ Val

Zkonstruovala se chimérová molekula, ve které část IL-6 je na N-konci, zatímco část sIL-6R je na C-konci. Plazmid pBS-sIL-6R δ Val se štěpil v restričním místě Sau3a (bp 1086) a HindIII, které následuje po terminačním kodónu po Val-359 (popisuje se v Příkladu 1). Syntetizoval se linker obsahující tři restriční místa SpeI, SmaI a BamHI:



```

      SpeI           SmaI           BamHI
5' CT AGT GGG CCC GGG GTG GCG GG
      A CCC GGG CCC CAC CGC CCC TAG 5' (SEQ ID NO: 2)

```

Toto restriční místo Sau3a sIL-6R se ligovalo do restričního místa BamHI linkeru a vše se klónovalo do vícenásobného klónovacího místa plazmidu Bluescript pBS SK. Sekvence IL-6 se amplifikovala pomocí PCR z DNA pKK β 2-7 za použití primerů (počáteční kodón je podtržen)

```

              SpeI
Forward  5' GA CTA GTA GCT ATG AAC TCC TTC TC (SEQ ID NO: 3)
              HaeIII
Reverzní 5' AG GGC CAT TTG CCG AAG AGC C      (SEQ ID NO: 4)

```

Produkt PCR štěpený restričním enzymem SpeI a HaeIII se zavedl do restričního místa SpeI a SmaI shora uvedeného linkeru. Dále se syntetizoval jiný linker BamHI-NcoI s vnitřním restričním místem SmaI:

```

                          SmaI
5' GAT CCG GGC GGC GGG GGA GGG GGG CCC GGG C[NcoI]
[BamHI] GC CCG CCG CCC CCT CCT CCC GGG CCC GGT AC 5' (SEQ ID
NO: 5)

```

Tento linker se klónoval mezi restriční místo předchozího linkeru a NcoI 1464 sekvence IL-6R. Fragment IL-6R od SmaI 867 do NcoI 1464 se pak zavedl mezi restriční místo SmaI druhého linkeru a NcoI IL-6R. Výsledná chimérová DNA se sekvenovala a znovu klónovala do pCDNA3 za účelem exprese v lidských buňkách HEK 293. Aminokyselinová sekvence chiméry IL-6-IL-6R 3e je zobrazena na obrázku č. 11 (linker je podtržen). Chiméra 3e se čistila afinitní chromatografií na



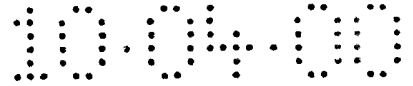
monoklonálních protilátkách proti IL-6 (popisuje se v publikaci Novick et al., Hybridoma 8, 561-567, 1989). Při testu SDS-PAGE se objevil pruh odpovídající molekulové hmotnosti 75 000.

Biologická aktivita chiméry IL-6-IL-6R 3e inhibovat růst buněk melanomu F10.9 je zobrazena na obrázku č. 12. Uvedená chiméra je jasně aktivní ve srovnání s chimérou IL-6R/IL-6 (příprava 1 až 3) ve stejném experimentu, ačkoli je nutné její vyšší koncentrace, aby došlo k 50 % inhibici růstu.

Pomocí PCR mutagenese se připravily dva mutanti IL-6R/IL-6, ve kterých aminokyseliny His-280 a Asp-281 části IL-6R chiméry IL-6R/IL-6 (obrázek č. 3) se zaměnily za Ser a Val (mutant 39 nebo HD) nebo kde Asn-230 se dále zaměnil za Asp (mutant NHD). Jak je možné spatřit na obrázku č. 12, tyto dva mutanty nevykazovaly skoro žádnou aktivitu ve srovnání s chimérami IL-6R/IL-6 a IL-6-IL-6R. Protože v IL-6R tyto aminokyseliny interagují s gp130, jak se ukázalo molekulárním modelováním (popisuje se v publikaci Halimi H, Eisenstein M, Oh J, Revel M and Chenath J. Epitop peptides from interleukin-6 receptor which inhibit the growth of human myeloma cells. Eur. Cytokine Netw., 6: 135-143, 1995), což demonstruje, že chiméra sIL-6R/IL-6 konzervuje toto podstatné místo interakce.

Chiméra IL-6-IL-6R 3e nezahrnuje oblast IL-6R podobnou imunoglobulinu, která je přítomna v IL-6R/IL-6. Avšak pouhé odstranění Ig-oblasti z IL-6R/IL-6 nesníží její biologickou aktivitu vůči buňkám F10.9. Navázání chiméry IL-6-IL-6R 3e na gp130 tvoří přibližně 30 % navázání další chiméry IL-6R/IL-6 (nenízobrazeno). Toto menší schopnost se vázat je v souladu s nižší aktivitou vůči růstu buněk melanomu.

Tyto výsledky ukazují, že blokování C-konce IL-6 fúzí prostřednictvím linkeru s sIL-6R, konzervuje v nových chimérách dobrou biologickou aktivitu .



(2) Informace o SEQ ID NO: 4:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 21 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: cDNA
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

AGGGCCATTT GCCGAAGAGC C

21

(2) Informace o SEQ ID NO: 5:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 62 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: cDNA
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

GATCCGGGGCG GCGGGGGAGG GGGGCCCGGG CGCCCGCCGC CCCCTCCTCC CGGGCCCCGT

60

AC

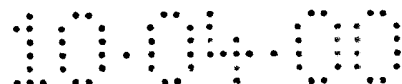
62

(2) Informace o SEQ ID NO: 6:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 14 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: peptid
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

Gly Gly Gly Gly Asp Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Gly
 1 5 10

(2) Informace o SEQ ID NO: 7:



- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 543 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: peptid
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
 20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
 35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
 50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
 100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
 115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
 130 135 140

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
 145 150 155 160

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
 165 170 175

Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
 180 185 190

Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
 195 200 205

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240



(2) Informace o SEQ ID NO: 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 471 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

```

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
1           5           10           15

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
          20           25           30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
          35           40           45

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
50           55           60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
65           70           75           80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
          85           90           95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
          100          105          110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
          115          120          125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
130          135          140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
145          150          155          160

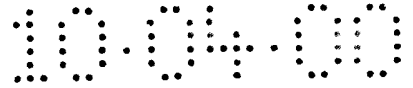
Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
          165          170          175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His
          180          185          190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala
          195          200          205

Leu Arg Gln Met Gly Gly Gly Gly Asp Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly
210          215          220

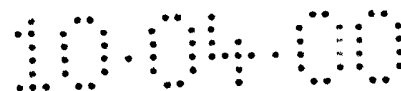
```



Pro Gly Val Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser
 225 230 235 240
 Pro Leu Ser Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser
 245 250 255
 Leu Thr Thr Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro
 260 265 270
 Ala Glu Asp Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys
 275 280 285
 Phe Ser Cys Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile
 290 295 300
 Val Ser Met Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr
 305 310 315 320
 Gln Thr Phe Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn
 325 330 335
 Ile Thr Val Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr
 340 345 350
 Trp Gln Asp Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe
 355 360 365
 Glu Leu Arg Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met
 370 375 380
 Val Lys Asp Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly
 385 390 395 400
 Leu Arg His Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly
 405 410 415
 Glu Trp Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu
 420 425 430
 Ser Arg Ser Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala
 435 440 445
 Leu Thr Thr Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala
 450 455 460
 Asn Ala Thr Ser Leu Pro Val
 465 470

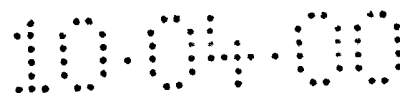
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Chimérový glykosylovaný rozpustný protein (sIL-6R/IL-6) receptoru interleukinu-6 (sIL-6R)-interleukin-6(IL-6) a jeho biologicky aktivní analogy obsahující fúzní proteinový produkt mezi v podstatě celou přirozeně se vyskytující formou IL-6R a v podstatě celou přirozeně se vyskytující formou IL-6, přičemž uvedený sIL-6R/IL-6 a jeho analogy se glykosylují způsobem podobným, jako je glykosylace přirozeně se vyskytujícího sIL-6R a IL-6.
2. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy podle nároku 1, kde uvedený sIL-6R se fúzuje s IL-6 prostřednictvím molekuly peptidového linkeru.
3. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy podle nároku 2, kde uvedený linker je velmi krátký, není imunogenní a tvoří jej přibližně 3 aminokyselinové zbytky.
4. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy podle nároku 3, kde uvedený linker je tripeptid se sekvencí E-F-M (Glu-Phe-Met).
5. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy podle nároku 2, kde uvedený linker je peptid obsahující 13 aminokyselinových zbytků se sekvencí E-F-G-A-G-L-V-L-G-G-Q-F-M (Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met).
6. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 podle libovolného z nároků 1 až 4, který se označil sIL-6R δ Val/IL-6 a má tripeptidový linker se sekvencí E-F-M mezi C-terminální Val-356 sIL-6R a N-terminální Pro-29 IL-6, kde uvedený chimérový protein má sekvenci uvedenou na obrázku č. 3.
7. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 podle libovolného z nároků 1, 2 a 5, který se označil sIL-6R δ Val/IL-6 a má peptidový linker tvořený 13 aminokyselinami se sekvencí E-F-G-A-G-L-

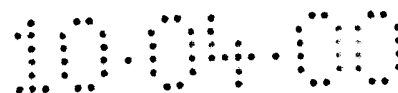


V-L-G-G-Q-F-M mezi C-terminální Val-356 sIL-6R a N-terminální Pro-29 IL-6, kde uvedený chimérový protein má sekvenci uvedenou na obrázku č. 3, kde tripeptid se sekvencí E-F-M mezi polohami 357 až 359 na obrázku č. 3 je nahrazen uvedenou sekvencí peptidu tvořeného 13 aminokyselinami.

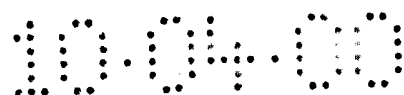
8. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 podle nároku 1, který se označil IL-6/sIL-6R, má celou sekvenci IL-6, která předchází sekvenci sIL-6R s peptidovým linkerem tvořeným 14-ti aminokyselinami se sekvencí G-G-G-G-D-P-G-G-G-G-G-G-P-G (SEQ ID NO: 6) mezi C-terminální MET-212 IL-6 a VAL-112 sIL-6R, přičemž uvedený chimérový protein má sekvenci uvedenou na obrázku č. 11.
9. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 podle libovolného z nároků 1 až 8, který se produkuje v savčích buňkách ve zcela zpracované formě.
10. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 podle nároku 9, který se produkuje v lidských buňkách.
11. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 podle nároku 9, který se produkuje v buňkách CHO.
12. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy podle libovolného z nároků 1 až 11, které se charakterizují svou schopností inhibovat růst buněk vysoce maligního karcinomu.
13. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy podle nároku 12, které se charakterizují svou schopností inhibovat růst buněk vysoce maligního melanomu.
14. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy podle libovolného z nároků 1 až 11, které se charakterizují svou schopností vyvolat *in vivo* přijetí lidských krvetvorných buněk při transplantaci kostní dřeně.
15. Chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy podle libovolného z nároků 1 až 11, které se



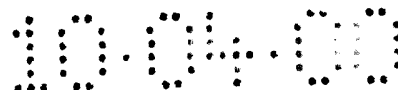
- charakterizují svou schopností ochránit játra před hepatotoxickými činidly.
16. Sekvence DNA kódující chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy podle libovolného z nároků 1 až 11.
 17. Vektor DNA, vyznačující se tím, že obsahuje sekvenci DNA kódující chimérový protein sIL-6R/IL-6 a jeho biologicky aktivní analogy podle libovolného z nároků 1 až 11, který je vhodný pro expresi uvedeného chimérového proteinu v savčích buňkách.
 18. Vektor DNA podle nároku 17, vyznačující se tím, že je vhodný pro expresi uvedeného chimérového proteinu v lidských buňkách.
 19. Vektor DNA podle nároku 17, vyznačující se tím, že je vhodný pro expresi uvedeného chimérového proteinu v buňkách CHO.
 20. Vektor DNA podle libovolného z nároků 17 až 19, vyznačující se tím, že se exprimuje v savčích a lidských buňkách, přičemž exprimovaný chimérový protein má sekvenci, která dovoluje úplné zpracování chimérového proteinu savčími nebo lidskými buňkami a vylučování zcela zpracovaného chimérového proteinu z buněk do kultivačního média, ve kterém uvedené buňky rostou.
 21. Vektor DNA podle libovolného z nároků 17 až 20, vyznačující se tím, že uvedený vektor je plazmid označený pcDNAsIL-6R/IL-6 zahrnující vektor pcDNA3, který obsahuje sekvenci DNA kódující chimérový protein sIL-6/IL-6 řízenou cytomegalovirovým promotorem (CMV).
 22. Vektor DNA podle libovolného z nároků 17 až 20, vyznačující se tím, že uvedený vektor je plazmid označený pcDNAsIL-6R/L/IL-6 zahrnující vektor pcDNA3, který obsahuje sekvenci DNA kódující chimérový



- protein sIL-6/IL-6 řízenou cytomegalovirovým promotorem (CMV), a že v uvedené sekvenci DNA kódující uvedený chimérový protein sIL-6R/IL-6 je v restričním místě EcoRI umístěném mezi sekvencí kódující část sIL-6R a sekvencí kódující část IL-6 proteinu začleněna sekvence linkeru kódující peptidový linker.
23. Transformované savčí buňky obsahující vektor DNA podle libovolného z nároků 17 až 22 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jsou schopny exprimovat sekvenci chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 nesenou uvedeným vektorem a zcela zpracovat exprimovaný protein a vyloučit ho do kultivačního média, ve kterém se uvedené buňky kultivují.
 24. Transformované buňky podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jde o zde popsané lidské embryonální ledvinové buňky 293 (HEK293) transfekované vektorem pcDNAsIL-6R/IL-6, přičemž uvedené buňky jsou schopny exprimovat chimérový protein sIL-6R/IL-6, zcela zpracovat uvedený protein a vylučovat uvedený protein do kultivačního média, ve kterém se uvedené buňky kultivují, ve formě glykoproteinu o molekulové hmotnosti 85 000.
 25. Způsob produkce chimérového proteinu nebo jeho biologicky aktivních analogů podle libovolného z nároků 1 až 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kultivaci transformovaných buněk podle nároku 23 nebo 24 za podmínek vhodných pro expresi, zpracování a vylučování uvedeného proteinu nebo analogů do kultivačního média, ve kterém se uvedené buňky kultivují, a čištění uvedeného proteinu nebo jeho analogů z uvedeného kultivačního média.
 26. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e čištění probíhá imunoafinitní chromatografií za použití monoklonálních protilátek specifických pro sIL-6R.



27. Použití chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 nebo analogů podle libovolného z nároků 1 až 11, solí libovolného z nich a jejich směsí, jako inhibitoru buněk karcinomu.
28. Použití chimérového proteinu nebo analogů podle nároku 27, jako inhibitoru buněk vysoce maligního melanomu.
29. Použití chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 nebo analogů podle libovolného z nároků 1 až 11, solí libovolného z nich a jejich směsí, jako aktivní složky pro vyvolání přijetí lidských krvetvorných buněk při transplantaci kostní dřeně.
30. Použití chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 nebo analogů podle libovolného z nároků 1 až 11, solí libovolného z nich a jejich směsí, jako aktivní složky při ochraně jater proti hepatotoxickým činidlům.
31. Použití chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 nebo analogů podle libovolného z nároků 1 až 11, solí libovolného z nich a jejich směsí, jako aktivní složky pro zesílení krvetvornosti, při léčení poruch jater a neurologických poruch nebo při jiných aplikacích, při kterých se používají IL-6 a sIL-6R.
32. Použití chimérového proteinu sIL-6R/IL-6 nebo analogů podle libovolného z nároků 1 až 11, solí libovolného z nich a jejich směsí při přípravě medikamentu pro léčbu savčích karcinomů způsobem inhibice buněk savčích karcinomů nebo při přípravě medikamentu pro posílení transplantace kostní dřeně způsobem umožňujícím přijetí lidských krvetvorných buněk při transplantaci kostní dřeně nebo při přípravě medikamentu pro zesílení krvetvornosti nebo při přípravě medikamentu pro léčbu poruch jater nebo neurologických poruch nebo při přípravě medikamentu pro jiné aplikace, při kterých se používají IL-6 nebo sIL-6R.
33. Farmaceutická kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje jako aktivní složku chimérový protein



sIL-6R/IL-6 nebo jeho analog podle libovolného z nároků 1 až 11 a farmaceuticky přijatelný nosič, ředidlo nebo ekcipient.

34. Farmaceutická kompozice podle nároku 33, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e j e vhodná pro léčbu zhoubného bujení.
35. Farmaceutická kompozice podle nároku 33, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e j e vhodná pro zlepšení transplantace kostní dřeně.
36. Farmaceutická kompozice podle nároku 33, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e j e vhodná pro léčbu jaterních a neurologických poruch nebo pro zesílení krevetvorby nebo pro jiné aplikace, při kterých se používají IL-6 nebo sIL-6R.
37. Způsob léčby zhoubného bujení u savců nebo zlepšení transplantací kostní dřeně nebo léčby jaterních nebo neurologických poruch nebo zesílení krevetvorby nebo jiných aplikací, při kterých se používají IL-6 nebo sIL-6R, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci farmaceutické kompozice podle libovolného z nároků 33 až 36 pacientovi ve vhodné dávkové formě a vhodným způsobem aplikace.