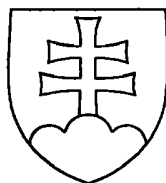


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 09.07.1997
- (31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/021 443, 60/032 534,
60/037 737, 60/039 314,
60/039 792
- (32) Dátum priority: 09.07.1996, 06.12.1996, 23.01.1997,
07.02.1997, 04.03.1997
- (33) Krajina priority: US, US, US, US, US
- (40) Dátum zverejnenia: 12.02.2001
- (86) Číslo PCT: PCT/US97/12244, 09.07.1997

(21) Číslo dokumentu:

15-99

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

C 12N 15/12
C 07K 14/715
C 07K 1/107
A 61K 38/17
A 61K 47/48
A 61K 49/00

(71) Prihlasovateľ: Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Fischer Eric F., New Braunfels, TX, US;
Edwards III. Carl K., Superior, CO, US;
Kieft Gary L., Boulder, CO, US;

(74) Zástupca: Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Skrátené rozpustné receptory faktora nekrotizujúceho tumory typu I a typu II**

(57) Anotácia:
Sú opísané skrátené receptory tumor nekrotizujúceho faktora (TNF), ktoré ovplyvňujú aktivitu TNF. Tiež je opísaný postup získania rekombinantného receptora TNF.

01-2924-98-Če

Skrátené rozpustné receptory faktora nekrotizujúceho tumory typu I a typu II

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka problematiky zápalov. Konkrétnejšie sa predkladaný vynález sa týka problematiky skrátených receptorov faktora nekrotizujúceho tumory (truncated tumor necrosis factor receptors - sTNFRs).

Skrátené sTNFR majú nasledovný vzorec: R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 , kde [Cys¹⁹-Cys¹⁰³] predstavuje zvyšky 19 až 103 sTNFR-I a kde ďalej R_1 predstavuje metionylovanú alebo nemetionylovanú aminoskupinu Cys¹⁹ alebo aminokyselinového zvyšku (alebo zvyškov) aminokyselinového konca vybraných zo skupiny:

C	
IC	
SIC	
NSIC	(SEQ ID NO:15)
NNSIC	(SEQ ID NO:16)
QNSIC	(SEQ ID NO:17)
PQNSIC	(SEQ ID NO:18)
HPQNSIC	(SEQ ID NO:19)
IHPQNSIC	(SEQ ID NO:20)
YIHPQNSIC	(SEQ ID NO:21)
KYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:22)
GKYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:23)
QGKYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:24)
PQGKYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:25)
CPQGKYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:26)

VCPQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:27)
 SVCPQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:28)
 DSVCPQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:29)

a kde R_2 predstavuje karboxyskupinu Cys¹⁰³ alebo karboxyskupinu karboxy-koncového aminokyselinového zvyšku vybraného zo skupiny:

F
 FN
 FNC
 FNCS (SEQ ID NO:30)
 FNCSL (SEQ ID NO:31)
 FNCSLC (SEQ ID NO:32)
 FNCSLCL (SEQ ID NO:33);

a od nich odvodených obmien alebo derivátov, ale za predpokladu, že keď R_1 predstavuje metionylovanú alebo nemetiolovanú aminoskupinu aminokyselinovej sekvencie VCPQGKYIHPQNNSIC alebo odtiaľ odvodené N-terminálne skrátenie 1 až 15 zvyškov, potom R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 nie je pridaný variant vzorca R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FCCSLCL- R_3 , kde R_3 predstavuje karboxyskupinu aminokyselinových zvyškov Asn¹¹¹-Asn¹⁶¹ alebo skrátenie na karboxylovom konci Asn¹¹¹-Asn¹⁶¹.

Doterajší stav techniky

Zápal je obranná reakcia tela na poranenie spôsobené napríklad mechanickým poškodením, infekciou alebo pôsobením antigénov. Zápalová reakcia sa môže prejavovať patologicky, keď je zápal indukovaný nevhodnými stimulmi (ako napríklad autoantigénom), keď sa prejavuje výrazným spôsobom alebo keď stále pretrváva aj po odstránení pôvodného škodlivého činidla.

Takáto zápalová reakcia môže zahŕňať produkciu určitých cytokínov.

Zatiaľ čo etiológia zápalov nie je doteraz úplne objasnená, v poslednom čase sa zlepšila naša znalosť molekulových aspektov zápalov. Tento výskum viedol k identifikácii určitých cytokínov, o ktorých sa predpokladá, že hrajú výraznú úlohu v procesoch zápalu. Cytokíny sú extracelulárne proteíny, ktoré modifikujú chovanie buniek, najmä tých buniek, ktoré sú v najbližšom okolí miesta syntézy a uvoľňovania cytokínov. Faktory nekrotizujúce tumory (TNFs) tvoria triedu cytokínov produkovaných radom typov buniek, vrátane monocytov a makrofágov.

Už predtým sa opísali najmenej dva typy TNF, konkrétne TNF alfa (TNF α) a TNF beta (TNF β alebo lymfotoxín (lymphotoxin)). Obidva sú aktívne ako trimérna molekula (trimeric molecule) a predpokladá sa, že iniciujú prenos bunkových signálov prepojením receptorov (Engelmann et al. (1990), J. Biol. Chem., 265:14497-14504).

Niektoré dôkazy naznačujú, že TNF- α a TNF- β sú hlavnými cytokínmi zápalu. Tieto známe TNF majú dôležité fyziologické účinky na rad rozdielnych cieľových buniek, ktoré sa zúčastňujú na zápalovej odpovedi na rôzne podnety, napríklad na infekciu alebo poranenie. Proteíny podnecujú sekréciu latentnej kolagenázy (latent collagenase) a prostagladínu E₂ pri fibroblastoch aj pri synoviálnych bunkách (sinovial cells) a ďalej spôsobujú, že bunky osteocytov stimulujú resorpciu kostí. Tiež proteíny zvyšujú povrchové adhezívne vlastnosti endoteliálnych buniek voči neutrofilom. Spôsobujú aj to, že endoteliálne bunky sekretujú koagulačnú aktivitu a redukujú ich schopnosť rozkladať (lyse) zrazeniny. Navyše presmerujú aktivitu adipocytov (adipocyte) od ukladania lipidov inhibíciou expresie enzýmu lipoproteínová lipáza (lipoprotein lipase). TNF

taktiež podnecujú u hepatocytov syntézu jednej triedy proteínov známych ako „reaktanty akútnej fázy (acute phase reactants)“, ktoré pôsobia na hypotalamus ako pyrogény (pyrogens) (Selby et al. (1988), *Lancet*, 1(8583): 483; Starness, Jr. et al. (1988) *J. Clin. Invest.*, 82: 1321; Oliff et al. (1987), *Cell*, 50: 555 a Wage et al. (1987), *Lancet*, 1(8529):355). Aj preklinické výsledky na rôznych zvieracích modeloch zápalov (vrátane reumatickej artritídy) naznačujú, že inhibícia TNF má významný dopad na vývoj choroby a jej vážnosť (Dayer et al. (1994), *European Cytokine Network*, 5(6):563-571 a Feldman et al. (1995), *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 66:272-278). Aj nedávne predbežné klinické testy na ľuďoch s reumatickou artritídou s inhibítormi TNF ukázali sľubné výsledky (Rankin et al. (1995), *British Journal Of Rheumatology*, 3(4):4334-4342; Elliot et al. (1995), *Lancet*, 344:1105-1110; Tak et al. (1996), *Arthritis and Rheumatism*, 39:1077-1081; a Paleolog et al. (1996), *Arthritis and Rheumatism*, 39:1082-1091).

Proteínové inhibítory TNF sa uvádzajú v správe EP 308 378 - proteíny izolované z moču pacientov s horúčkou vykazujú TNF inhibičnú aktivitu. Efekt týchto proteínov je pravdepodobne daný kompetitívnym mechanizmom na úrovni receptorov. EP 308 378 opisuje proteíny dostatočne čisté na to, aby mohli byť charakterizované svojím N-koncom. Odkaz ale nič nehovorí o akejkoľvek sekvencii DNA alebo rekombinantne produkovanom inhibítore TNF.

Existujú ale aj údaje o rekombinantne pripravených inhibítoroch TNF. Napríklad EP 393 438 a EP 422 339 uvádza aminokyselinové a nukleotidové sekvencie hotového (mature) rekombinantného ľudského „30 kDa inhibítora TNF“ (známeho aj ako receptor p55 a ako sTNFR-I) a hotového rekombinantného ľudského „40 kDa inhibítora“ (známeho aj ako receptor p75 a ako sTNFR-II); opisuje aj ich modifikované formy, ako napríklad fragmenty, funkčné odvođeniny a varianty. EP 393 438 a

EP 422 339 uvádza aj metódy izolácie génov kódujúcich tieto inhibítory, klonovanie príslušných génov vo vhodných vektoroch a bunkách a expresiu génov vedúcu k produkcii inhibítorov. Hotový rekombinantný ľudský 30 kDa inhibítor TNF a hotový rekombinantný ľudský 40 kDa inhibítor je schopný inhibovať TNF (EP 393 438, EP 422 339, PCT Publication No. WO 92/16221 a PCT Publication No. WO 95/34326).

sTNFR-I a sTNFR-II sú členmi receptorovej superrodiny nervový rastový faktor/TNF, receptorov, ktoré zahŕňajú receptor nervového rastového faktora (nerve growth factor receptor - NGF), antigén CD40 B buniek, Fas antigén a CD27 a CD30 antigény (Smith et al. (1990), Science, 248: 1019-1023).

Najkonzervatívnejšia vlastnosť v tejto skupine bunkových povrchových receptorov je na cysteín bohatá, extracelulárny ligand viažuca doména, ktorá môže byť rozdelená do štyroch opakujúcich sa motívov s asi 40 aminokyselinami a ktorá obsahuje 4 až 6 cysteínových zvyškov na značne konzervovaných pozíciách (Smith et al. (1990)), viď vyššie).

EP 393 438 ďalej pojednáva o 40 kDa TNF inhibítore $\Delta 51$ a 40 kDa TNF inhibítore $\Delta 53$, čo sú skrátené verzie rekombinantného 40 kDa proteínu inhibítora TNF s celou dĺžkou, kde sú odstránené aminokyselinové zvyšky 51 alebo 53 na karboxykonci hotového proteínu. Odborník ocení, že štvrtá doména 30 kDa inhibítora TNF aj 40 kDa inhibítora nie je nutná na inhibíciu TNF. Tento fakt bol potvrdený viacerými skupinami. Pripravili sa varianty 30 kDa a 40 kDa inhibítorov TNF s odstránenými doménami a tieto varianty bez štvrtej domény si zachovávajú úplnú TNF väzbovú aktivitu; naproti tomu varianty bez prvej, druhej alebo tretej domény si nezachovávajú TNF väzbovú aktivitu (Corcoran et al. (1994), Eur. J. Biochem., 223:831-840; Chih-Hsueh et al. (1995) The Journal

of Biological Chemistry, 270(6):2874-2878 a Scallion et al (1995) Cytokine, 7(8):759-770).

Vzhľadom na relatívne nízku inhibíciu cytotoxicity, ktorú vykazuje 30kDa inhibítor TNF a 40 kDa inhibítor TNF (Butler et al. (1994), Cytokine, 6(6):616-623), rôzne skupiny pripravili diméry proteínov TNF inhibítorov (Butler et al. 1994, vid' vyššie a Martin et al. (1995), Exp. Neurol., 131:221-228). Diméry ale môžu podnietiť protilátkovú odpoveď (Martin et al. (1995), vid' vyššie a Fisher et al. (1996), The New England Journal of Medicine, 334(26):1697-1702).

Cieľom predkladaného vynálezu je poskytnúť funkčne aktívne skrátené sTNFR. Tento a ďalšie ciele predkladaného vynálezu budú jasné z nasledovného opisu.

Podstata vynálezu

Predkladaný vynález sa venuje funkčne aktívnym skráteným formám sTNFR-I a sTNFR-II, ktoré sa ďalej uvádzajú ako „skrátený (skrátené) sTNFR“. Skrátené sTNFR sú modifikované formy sTNFR-I a sTNFR-II, ktoré neobsahujú štvrtú doménu (aminokyselinové zvyšky Thr¹²⁷-Asp¹⁶¹ v sTNFR-I a aminokyselinové zvyšky Pro¹⁴¹-Thr¹⁷⁹ v sTNFR-II); časť tretej domény (aminokyselinové zvyšky Asn¹¹¹-Cys¹²⁶ v sTNFR-I a Pro¹²³-Lys¹⁴⁰ v sTNFR-II); a ktoré prípadne neobsahujú časť prvej domény (aminokyselinové zvyšky Asp¹-Cys¹⁹ v sTNFR-I a Leu¹-Cys³² v sTNFR-II). Tieto nové inhibítory TNF (napríklad TNF- α a/alebo TNF- β) majú všeobecné uplatnenie.

Skrátené sTNFR predkladaného vynálezu zahŕňajú proteíny, ktoré zodpovedajú vzorcu R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂ a R₄-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₅. Tieto proteíny sú skrátené formy sTNFR-I a sTNFR-II.

Vzorcom „R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂,“ sa rozumie jeden alebo viac proteínov, kde [Cys¹⁹-Cys¹⁰³] zodpovedajú sTNFR-I zvyškom

19 až 103 pri číslovaní aminokyselinových zvyškov podľa schémy na obrázku 1 (SEQ ID NO:2); kde R_1 predstavuje metiononylovanú alebo nemetiononylovanú aminoskupinu Cys¹⁹ alebo aminokoniec niektorého aminokyselinového zvyšku(ov) z nasledovnej skupiny:

C	
IC	
SIC	
NSIC	(SEQ ID NO:15)
NNSIC	(SEQ ID NO:16)
QNSIC	(SEQ ID NO:17)
PQNSIC	(SEQ ID NO:18)
HPQNSIC	(SEQ ID NO:19)
IHPQNSIC	(SEQ ID NO:20)
YIHPQNSIC	(SEQ ID NO:21)
KYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:22)
GKYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:23)
QGKYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:24)
PQGKYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:25)
CPQKYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:26)
VCPQKYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:27)
SVCPQKYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:28)
DSVCPQKYIHPQNSIC	(SEQ ID NO:29)

a kde R_2 predstavuje karboxyskupinu Cys¹⁰³ alebo karboxy-konce aminokyselinového zvyšku vybraného zo skupiny:

F	
FN	
FNC	
FNCS	(SEQ ID NO:30)
FNCSL	(SEQ ID NO:31)
FNCSLC	(SEQ ID NO:32)

FNCSLCL (SEQ ID NO:33);

a ich variantov, ale za predpokladu, že keď R_1 predstavuje metiononylovanú alebo nemetiolovanú aminoskupinu aminokyselínovej sekvencie VCPQGKYIHPQNNNSIC alebo skrátenie N-konca o 1 až 15 zvyškov, potom proteín R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 nie je variantom R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSLCL- R_3 , kde R_3 predstavuje karboxyskupinu aminokyselínovej sekvencie Asn¹¹¹-Asn¹⁶¹ z obrázka 1 alebo jeho skrátenie na karboxykonci.

Nasledovné molekuly môžu slúžiť ako príklady skrátených sTNFR-I predkladaného vynálezu: NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FC-COOH (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.6D/C105); NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.6D/C106); NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FN-COOH (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.6D/N105); NH₂-MYIHPQNNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.3D/d8); NH₂-M-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.3D/d18) a NH₂-MSIS-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.3D/d15) buď metiononylované alebo nemetiononylované a ich varianty a odvodeniny.

Pod „ R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 “ sa rozumie jeden alebo viac proteínov, kde [Cys³²-Cys¹¹⁵] predstavujú zvyšky Cys³² až Cys¹¹⁵ sTNFR-I podľa schémy použitej na obrázku 8 (SEQ ID NO:35) na uľahčenie porovnania a kde R_4 predstavuje metiononylovanú alebo nemetiononylovanú aminoskupinu Cys³² alebo aminokyselinový zvyšok (zvyšky) na aminokonci vybrané zo skupiny:

C	
MC	
QMC	
AQMC	(SEQ ID NO:36)
TAQMC	(SEQ ID NO:37)

QTAQMC	(SEQ ID NO:38)
DQTAQMC	(SEQ ID NO:39)
YDQTAQMC	(SEQ ID NO:40)
YYDQTAQMC	(SEQ ID NO:41)
EYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:42)
REYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:43)
LREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:44)
RLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:45)
CRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:46)
TCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:47)
STCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:48)
GSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:49)
PGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:50)
EPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:51)
PEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:52)
APEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:53)
YAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:54)
PYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:55)
TPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:56)
FTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:57)
AFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:58)
VAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:59)
QVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:60)
AQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:61)
PAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:62)
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:63)

a kde R₃ predstavuje karboxyskupinu Cys¹¹⁵ alebo karboxyskupinu karboxykonca aminokyselinových zvyškov vybraných zo skupiny:

A	
AP	
APL	
APLR	(SEQ ID NO:64)
APLRK	(SEQ ID NO:65)
APLRKC	(SEQ ID NO:66)
APLRKCR	(SEQ ID NO:67)

a ich variantov, ale za predpokladu, že keď R_4 predstavuje metiononylovanú alebo nemetiononylovanú aminoskupinu aminokyselínovej sekvencie TCRLREYYDQTAQMC alebo skrátenie N-konca o 1 až 15 zvyškov, potom R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 nie je variantom vzorca R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]-APLRKCR- R_6 , kde R_6 predstavuje karboxyskupinu aminokyselínovej sekvencie Pro¹²³-Thr¹⁷⁹ z obrázka 8 alebo skrátenie jeho karboxykonca.

V jednom aspekte predkladaného vynálezu sa môžu pripraviť skrátené sTNFR v glykozylovanej alebo neglykozylovanej forme. Skrátené sTNFR sa pripravujú technikami rekombinantného génového inžinierstva. Okrem toho sa skrátené sTNFR môžu syntetizovať chemickými technikami alebo kombináciou rekombinantných a chemických techník.

V inom aspekte predkladaného vynálezu sa môžu skrátené sTNFR modifikovať pripojením skrátených sTNFR k polyméru rozpustnému vo vode. Napríklad skrátené sTNFR sa môžu konjugovať k jednej alebo viacerým molekulám polyetylénglykolu s cieľom zlepšiť farmakokinetickú účinnosť zväčšením zdanlivej molekulovej hmotnosti molekuly.

Ďalší aspekt predkladaného vynálezu zahŕňa rôzne polynukleotidy kódujúce skrátené sTNFR. Vhodné nukleotidové sekvencie zahŕňajú napríklad tie konkrétne uvedené na obrázkoch a taktiež degenerované sekvencie a ich prirodzene sa vyskytujúce alelické varianty. Takéto sekvencie nukleových kyselín sa môžu použiť pri expresii skrátených sTNFR v

eukaryotických alebo prokaryotických hostiteľských bunkách, kde sú produkty expresie alebo ich deriváty charakterizované schopnosťou ovplyvňovať aktivitu TNF.

Ďalším aspektom predkladaného vynálezu sú vektory obsahujúce polynukleotidy kódujúce skrátené sTNFR funkčne spojené (operatively link) s amplifikačnými a/alebo expresiu riadiacimi sekvenciami. Prokaryotické aj eukaryotické hostiteľské bunky môžu byť stabilne transformované alebo transfekované takýmito vektormi na expresiu skrátených sTNFR. Predkladaný vynález ďalej zahŕňa rekombinantnú produkciu skrátených sTNFR. Hostiteľské bunky obsahujúce takéto polynukleotidy sa pestujú vo vhodnom živnom médiu a bunkami exprimované skrátené sTNFR sa prípadne izolujú z hostiteľských buniek a/alebo živného média.

Ďalším aspektom predkladaného vynálezu sú farmaceutické zmesi obsahujúce skrátené sTNFR alebo ich deriváty. Typicky môžu byť skrátené sTNFR alebo ich deriváty pripravené v spojení s farmaceuticky vhodnými nosičmi. Na uľahčenie výroby, uskladnenia, manipulácie, dopravy a/alebo účinnosti skrátených sTNFR a ich variantov sa môže použiť rad materiálov.

Ďalší aspekt predkladaného vynálezu sa týka metód ovplyvnenia (methods of modulating) aktivity TNF. Konkrétne choroby sprostredkované TNF (napríklad choroby sprostredkované TNF- α a/alebo TNF- β) sa môžu liečiť podávaním terapeuticky účinných množstiev skrátených sTNFR alebo ich derivátov.

Polynukleotidy kódujúce skrátené sTNFR sa môžu využiť aj v bunkovej terapii alebo v génovej terapii.

Skrátené sTNFR predkladaného vynálezu sú vhodné najmä na produkciu proteínu vo veľkých množstvách. Napríklad sTNFR-I má deamidované miesto vnútri aminokyselinovej sekvencie 111 až 126 (aminokyseliny Asn¹¹¹-Gly¹²⁶). Predpokladá

sa, že absencia tohto miesta zvyšuje biochemickú stabilitu purifikovaného proteínu a znižuje možnú degradáciu produktu, čo sa prejaví zvýšením stability proteínu pri jeho skladovaní. Skrátené sTNFR majú menej disulfidových mostíkov ako ostatné skôr objavené proteíny inhibítorov TNF. Napríklad sTNFR-I má dva sulfidové mostíky vnútri sekvencie aminokyselín 111 až 126 a tri disulfidové mostíky vnútri sekvencie aminokyselín 127 až 161; sTNFR-II má disulfidový mostík medzi Cys¹²¹ a Cys¹³⁹, Cys¹⁴² a Cys¹⁵⁷ a Cys¹⁶³ a Cys¹⁷⁸. Znížený počet disulfidových mostíkov je dôležitý preto, že vyšší počet týchto väzieb môže komplikovať proces opätovného skladania proteínu. Je prekvapivé, že skrátené sTNFR majú menej miest pre antigénne epitopy, ako majú ostatné skôr opísané proteíny inhibítorov TNF (napríklad skrátená forma sTNFR-I s prvými tromi doménami má nový epitop vzniknutý odhalením určitých zvyškov, viď príklad III), čo značne zníži antigénnosť a ďalej dochádza k významnému zníženiu rýchlosti odbúravania pri opakovanom podávaní. Predpokladá sa, že znížená imunogénnosť skrátených sTNFR je vhodná na liečenie TNF-sprostredkovaných ochorení, najmä chronických zápalových ochorení.

Ďalšie aspekty a výhody vynálezu budú odborníkom jasné pri nasledovnom opise, kde sú podrobne opísané obvyklé metódy (practice) predkladaného vynálezu.

Detailný opis vynálezu

Predkladaný vynález je založený na neočakávanom zistení, že sa môže zmenšiť veľkosť sTNFR-I aj TNFR-II nielen odstránením štvrtej domény, ale aj časti tretej domény a prípadne aj častí prvej domény pri zachovaní biologickej aktivity a znížení antigénnosti. Produkcia týchto biologicky aktívnych skrátených sTNFR alebo ich derivátov sa pokladá za

výhodnú minimálne z nasledovných dôvodov. Po prvé tieto molekuly môžu mať o jedno potenciálne destabilizujúce deamidované miesto menej. Po druhé tieto molekuly majú menej disulfidových mostíkov a to uľahčí prípadnú purifikáciu a opätovné skladanie. Po tretie tieto molekuly majú menší počet miest pre možné antigénne epitopy.

Tu používaný termín „skrátенý(é) sTNFR“ zahŕňa jeden alebo viac biologicky aktívnych, syntetických alebo rekombinantných, molekúl vzorca R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 alebo R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 a ich varianty (vrátane inzerčných, substitučných a delečných), ktoré sú opísané nižšie.

Tu používaný termín „biologicky aktívny“ znamená, že skrátенý sTNFR vykazuje podobné TNF inhibičné vlastnosti ako sTNFR-I a/alebo sTNFR-II, aj keď nie nutne všetky a nie nutne v celom rozsahu. Všeobecne skrátенé sTNFR a ich odvodeniny majú schopnosť inhibovať TNF. Biotesty skrátенých sTNFR sú opísané nižšie v časti Príklady II. Výber konkrétnych TNF inhibičných vlastností závisí od požadovaného použitia skrátенého sTNFR.

Skrátенé sTNFR proteíny sa môžu výhodne produkovať rekombinantnými technikami v bakteriálnych, cicavčích alebo hmyzích bunkových systémoch a môžu byť buď v glykozylovanej, alebo neglykozylovanej forme. Alternatívne sa môžu syntetizovať chemicky. Produkčné metódy preferované v súčasnosti sú opísané detailne nižšie.

Všetky skrátенé sTNFR sa môžu typicky izolovať a purifikovať na značnú čistotu a zbaviť tak ostatných proteínových materiálov (napríklad neskrátенých sTNFR). Uprednostňuje sa, keď je skrátенý sTNFR na asi 80 % zbavený ostatných proteínov, ktoré môžu byť prítomné vzhľadom na produkčnú techniku použitú pri príprave skrátенých sTNFR. Je výhodné, ak je proteín ešte čistejší (na viac ako 90 %, 95 % alebo na viac ako 98 %). Je ale cenné, keď sa požadovaný proteín môže

pred podávaním kombinovať s ďalšími aktívnymi komponentmi, chemickými zlúčeninami a/alebo vhodnými farmaceutickými materiálmi, ako sa opisuje podrobnejšie nižšie.

Skrátené sTNFR

Skrátené sTNFR predkladaného vynálezu môžu byť jedným alebo viacerými proteínmi reprezentovanými nasledovným vzorcom:

$R_1\text{--}[\text{Cys}^{19}\text{--}\text{Cys}^{103}]\text{--}R_2$,

kde $[\text{Cys}^{19}\text{--}\text{Cys}^{103}]$ predstavuje zvyšky 19 až 103 (pri označení aminokyselinových zvyškov použitom na obrázku 1 (SEQ ID NO:2)), kde R_1 predstavuje metionylovanú alebo nemetionylovanú aminoskupinu Cys^{19} alebo aminokyselinový zvyšok (zvyšky) na aminokonci patriace do nasledovnej skupiny:

C	
ZC	
SIC	
NSIC	(SEQ ID NO:15)
NNSIC	(SEQ ID NO:16)
QNNSIC	(SEQ ID NO:17)
PQNNSIC	(SEQ ID NO:18)
HPQNNSIC	(SEQ ID NO:19)
IHPQNNSIC	(SEQ ID NO:20)
YIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:21)
KYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:22)
GKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:23)
QGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:24)
PQGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:25)
CPQGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:26)
VCPQGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:27)
SVCPQGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:28)
DSVCPQGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:29)

a kde R_2 predstavuje karboxyskupinu Cys^{103} alebo aminokyselínový zvyšok karboxykonca vybraný z nasledovnej skupiny:

F
FN
FNC
FNCS (SEQ ID NO:30)
FNCSL (SEQ ID NO:31)
FNCSLC (SEQ ID NO:32)
FNCSLCL (SEQ ID NO:33);

a ich varianty, ale za predpokladu, že keď R_1 predstavuje metiononylovanú alebo nemetiononylovanú aminoskupinu aminokyselínovej sekvencie VCPQGKYIHPQNNSIC alebo skrátenie N-konca o 1 až 15 zvyškov, potom R_1 -[Cys^{19} - Cys^{103}]- R_2 proteín nie je variantom vzorca R_1 -[Cys^{19} - Cys^{103}]-FNCSLCL- R_3 , kde R_3 predstavuje karboxyskupinu aminokyselínovej sekvencie Asn^{111} - Asn^{161} z obrázka 1 alebo skrátenie jeho karboxykonca.

V ďalšom prípade skrátené sTNFR predkladaného vynálezu môžu byť jedným alebo viacerými proteínmi reprezentovanými nasledovným vzorcom:

R_4 -[Cys^{32} - Cys^{115}]- R_5 ,

kde [Cys^{32} - Cys^{115}] reprezentuje sTNFR-II zvyšky Cys^{32} až Cys^{115} podľa schémy číslovania aminokyselínových zvyškov na obrázku 8 (SEQ ID NO:35), kde R_4 predstavuje metiononylovanú alebo nemetiononylovanú aminoskupinu Cys^{32} alebo aminokyselínový zvyšok (zvyšky) na aminokonci patriaci do nasledovnej skupiny:

C
MC
QMC

AQMC	(SEQ ID NO:36)
TAQMC	(SEQ ID NO:37)
QTAQMC	(SEQ ID NO:38)
DQTAQMC	(SEQ ID NO:39)
YDQTAQMC	(SEQ ID NO:40)
YYDQTAQMC	(SEQ ID NO:41)
EYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:42)
REYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:43)
LREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:44)
RLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:45)
CRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:46)
TCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:47)
STCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:48)
GSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:49)
PGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:50)
EPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:51)
PEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:52)
APEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:53)
YAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:54)
PYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:55)
TPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:56)
FTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:57)
AFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:58)
VAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:59)
QVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:60)
AGVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:61)
PAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:62)
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:63)

a kde R₃ predstavuje karboxyskupinu Cys¹¹⁵ alebo aminokyselinový zvyšok karboxykonca vybraný z nasledovnej skupiny:

A	
AP	
APL	
APLR	(SEQ ID NO:64)
APLRK	(SEQ ID NO:65)
APLRKC	(SEQ ID NO:66)
APLRKCR	(SEQ ID NO:67)

a ich varianty, ale za predpokladu, že keď R_4 predstavuje metiononylovanú alebo nemetiononylovanú aminoskupinu aminokyselínovej sekvencie TCRLREYYDQTAQMC alebo skrátenie N-konca o 1 až 15 zvyškov, potom R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 nie je variantom vzorca R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]-APLRKCR- R_6 , kde R_6 predstavuje karboxyskupinu aminokyselínovej sekvencie Pro¹²³-Thr¹⁷⁹ z obrázka 8 alebo jeho skrátenie na karboxykonci.

Ďalším aspektom predkladaného vynálezu je jeden alebo viac variantov R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 buď metiononylovaných alebo nemetiononylovaných. Termín „skrátený (skrátené) sTNFR“ teda zahŕňa jeden alebo viac prirodzene sa vyskytujúcich alelických variantov R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 a jeden alebo viac variantov proteínov, kde boli aminokyselinové zvyšky v aminokyselinových sekvenciách R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 odstránené („delečné varianty“), včlenené (inzerčné varianty) alebo substituované („substitučné varianty“).

Delécie sekvencií aminokyselín sú typicky v rozsahu asi od 20 aminokyselinových zvyškov; spravidla sa ale jedná o asi 1 až 10 zvyškov a najčastejšie o 1 až 5 zvyškov, takže nedôjde k narušeniu konformácie proteínu. Myslí sa delécia na N-konci, C-konci a vnútorných intrasekvenciách. Počet celkových delécií a/alebo následných delécií bude zvolený

tak, aby sa zachovala terciárna štruktúra proteínu v ovplyvnenej doméne, napríklad cysteínová krížová väzba.

Delécie vnútri aminokyselinovej sekvencie R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a vnútri aminokyselinovej sekvencie R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 sa môžu uskutočňovať v oblasti nízkej homológie so sekvenciami ostatných členov receptorovej rodiny NGF/TNF v skupine bunkových povrchových membránových proteínov. Delécie vnútri aminokyselinovej sekvencie R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a vnútri aminokyselinovej sekvencie R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 sa môžu uskutočňovať aj v oblasti významnej homológie so sekvenciami ostatných členov receptorovej rodiny NGF/TNF a potom je väčšia pravdepodobnosť významnej modifikácie biologickej aktivity. Sekvenčná podobnosť medzi členmi NGF/TNF receptorovej rodiny je konkrétne obzvlášť vysoká v oblastiach zodpovedajúcich prvým dvom disulfidovým slučkám domény 1, celej domény 2 a prvej disulfidovej slučke domény 3 (Banner et al. (1993), Cell, 73:431-445). Príkladom dvoch delečných variantov R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 sú R_1 -[Cys¹⁹-(Δ Thr²⁰)-Cys¹⁰³]- R_2 a R_1 -[Cys¹⁹-(Δ Cys¹⁹-Lys²¹)Cys¹⁰³]- R_2 , kde R_1 a R_2 zodpovedajú vyššie uvedenej definícii. Príkladom troch delečných variantov R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 sú R_4 -[Cys³²-(Δ Cys¹¹⁵)Cys¹¹⁵]- R_5 , R_1 -[Cys¹⁹-(Δ Cys¹¹⁵-Lys¹¹⁵)Cys¹⁰³]- R_2 a R_4 -[Cys³²-(Δ Cys¹¹⁵-Arg¹¹³)Cys¹¹⁵]- R_5 , kde R_1 a R_2 zodpovedajú vyššie uvedenej definícii.

Pridanie sekvencií aminokyselín môže zahŕňať fúzie na amino- a/alebo karboxykonci v rozsahu dĺžok od jedného zvyšku do sto alebo viac zvyškov a aj interné intrasekvenčné inzercie jedného alebo viacerých aminokyselinových zvyškov. Interné adície sú spravidla v rozsahu 1 až 10 aminokyselinových zvyškov, častejšie v rozsahu 1 až 5 aminokyselinových zvyškov a najčastejšie v rozsahu 1 až 3 aminokyselinových zvyškov.

Adičné varianty aminokonca zahŕňajú pridanie metionínu (napríklad ako výsledok priamej expresie proteínu v bakteriálnych rekombinantných bunkových kultúrach) alebo ďalšie aminokyselinové zvyšky alebo sekvencie. Ďalší príklad inzercie na aminokonci zahŕňa fúziu signálnej sekvencie, niekedy s ostatnými pre-pro sekvenciami, na uľahčenie sekrécie proteínu z rekombinantných hositeľských buniek. Pri prokaryotických hositeľských bunkách, ktoré nerozoznávajú a nespracovávajú pôvodné signálne sekvencie sTNFR-I a sTNFR-II, sa môžu signálne sekvencie nahradiť prokaryotickými signálnymi sekvenciami, napríklad zo skupiny alkalických fosfatáz, peniciláz alebo počiatočnej sekvencie teplotne odolného enterotoxínu II. Pri kvasniciach sa môžu signálne sekvencie vybrať napríklad zo skupiny kvasnicových invertáz, alfa faktora alebo počiatočnej sekvencie kyslej fosfatázy. Pri cicavčích bunkách je expresia pôvodných signálnych sekvencií s-TNFR-I a sTNFR-II (EP 393 438 a EP 422 339) dostatočná, aj keď môžu byť vhodné aj iné cicavčie signálne sekvencie (napríklad sekvencie odvodené od ostatných členov rodiny NGF/TNF).

Adičné varianty na karboxykonci nezahŕňajú pridanie jedného alebo viacerých aminokyselinových zvyškov, ktoré by ovplyvňovali rekonštitúciu s-TNFR-I alebo sTNFR-II. Je žiaduce, keď adičné varianty na karboxykonci nezahŕňajú pridanie jedného alebo viacerých zvyškov karboxylovej kyseliny, ktoré by ovplyvnili rekonštitúciu tretej alebo štvrtej domény s-TNFR-I alebo sTNFR-II. Príkladom adičného variantu na karboxykonci môžu byť chimerické proteíny zahŕňajúce fúziu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 alebo R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 s celou alebo časťou konštantnej domény ťažkého alebo ľahkého reťazca ľudského imunoglobulínu. Takéto chimerické proteíny sa preferujú, keď ich imunoglobulínová časť zahŕňa všetky domény okrem domény konštantnej oblasti ťažkého reťazca

ľudského imunoglobulínu, ako je IgG, IgA, IgM alebo IgE (najmä IgG, napríklad IgG1 alebo IgG3). Odborník ocení, že (ak TNF viažuca časť stále viaže TNF a imunoglobulínová časť vykazuje jednu alebo viac svojich charakteristických vlastností) sa môže akákoľvek aminokyselina každej imunoglobulínovej časti odstrániť alebo nahradiť jednou alebo viacerými aminokyselinami alebo že sa môže pridať jedna alebo viac aminokyselín.

Ďalšou skupinou sú varianty so substitúciou aminokyseliny. Všetky tieto varianty majú najmenej jeden aminokyselinový zvyšok v R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 alebo R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 odstránený a nahradený odlišnými zvyškami na ich miestach. Substitučné varianty zahŕňajú alelické varianty, ktoré sú charakterizované zmenami v prirodzene sa vyskytujúcich nukleotidových sekvenciách v druhovej populácii, ktoré môžu alebo nemusia mať za následok zmeny aminokyselín. Odborníci môžu použiť akúkoľvek známu informáciu o väzbovom alebo aktívnom mieste polypeptidu pri výbere možných miest pre mutácie.

Jedna metóda identifikácie aminokyselinových zvyškov alebo oblastí pre mutagenézu proteínu sa nazýva „mutagenéza alanínovým vyhľadaním“ (alanine scanning mutagenesis) (Cunningham a Wells (1989), Science, 244:1081-1085, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom). V tejto metóde je identifikovaný aminokyselinový zvyšok alebo skupina cieľových zvyškov proteínu (napríklad nabité zvyšky, ako Arg, Asp, His, Lys a Glu) a nahradený neutrálnou alebo negatívne nabitou aminokyselinou (najlepšie alanínom alebo polyalanínom) s cieľom ovplyvniť interakciu aminokyselín s okolitým vodným prostredím vnútri alebo mimo bunky. Tieto zvyšky, ktoré vykazujú funkčnú citlivosť na substitúcie, sú ďalej analyzované včlenením ďalších alebo iných zvyškov na miesto substitúcie. Tak sa vopred určí miesto na včlenenie zmenenej sekvencie nukle-

ových kyselín. Na ďalšiu optimalizáciu vlastností mutácie na danom mieste sa môže uskutočniť alanínové vyhľadávanie alebo náhodná mutagenéza. Pri výsledných variantných polypeptidoch sa zisťuje optimálna kombinácia žiaducej aktivity a stupňa aktivity.

Záujmové miesta na substitučnú mutagenézu zahŕňajú miesta, kde sú aminokyseliny vyskytujúce sa v R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 alebo R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 významne odlišné (čo sa týka podstatnej časti bočného reťazca, náboja a/alebo hydrofóbnosti) od proteínov podobných sTNFR, ako sú napríklad sTNFR rôznych iných druhov alebo iných členov receptorovej rodiny NGF/TNF.

Ďalšie záujmové miesta zahŕňajú tie, v ktorých sú určité zvyšky podobné alebo identické so zodpovedajúcimi miestami pri proteínoch podobných sTNFR-I a proteínoch podobných sTNFR-II. Takéto miesta sú všeobecne dôležité pre biologickú aktivitu proteínu. Napríklad skúsený odborník chápe, že pred týmto vynálezom nebol vplyv skrátenia sTNFR-I a sTNFR-II na ich príslušnú trojrozmernú štruktúru predvídateľný. Ale na základe tu uvedených výsledkov odborník ocení, že prvé princípy vývoja stratégie na tvorbu variantných proteínov sa mohli čiastočne zakladať na skôr vysvetlených údajoch pre sTNFR-I a sTNFR-II s úplnou dĺžkou. Nasledovné informácie boli teda objasnené o sTNFR (Banner et al. (1993), viď vyššie a Fu et al. (1995), Protein Engineering, 8(12):1233-1241). Ako potenciálne dôležité pre stabilizáciu zodpovedajúcej štruktúry domény 1, 2 a 3 sa identifikovali zvyšky Tyr⁹, Thr³⁹, His⁵⁵ domény 1, zvyšky Phe⁴⁹, Ser⁶³, Asp⁸² domény 2 a zvyšky Tyr⁹² a Ser¹⁰⁷ domény 3. Zvyšky Pro¹² a His⁵⁵ boli identifikované ako potenciálne vzájomne sa ovplyvňujúce so Ser⁸⁶-Tyr⁸⁷ na subjednotke C TNF α . Zvyšky Glu⁴⁵-Phe⁴⁹ boli identifikované ako podstata slučky, ktorá sa potenciálne vzájomne ovplyvňuje so zvyškami

Leu²⁹-Arg³² podjednotky A TNF α . Zvyšky Gly⁴⁸ boli identifikované ako vzájomne sa ovplyvňujúce s Asn¹⁹-Pro²⁰ na podjednotke A TNF α . Zvyšky His⁵⁸-Le⁶⁰ boli identifikované ako dôležitý prvok v konformácii predĺženého prameňa a interakcia bočného reťazca so zvyškami Arg³¹-Ala³³ na podjednotke A TNF α bola potenciálne identifikovaná so zvyškom His⁵⁸ sTNFR-I, ktoré sa špecificky vzájomne ovplyvňuje so zvyškom Arg³¹. Zvyšky Lys⁶⁴-Arg⁶⁶ boli identifikované ako dôležitý prvok v konformácii predĺženého prameňa a zistilo sa, že vykazujú interakcie bočného reťazca a hlavného reťazca so zvyškami Ala¹⁴⁵-Glu¹⁴⁶ a rezíduom Glu⁴⁶ na podjednotke A TNF α . Pri rezíduu Met⁶⁹ sa identifikovala možná interakcia so zvyškom Tyr¹¹⁵ na podjednotke A TNF α . Zistilo sa, že zvyšky His⁹⁴-Phe¹⁰¹ tvoria slučku, ktorá sa vzájomne ovplyvňuje so zvyškami Thr⁷²-Leu⁷⁵ a Asn¹³⁷ podjednotky C TNF α a zvyškom Trp⁹⁶ sTNFR-I, špecificky sa ovplyvňujúcim so zvyškami Ser⁷¹-Thr⁷² na podjednotke C TNF α , Leu¹⁰⁰ sTNFR-I (ktoré je v tesnej blízkosti so zvyškom Asn¹³⁷ na podjednotke C TNF α) so zvyškom Gln¹⁰² sTNFR-I (ktoré sa špecificky vzájomne ovplyvňuje so zvyškom Pro¹¹³ na podjednotke A TNF α). (Residues His⁹⁴-Phe¹⁰¹ have been identified as forming a loop which interacts with residues Thr⁷²-Leu⁷⁵ and Asn¹³⁷ of subunit C of TNF α , with residue Trp⁹⁶ of sTNFR-I specifically interacting with residues Ser⁷¹-Thr⁷² on subunit C of TNF α , Leu¹⁰⁰ of sTNFR-I being in close proximity with residue Asn¹³⁷ on subunit C of TNF α and residue Gln¹⁰² of sTNFR-I specifically interacting with residue Pro¹¹³ on subunit A of TNF α). Odborník potom ocení, že najprv by sa mali tieto miesta modifikovať substitúciou relatívne konzervatívnym spôsobom.

Takéto konzervatívne substitúcie sú uvedené v tabuľke 1 pod záhlavím „Preferované substitúcie (Preferred Substitutions). Ak takéto substitúcie vyvolajú zmeny biologickej

aktivity, potom sa môžu použiť výraznejšie substitučné zmeny (vzorové substitúcie, Exemplary substitutions) a/alebo sa môžu uskutočniť ďalšie adície/delécie a potom analýza výsledných produktov.

Tabuľka 1: Substitúcie aminokyselín

<u>Pôvodný zvyšok</u>	<u>Preferovaná substitúcia</u>	<u>Vzorová substitúcia</u>
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucín (norleucine)
Leu (L)	Ile	norleucín (norleucine); Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Leu	Leu; Val; Ile; Ala
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucín (norleucine)

Pri takýchto zmenách obdobnej povahy sa môže brať do úvahy hydropatický index (hydropatic index) aminokyselín. Každéj aminokyseline bol priradený hydropatický index na základe jej hydrofóbnosti a charakteristík náboja. Hodnoty sú nasledovné: izoleucín (+4,5); valín (+4,2); leucín (+3,8); fenylalanín (+2,8); cysteín/cystín (+2,5); metionín (+1,9); alanín (+1,8); glycín (-0,4); treonín (-0,7); serín (-0,8); tryptofán (-0,9); tyrozín (-1,3); prolín (-1,6); histidín (-3,2); glutamát (-3,5); glutamín (-3,5); aspartát (-3,5); asparagín (-3,5); lyzín (-3,9) a arginín (-4,5).

Dôležitosť hydropatického indexu aminokyselín pri porovnaní interaktívnych biologických funkcií na proteíny je odborníkom spravidla jasná (Kyte a Doolittle (1982), J. Mol. Biol., 157:105-131, ktorého opis je tu zahrnutý pomocou odkazu). Je známe, že určité aminokyseliny môžu byť substituované za iné s podobným hydropatickým indexom alebo stavom a stále sa zachová podobná biologická aktivita. Ak sa robia zmeny založené na hydropatickom indexe, preferujú sa substitúcie aminokyselín, ktorých hydropatický index je v rozsahu ± 2 alebo lepšie v rozsahu ± 1 alebo najlepšie $\pm 0,5$.

Odborníkom je známe aj to, že substitúcia podobných aminokyselín sa môže efektívne uskutočniť na základe hydrofilnosti najmä vtedy, keď biologicky funkčný ekvivalentný proteín alebo peptid takto vytvorený sa bude používať na imunologické účely ako v tomto prípade.

US patent 4 554 101 (ktorého opis je tu zahrnutý odkazom) hovorí, že najväčšia miestna priemerná hydrofilnosť proteínu (určovaná hydrofilnosťou svojich priľahlých aminokyselín) koreluje s jeho imunogénnosťou a antigénnosťou, t.j. s biologickými vlastnosťami proteínu.

Ako sa detailne opisuje v US Patent 4 554 101, jednotlivým aminokyselinovým zvyškom sa priradili nasledovné hodnoty hydrofilnosti: arginín (+3,0); lyzín (+3,0);

aspartát (3,1 $\pm$ 1); glutamát (+3,0 $\pm$ 1); serín (+0,3);
 asparagín (+0,2); glutamín (+0,2); glycín (0); treonín
 (-0,4); prolín (-0,5 $\pm$ 1)); alanín (-0,5); histidín (-0,5);
 cysteín (-1,0); metionín (-1,3); valín (-1,5); leucín
 (-1,8); izoleucín (-1,8); tyrozín (-2,3); fenylalanín (-2,5)
 a tryprofán (-3,4).

Ak sa robia zmeny založené na podobnej hodnote hodnôt hydrofilnosti, preferujú sa substitúcie aminokyselín, ktorých hodnoty hydrofilnosti sú v rozsahu ± 2 alebo lepšie ± 1 alebo najlepšie $\pm 0,5$.

U.S. Patent 4 554 101 opisuje aj identifikáciu a prípravu epitopov z primárnej aminokyselinovej sekvencie na základe hydrofilnosti. Metódou uvedenou v U.S. Patent 4 554 101 by bol odborník schopný identifikovať epitopy vnútri sekvencie aminokyselín, ako sú tu opísané sekvencie sTNFR. Tieto oblasti sú uvedené ako „epitopové vnútorné oblasti“ (epitopic core regions).

Rad vedeckých publikácií bol zameraný na predpoveď sekundárnej štruktúry a identifikáciu epitopov analýzou sekvencie aminokyselín (Chou a Fasman (1974), Biochemistry, 13(2):222-245; Chou a Fasman, Biochemistry, 113(2):211-222; Chou a Fasman, (1978) Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148; Chou a Fasman, Ann. Rev., Biochem., 47:251-276 a Chou a Fasman (1979), Biophys. J., 26:367-384 (ktorých opisy sú tu zahrnuté odkazom). Okrem toho sú v súčasnosti k dispozícii počítačové programy na pomoc s predpoveďou antigénnych častí a epitopovej vnútornej oblasti proteínov. Príkladom sú programy založené na Jamesonovej-Wolfovej analýze (Jameson a Wolf (1998). Comput. Appl. Biosci., 4(1):181-186 a Wolf et al. (1988), Comput. Appl. Biosci., 4(1):187-191, ktorých opisy sú tu zahrnuté odkazom), program PepPlot (Brutlag et al. (1990), CABS, 6:237-245 a Weinberger et al. (1985), Science, 228:740-742, ktorých opis je tu

zahrnutý odkazom) a ostatné nové programy na predpoved terciárnej štruktúry proteínov (Fetrow a Bryant (1993), Biotechnology, 11:479-483, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom).

Očakáva sa, že konzervatívne modifikácie sekvencií aminokyselín (a príslušné modifikácie kódujúcej sekvencie nukleových kyselín) R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 alebo R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 dajú proteíny s podobnými funkciami a chemickými charakteristikami ako modifikovaný proteín.

Naproti tomu sa môže dosiahnuť významná modifikácia vo funkcii a/alebo chemickej charakteristike R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 výberom substitúcií, ktoré sa výrazne líšia svojím vplyvom na zachovanie: a) štruktúry polypeptidovej kostry v oblasti substitúcie (napríklad skrutkovicová konformácia alebo konformácia listu), b) náboja alebo hydrofóbnosti proteínu na cieľovom mieste, c) prevažnej časti bočného reťazca. Prirodzene sa vyskytujúce zvyšky sú rozdelené do skupín založených na vlastnostiach bočného reťazca:

- A. hydrofóbne: norleucín, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- B. neutrálne hydrofilné: Cys, Ser, Thr;
- C. kyslé: Asp, Glu;
- D. zásadité: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- E. zvyšky, ktoré ovplyvňujú orientáciu reťazca: Gly, Pro a
- F. aromatické: Trp, Tyr, Phe.

Nekonzervatívne substitúcie môžu zahŕňať výmenu člena jednej z týchto skupín za iný. Takáto zámena sa môže vnieť do oblastí R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 , ktoré sú homológne alebo nehomológne s inými členmi rodiny receptorov NGF/TNF.

Špecifické mutácie sekvencií R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 môžu zahŕňať substitúciu nepôvodných (non-

native) aminokyselín na N-konci, C-konci alebo na akomkoľvek mieste proteínu, ktoré je modifikované pridaním N-viazaného alebo O-viazaného cukru. Takéto modifikácie môžu byť obzvlášť užitočné napríklad pri pridaní aminokyseliny (napr. cysteínu), čo je výhodné na pripojenie vo vode rozpustného polyméru pri tvorbe derivátov, ako sa opisuje ďalej. Príklad vidno na obrázku 5, kde pôvodne sa vyskytujúci Asn¹⁰⁵ sTNFR-I je zamenený za Cys na uľahčenie naviazania molekuly polyetylénglykolu (príklad I).

Sekvencia R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂ alebo R₄-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₅ sa môže ďalej modifikovať s cieľom pridať glykozylačné miesto alebo odstrániť N-viazané alebo O-viazané glykozylačné miesto. Asparagínom pripojené glykozylačné rozpoznávacie miesto zahŕňa tripeptidovú sekvenciu, ktorá je špecificky rozpoznávaná príslušným bunkovým glykozylačným enzýmom. Tieto tripeptidové sekvencie sú Asn-Xaa-Thr alebo Asn-Xaa-Ser, kde Xaa môže byť akákoľvek aminokyselina okrem Pro. Dokázané alebo predpovedané asparagínové zvyšky sTNFR-I existujú v polohách 14, 105 a 111. Dokázané alebo predpovedané asparagínové zvyšky sTNFR-II existujú v polohách 149 a 171. Na modifikáciu alebo pridanie N-viazaných alebo O-viazaných glykozylačných miest sa môže uskutočniť náhrada alebo odstránenie aminokyseliny; výsledkom je proteín s pozmenenou glykozyláciou.

V špecifickom prípade sú varianty značne homológne k aminokyseline R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂ alebo R₄-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₅. Termín „značne homológne“, ako sa tu používa, znamená stupeň homológie, ktorý je prednostne nad 70 % alebo lepšie nad 80 %, nad 90 % a najlepšie dokonca nad 95 %. Percento homológie, tu opísané, sa vypočíta ako percento aminokyselinových zvyškov nájdených v menšej z dvoch sekvencií, ktoré sa zhodujú (which align) s identickými aminokyselinovými zvyškami v porovnávacej sekvencii, pričom sa môžu uviesť

štyri medzery (gaps) s dĺžkou 100 aminokyselín na uľahčenie tohto porovnania, ako sa uvádza v Dayhoff (1972), in Atlas of Protein Sequences and Structure, 5:124, National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C., ktorého opis je tu zahrnutý odkazom. Ako podstatne homológne sú zahrnuté aj skrátené sTNFR, ktoré môžu byť izolované vďaka krížovej reakcii protilátok so sekvenciou aminokyselín v SEQ IF NO:2 a SEQ ID NO:35, alebo ktorých gény môžu byť izolované pomocou hybridizácie s DNA SEQ ID NO:1a alebo SEQ ID NO:34 alebo ich segmentmi.

Medzi príklady sTNFR predkladaného vynálezu patria nasledovné molekuly: $\text{NH}_2\text{-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FC-COOH}$ (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.6D/C105); $\text{NH}_2\text{-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.6D/C106); $\text{NH}_2\text{-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FN-COOH}$ (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.6D/N105); $\text{NH}_2\text{-MYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.3D/d8); $\text{NH}_2\text{-M-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.3D/d18) a $\text{NH}_2\text{-MSIS-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (uvádzaná aj ako sTNFR-I 2.3D/d15) buď metionylované alebo nemetionylované a ich varianty a odvodeniny.

Produkcia variantov skrátených sTNFR sa opisuje podrobnejšie nižšie. Takéto varianty sa môžu pripraviť včlenením príslušných nukleotidových zmien do DNA kódujúcej skrátené sTNFR alebo chemickou syntézou *in vitro* požadovaných skrátených sTNFR. Odborníci ocenia, že sa môže uskutočniť mnoho kombinácií delécií, inzercií a substitúcií za predpokladu, že výsledné sTNFR sú biologicky aktívne.

Techniky mutagenézy na výmenu, včlenenie alebo odstránenie jedného alebo viacerých vybraných aminokyselinových zvyškov sú odborníkom známe (napr. U.S. Patent No. 4 518

584, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom). Pri konštrukcii každého variantu sekvencie aminokyselín sa uplatnia dve základné premenné, a to umiestnenie mutačného miesta a povaha mutácie. Pri návrhu každého variantu bude umiestnenie každej mutácie a jej povaha záležať na modifikovanej biochemickej charakteristike (alebo modifikovaných biochemických charakteristikách). Každé mutačné miesto sa môže modifikovať individuálne alebo v sérii, napr. 1) najprv substitúciou vybraných konzervatívnych aminokyselín a potom s radikálnejším výberom v závislosti od dosiahnutého výsledku, 2) odstránením cieľového aminokyselinového zvyšku, 3) včlenením aminokyselinových zvyškov do susedstva vybraného miesta.

Chemicky modifikované deriváty alebo skrátené sTNFR môže odborník pripraviť tu opísaným postupom. Konjugáty sa môžu pripraviť použitím glykozylovaných, neglykozylovaných alebo deglykozylovaných skrátených sTNFR. Typicky sa používajú neglykozylované skrátené sTNFR. Medzi vhodné chemické zložky (moieties) na úpravu (derivatization) skrátených sTNFR patria vo vode rozpustné polyméry.

Vo vode rozpustné polyméry sú vhodné, pretože proteín, na ktorom sú naviazané, nebude precipitovať vo vodnom prostredí, ako napríklad vo fyziologickom prostredí. Je žiaduce, aby polymér bol farmaceuticky prijateľný na prípravu terapeutických produktov alebo zmesí. Odborník bude schopný vybrať príslušný polymér v závislosti od úvahy, či konjugát polymér/proteín bude použitý terapeuticky a ak áno, od žiaducej dávky, cirkulačnej doby a odolnosti voči proteolýze.

Medzi vhodné klinicky akceptovateľné vo vode rozpustné polyméry patrí polyetylén glykol (PEG), polyetylén glykol-propiónaldehyd, kopolyméry etylén glykolu a propylén glykolu, monometoxypolyetylén glykol, karboxymetylcelulóza, dextrán, polyvinylalkohol (PVA), polyvinylpyrolidón, poly-1,3-

dioxalán, poly-1,3-trioxán, kopolymér etylénu a maleínanhydridu, poly(β -aminokyselina) (buď homopolymér alebo náhodné kopolyméry), poly(n-vinylpyrolidón)polyetylénglykol, homopolyméry propylénglykolu (PPG) a ďalšie polyalkylénové oxidy, kopolyméry polypropylénoxidu a etylénoxidu, polyoxyetylované polyoly (POG) (napr. glycerol), polyoxyetylovaný sorbitol alebo polyoxyetylovaná glukóza, kolónové kyseliny (colonic acids) alebo iné sacharidové polyméry, Ficoll alebo dextrán a ich zmesi.

Pod polyetylénglykolom sa tu rozumie akákoľvek z foriem, ktorá sa použila na derivatizáciu iných proteínov, ako napr. mono-(C1-C10)alkoxy- alebo aryloxypolyetylénglykol. Polyetylénglykolpropiónaldehyd môže byť výhodný pri výrobe vzhľadom na svoju stabilitu vo vode.

Každý z polymérov rozpustných vo vode môže mať ľubovoľnú molekulovú hmotnosť a môže byť rozvetvený alebo nerozvetvený. Typická priemerná molekulová hmotnosť vo vode rozpustných polymérov je asi medzi 2 kDa a 100 kDa (termín „asi“ naznačuje, že v preparátoch vo vode rozpustných proteínov majú niektoré molekuly väčšiu hmotnosť a niektoré menšiu, ako je uvedená molekulová hmotnosť). Preferovaná priemerná molekulová hmotnosť vo vode rozpustných polymérov je od asi 5 kDa do 50 kDa, lepšie od asi 12 kDa do asi 40 kDa a najlepšie od asi 20 kDa do asi 35 kDa.

Všeobecne, čím je molekulová hmotnosť vyššia alebo čím viac je rozvetvený, tým väčší je pomer polymér:proteín. V závislosti od požadovaného terapeutického profilu (napr. od dĺžky trvania požadovaného uvoľňovania; od účinku, ak existuje, na biologickú aktivitu; od ľahkosti manipulácie; od stupňa alebo absencie antigénnosti a od iných známych účinkov vo vode rozpustných polymérov na terapeutické proteíny) sa môžu použiť aj iné veľkosti.

Každý z polymérov rozpustných vo vode by mal byť naviazaný na proteín so zreteľom na vplyv na funkčné alebo antigénne oblasti proteínu. Všeobecne sa môže chemické modifikovanie uskutočňovať za akýchkoľvek vhodných podmienok použitých na reakciu proteínu s aktivovanou molekulou polyméru. Medzi aktivovateľné skupiny (activating groups), ktoré môžu byť použité na naviazanie vo vode rozpustného proteínu na jeden alebo viac proteínov, patria nasledovné: sulfónová, maleimidová, sulfhydrylová, tiolová, triflátová, trezylátová, azidirínová, oxiránová a 5-pyridylová.

Všetky vo vode rozpustné proteíny sú všeobecne naviazané na proteín na α - alebo ϵ -aminoskupine aminokyseliny alebo na reaktívnej tiolovej skupine. Vo vode rozpustná skupina môže byť naviazaná na akejkolvek reaktívnej skupine proteínu, ktorá je dostatočne reaktívna na naviazanie ku skupine rozpustnej vo vode za vhodných reakčných podmienok. Aminokyselinové zvyšky s voľnou aminoskupinou môžu zahŕňať lyzínové zvyšky a zvyšky aminokyselín na N-konci. Tie s voľnou karboxyskupinou môžu zahŕňať zvyšky kyseliny asparágovej, zvyšky kyseliny glutámovej a zvyšky aminokyselín na C-konci. Tie s reaktívnou tiolovou skupinou zahŕňajú cysteínové zvyšky.

Metódy prípravy proteínov konjugovaných s polymérmi rozpustnými vo vode budú všeobecne zahŕňať tieto kroky: a) reakciu proteínu s polymérom rozpustným vo vode za podmienok, kedy sa proteín naviaže na jeden alebo viac vo vode rozpustných polymérov, b) získanie reakčného produktu. Reakčné podmienky pre každú konjugáciu sa môžu vybrať ľubovoľne zo známych alebo z tých, ktoré sa vyvinú, ale tak, aby sa vylúčilo alebo obmedzilo pôsobenie reakčných podmienok (ako je teplota, rozpúšťadlá alebo hodnota pH), ktoré by mohli inaktivovať modifikovaný proteín. Všeobecne sa optimálne reakčné podmienky pre reakcie určia prípad od prípadu v závislosti od známych parametrov a požadovaného výsledku. Napríklad čím väčší je pomer

konjugátu vo vode rozpustný polymér:proteín, tým väčšie je percento konjugovaného produktu. Optimálny pomer (v zmysle účinnosti reakcie, takže nedochádza k nadbytku nezreagovaného proteínu alebo polyméru) môže byť daný takými faktormi, ako je stupeň derivatizácie (napr. mono-, di-, tri- atď.), molekulovou hmotnosťou vybraného polyméru, tým, či je polymér rozvetvený alebo nerozvetvený a použitými reakčnými podmienkami. Pomer vo vode rozpustného proteínu (napr. PEG-u) k proteínu bude všeobecne v rozsahu 1:1 až 1:100. Z každej zmesi sa môže získať štandardnými izolačnými technikami (ku ktorým patrí napr. dialýza, vysoľovanie, ultrafiltrácia, iónová chromatografia, gélová filtrácia a elektroforéza) jeden alebo viac purifikovaných konjugátov.

Môže sa vyskytnúť požiadavka na proteín chemicky modifikovaný na N-konci. Vo vode rozpustný polymér sa môže vybrať na základe molekulovej hmotnosti, rozvetvenia atď., podielu vo vode rozpustného polyméru k proteínovým (alebo peptidovým) molekulám v reakčnej zmesi, typu uskutočňovanej reakcie a metódy získania vybraného na N-koncovo modifikovaného proteínu. Metódou získania N-koncovo chemicky modifikovaného proteínového preparátu (t.j. separácie tejto aktívnej zložky od ostatných monoderivatizovaných zložiek, ak je to nutné) môže byť purifikácia N-koncovo chemicky modifikovaného proteínového materiálu z populácie chemicky modifikovaných proteínových molekúl. Selektívna chemická modifikácia na N-konci sa môže uskutočniť redukčnou alkyláciou, ktorá využije rozdielnú reaktivitu odlišných typov primárnych aminoskupín (lyzín oproti N-koncu) dostupných v určitom proteíne na derivatizáciu. Za vhodných reakčných podmienok sa dosiahne značná selektívna derivatizácia proteínu na N-konci s polymérom obsahujúcim karbonylovú skupinu. Napríklad možno selektívne naviazať vo vode rozpustný polymér na N-koniec proteínu reakciou pri pH, ktoré umožní využiť výhodu rozdielneho pK medzi ϵ -aminoskupinou lyzínových

zvyškov a α -aminoskupinou zvyšku na N-konci proteínu. Takou selektívnou derivatizáciou sa riadi naviazanie vo vode rozpustného polyméru na proteín: konjugácia s polymérom sa uskutoční prevažne na N-konci proteínu a nedochádza k významnej modifikácii ostatných reakčných skupín, ako napríklad aminoskupín na lyzínovom bočnom reťazci. Pri redukčnej alkylácii môže byť vo vode rozpustný polymér jedným z vyššie opísaných typov a mal by mať jeden reakčný aldehyd na spojenie s proteínom. Môže sa použiť polyetylénglykolpropiónaldehyd obsahujúci jeden reaktívny aldehyd.

Predkladaný vynález sa zaoberá konkrétne chemicky upravenými proteínmi s mono- alebo poly- (napr. 2 až 4) PEG-zložkami. PEGylácia (pegylation) sa môže uskutočniť akoukoľvek alkylačnou reakciou s PEG-om známou odborníkom. Metódy prípravy PEGylovaných proteínových produktov spravidla zahŕňajú tieto kroky: a) reakciu proteínového produktu s polyetylénglykolom (napríklad s reaktívnym esterom alebo aldehydovým derivátom PEG-u) za podmienok, kedy dôjde k naviazaniu proteínu na jednu alebo viac PEG-skupín a b) získanie reakčného produktu (reakčných produktov). Všeobecne optimálne reakčné podmienky pre reakciu sa určia prípad od prípadu na základe známych parametrov a požadovaného výsledku.

Odborníkom je známy rad metód naviazania. Príkladom je napr. EP 0 401 384, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom; vid' aj Malik et al. (1992), Exp. Hematol., 20:1028-1035; Francis (1992), Focus on growth Factors, 3(2):4-10 (publikované Mediscript, Mountain Court, Frien Barnet Lane, London N20 OLD, UK); EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; WO 95/34326; a ostatné tu citované publikácie, ktoré sa vzťahujú k PEGyláciám, ktorých opis tu je zahrnutý odkazom.

PEGylácia sa môže konkrétne uskutočniť acylačnou reakciou alebo alkylačnou reakciou s reaktívnou molekulou polyetylénglykolu. Čiže proteínové produkty podľa predkladaného vynálezu

zahrňajú aj PEGylované proteíny (pegylated proteins), kde je (sú) skupina PEG (skupiny) naviazaná cez acylovú alebo alkylovú skupinu. Takéto produkty môžu byť mono- alebo poly- PEGylované (napr. obsahujúce 2 až 6 alebo lepšie 2 až 5 skupín PEG).

Skupiny PEG sú všeobecne naviazané na proteíny na α - alebo ε -aminoskupinách aminokyselín, ale je nutné vziať do úvahy aj to, že skupiny PEG môžu byť naviazané na akejkolvek aminoskupine naviazanej na proteíny, ktorá je dostatočne reaktívna na to, aby sa mohla naviazať na skupinu PEG za vhodných reakčných podmienok.

PEGylácia všeobecne zahŕňa reakciu aktívneho esterového derivátu polyetylénglykolu (PEG) s proteínom. Polymér (polyméry) vybraný na acylačnú reakciu by mal mať jednu reaktívnu esterovú skupinu. Na PEGyláciu sa môže použiť akákoľvek známa alebo následne objavená reaktívna molekula PEG. Preferovaným aktivovaným esterom PEG je PEG esterifikovaný na N-hydroxysukcínimide (NHS). Pod „acyláciou“ sa tu myslia nasledovné typy väzieb (bez obmedzenia len na ne) medzi terapeutickým proteínom a vo vode rozpustným polymérom (napr. PEG-om): amidová, karbamátová, uretánová a podobne (viď Chamov (1994), Bioconjugate Chem., 5(2):133-140; ktorého opis je tu zahrnutý odkazom). Reakčné podmienky sa môžu vybrať zo známych odborníkom v s PEGylácii alebo prípadne novovyvinuté, ale mali by sa vylúčiť také podmienky, ktoré by viedli k inaktivácii modifikovaných proteínov (napr. teplota, rozpúšťadlo, pH).

PEGylácia acyláciou vedie spravidla k proteínom s viacerými molekulami PEG (poly-pegylated protein). Preferuje sa, keď je spojovacia väzba amid. Preferuje sa aj to, keď je výsledný produkt z väčšej časti (napr. z viac ako 95 %) mono-, di- alebo tri-PEGylovaný. Môže ale dôjsť aj k tvorbe niektorých produktov s vyšším stupňom PEGylácie v množstvách závislých od použitých špecifických reakčných podmienok. Ak je to potrebné, môžu sa zo zmesi oddeliť čistejšie PEGylované komponenty (najmä

nezreagovaných druhov) štandardnými purifikačnými postupmi, medzi ktoré patrí napr. dialýza, vysoľovanie, ultrafiltrácia, ionexová chromatografia, gélová filtrácia a elektroforéza.

PEGylácia alkyláciou všeobecne zahŕňa reakciu koncového aldehydového derivátu PEGu s proteínom za prítomnosti redukčného činidla. Na reakciu redukčnej alkylácie by vybraný proteín (proteíny) mal mať jednu reaktívnu aldehydovú skupinu. Príkladom reaktívneho aldehydu PEG je polyetylén glykol-propiónaldehyd, ktorý je vo vode stabilný, alebo jeho mono-Cl-ClO-alkoxy alebo aryloxyderiváty (viď U.S. patent 5 252 714, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom).

Výsledkom PEGylácie alkyláciou môže byť aj proteín s viacerými molekulami PEG (poly-pegylated protein). Navyše možno ovplyvniť reakčné podmienky s cieľom podstatne uprednostniť PEGyláciu len α -aminoskupiny na N-konci proteínu (t.j. proteínu s jednou molekulou PEG). V oboch prípadoch (monoPEGylácie alebo polyPEGylácie) sú skupiny PEG prednostne naviazané na proteíny cez skupinu $-\text{CH}_2-\text{NH}-$. Pokiaľ ide o skupinu $-\text{CH}_2-$, tento typ spojenia je tu uvádzaný ako „alkylová“ väzba.

Redukčná alkylácia na produkciu značne homogénnej populácie produktu monopolymér/proteín bude všeobecne zahŕňať nasledovné kroky: a) reakcia proteínu s reaktívnou molekulou PEG za podmienok pre redukčnú alkyláciu a pri pH umožňujúcom selektívnu modifikáciu α -aminoskupiny na aminokonci daného proteínu a b) získanie reakčného produktu (produktov). Príprava derivátov redukčnou alkyláciou na produkciu produktov s jednou molekulou PEG využíva rozdiely pKa medzi lyzínovou aminoskupinou a α -aminoskupinou na N-konci (pKa je pH, kedy 50 % aminoskupín je protónovaných a 50 % nie).

Reakcia prebieha pri pH, ktoré umožní využiť rozdiel pKa medzi ϵ -aminoskupinami lyzínových zvyškov a α -aminoskupinou

zvyšku na N-konci proteínu. Všeobecne ak je pH nižšie, bude žiaduca väčšia prevaha polyméru k proteínu (t.j. čím menej reaktívna je α -aminoskupina N-konca, tým viac polyméru bude potrebné na dosiahnutie optimálnych podmienok). Ak je pH vyššie, pomer polymér:proteín nemusí byť taký vysoký (t.j. k dispozícii sú reaktívnejšie skupiny, takže je potrebné menej molekúl polyméru). Na účely predkladaného vynálezu bude pH spravidla v rozsahu 3 až 9 alebo lepšie 3 až 6. Na redukčnú alkyláciu by redukčné činidlo malo byť stabilné vo vodných roztokoch a tiež schopné redukovať len Schiffovu zásadu tvorenú na začiatku procesu redukčnej alkylácie. Vhodné redukčné činidlá sa môžu vybrať zo súboru zahŕňajúceho borohydrid sodný (sodium borohydride), kyanoborohydrid sodný (sodium cyanoborohydride), dimetylamínborán (dimethylamin borane), trimetylamínborán, pyridínborán (pyridine borane). Obzvlášť vhodným redukčným činidlom je kyanoborohydrid sodný. Ostatné reakčné parametre, ako je napríklad rozpúšťadlo, reakčný čas, teplota a spôsob purifikácie produktu, sa môžu určiť prípad od prípadu a odvodiť na základe publikovaných informácií vzťahujúcich sa na prípravu derivátov proteínov s polymérmi rozpustnými vo vode.

Takouto selektívnou prípravou derivátov sa riadi naviazanie vo vode rozpustného polyméru (ktorý obsahuje reaktívnu skupinu, ako napríklad aldehyd) na proteín: konjugácia s polymérom sa uskutoční prevažne na N-konci proteínu a nedochádza k významnej modifikácii ostatných reaktívnych skupín, ako sú aminoskupiny lyzínového bočného reťazca. Prípravok bude typicky viac ako na 90 % tvorený konjugátom monopolymér/proteín (spravidla na viac ako 95 % konjugátom monopolymér/proteín) s tým, že sa budú vyskytovať aj zistiteľné nezreagované molekuly (t.j. proteín bez polymérovej zložky).

Špecifickým prípadom predkladaného vynálezu je nerozvetvená molekula monometoxypolyetylén glykolaldehydu

(unbranched monomethoxy-polyethylene glykol aldehyde molecule) s priemernou molekulovou hmotnosťou buď asi 20 kDa alebo asi 33 kDa (napr. medzi 30 kDa a 35 kDa) alebo terciárny butyl-polyetylénglykolaldehyd (tertiary-butyl polyethylene glycol aldehyde) s priemernou molekulovou hmotnosťou asi 33 kDa (napr. medzi 30 kDa a 35 kDa) konjugovaných redukčnou alkyláciou k sTNFR-I 2,6D/N105.

PEGylácia sa môže špeciálne uskutočniť cez polyméry rozpustné vo vode s aspoň jednou reaktívnou hydroxyskupinou (napr. polyetylénglykol), ktoré môžu reagovať s činidlom s reaktívnou karbonylovou, nitrilovou alebo sulfónovou skupinou na konverziu hydroxylovej skupiny na reaktívny Michaelov akceptor (reactive Michael acceptor). Tým sa vytvorí „aktivovaná spojka (activated linker)“ užitočná pri modifikácii rôznych proteínov s cieľom poskytnúť lepšie biologicky aktívne konjugáty. „Reaktívny karbonyl, nitril alebo sulfón“ znamená karbonylovú, nitrilovú alebo sulfónovú skupinu, na ktorej je naviazaná skupina s dvoma atómami uhlíka s reaktívnym miestom pre tiol-špecifickú väzbu na druhom uhlíku od karbonylovej, nitrilovej alebo sulfónovej skupiny (WO 92/16221).

Aktivované spojky môžu byť monofunkčné, bifunkčné alebo multifunkčné. Užitočnými činidlami s reaktívnou sulfónovou skupinou, ktoré sa môžu použiť v týchto metódach, sú (bez obmedzenia len na ne) chlórsulfón, vinylsulfón a divinylsulfón.

V špecifickom prípade sa môže vo vode rozpustný polymér aktivovať Michaelovým akceptorom. WO 95/13312 opisuje (okrem iného) vo vode rozpustné, sulfónom aktivované PEGy, ktoré sú vysokoselektívne pre väzbu s tiolovou zložkou namiesto aminozložiek na molekule a na povrchu. Tieto deriváty PEGu sú dlhšie stabilné pri hydrolýze vo vodnom prostredí pri pH 11 alebo nižšom a môžu tvoriť väzby s molekulami, pričom dochádza k tvorbe konjugátov, ktoré sú tiež hydrolyticky stabilné. Väzba, ktorou sú konjugované PEGy a biologicky aktívna

molekula, zahŕňajú sulfónovú zložku spojenú s tiolovou zložkou a majú štruktúru $\text{PEG-SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-W}$, kde W predstavuje biologicky aktívnu molekulu a kde sulfónová skupina je vinylsulfón alebo aktívny etylsulfón. Dva osobitne užitočné homobifunkčné (homobifunctional) deriváty sú PEG-bis-chlórsulfón a PEG-bis-vinylsulfón

PCT International Application No. US96/19459, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom, uvádza metódu prípravy sulfónom aktivovaných väzieb (sulfone activated linkers) získaním zlúčeniny s reaktívnou hydroxylovou skupinou a konverziou hydroxylovej skupiny na reaktívny Michaelov akceptor na vytvorenie aktivovanej spojky (activated linker). Ako rozpúšťač na konverziu sa použije tetrahydrofurán (THF). PCT International Application No. US96/19459, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom, uvádza postup purifikácie aktivovaných spojok, ktorý používa chromatografiu s hydrofóbnymi interakciami založenú na separácii spojok podľa veľkosti a funkčnosti koncovej skupiny.

Predkladaný vynález sa konkrétne zaoberá nasledovnými prokaryoticky exprimovanými molekulami chemicky pozmenenými tak, aby obsahovali poly- (napr. 2 až 4) zložky PEG: sTNFR-I 2.6D/C105, sTNFR-I 2.6D/C106, sTNFR-I 2.6D/N105, sTNFR-I 2.3D/d8, sTNFR-I 2.3D/18 a sTNFR-I 2.3D/d15, buď metionylovanými alebo nemetionylovanými a ich variantmi.

Polyvalentná forma (formy)

Môže sa pripraviť polyvalentná forma (formy), t.j. molekuly obsahujúce viac ako jednu aktívnu zložku (active moiety). V jednom prípade môže mať molekula viac väzbových miest pre faktor nekrotizujúci tumory pre TNF ligand (napr. kombinácia skráteného sTNFR produktu). Molekula má ďalej najmenej jedno väzbové miesto pre faktor nekrotizujúci tumory a (v závislosti od požadovaných vlastností polyvalentnej formy) najmenej jedno

väzbové miesto pre inú molekulu (napr. kombinácia najmenej jedného skráteného sTNFR produktu a najmenej jedného antagonistu interleukín-1 receptora („IL-1ra“), ako sa opisuje ďalej).

Môžu sa vytvoriť aj polyvalentné formy, napr. chemickým spojením najmenej jedného skráteného sTNFR produktu s akoukoľvek klinicky akceptovateľnou spojkou (linker) (napr. vo vode rozpustným polymérom, ako sa opisuje ďalej). Spravidla by spojka nemala dodávať novú imunogénnosť (vzhľadom na nové aminokyselinové zvyšky) alebo pozmeňovať hydrofóbnosť a náboj konštruktu tak, aby došlo ku škodlivému ovplyvneniu jeho biodistribúcie a odbúravania.

Takéto polyméry, ak sa použijú ako spojky, môžu byť homopolyméry, náhodné alebo blokujúce kopolyméry (homopolymer, random or block copolymers) a terpolyméry (terpolymers) založené na vyššie uvedených monoméroch, nerozvetvené alebo rozvetvené, substituované alebo nesubstituované. Polymér môže mať akúkoľvek dĺžku alebo molekulovú hmotnosť, ale tieto charakteristiky môžu ovplyvniť biologické vlastnosti. Polyméry obzvlášť vhodné na zníženie rýchlosti odbúravania vo farmaceutických aplikáciách majú priemernú molekulovú hmotnosť v rozsahu 2000 až 35000 daltonov. Dĺžka polyméru môže byť navyše rozmanitá na optimalizáciu alebo vytvorenie požadovaných biologických aktivít.

Medzi aktivované (activating) skupiny, ktoré sa môžu použiť na naviazanie vo vode rozpustného polyméru na dva alebo viac proteínov, patria nasledovné: sulfónová, maleimidová, sulfhydrylová, tiolová, triflátová, trezylátová, azidirínová, oxiránová a 5-pyridylová (sulfone, maleimide, sulfhydryl, thiol, triflate, tresylate, azidirine, oxirane and 5-pyridyl).

V špecifickom prípade sa môžu bifunkčné alebo multifunkčné aktivované spojky s aspoň jedným Michaelovým akceptorom pripraviť podľa United States Patent Application No. 08/473 809

a purifikovať podľa United States Patent Application No. 08/611 918.

Aktívne zložky sa môžu naviazať použitím konvenčných pripojovacích (coupling) techník (viď PCT Publication No. WO 92/16221 a viď PCT Publication No. WO 95/34326, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom). Okrem toho PCT Publication No. WO 92/16221 opisuje prípravu rôznych dimerizovaných inhibítorových molekúl sTNFR-I, napr. dimerizované c105 sTNFR-I. Príklad polyvalentného faktora nekrotizujúceho tumory väzbového proteínu vzorca (sTNFR-I 2,6D/C106)₂-(20 kDa PEG) je uvedený v príklade I.

Alebo sa bivalentná molekula môže skladať z dvoch tandemových opakovaní skrátených sTNFR produktov oddelených polypeptidovou spojkou (by polypeptide linker region). Návrh polypeptidových spojok je podobný návrhu vloženia krátkej slučky sekvencií medzi domény *de novo* navrhovaných proteínov (Mutter (1998), TIBS, 13: 206-265 a Regan a DeGrado (1988), Science, 242:976-978, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom). Ukázalo sa, že spojka vhodná pre jednoreťazcové protilátky je účinná na vytvorenie dimérnej formy rekombinantného ľudského sTNFR-II (Neve et al. (1996), Cytokine, 8(5):365-370, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom). Pripravilo sa (a úspešne použilo pri protilátkach) niekoľko odlišných konštruktov spojok; najúspešnejšie funkčné spojky majú veľkosť medzi 12 až 25 aminokyselinami (aminokyseliny s nereaktívnymi bočnými skupinami, napr. alanín, serín a glycín), čo dohromady tvorí hydrofilnú sekvenciu s niekoľkými opačne nabitými zvyškami na zvýšenie rozpustnosti a sú prispôsobivé (Whitlow a Filipula (1991), Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:97-105 a Bridgo at al. (1993), J. Immunol., 150: 469-479, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom).

V inom aspekte sa môžu skrátené sTNFR chemicky naviazať na biotín a konjugáty biotín/skrátené sTNFR sa môžu potom naviazať

na avidín, čím vznikne tetravalentná molekula avidín/biotín/-skrátenej molekuly sTNFR. Skrátenej sTNFR sa môžu aj kovalentne viazať na dinitrofenol (DNP) alebo tetranitrofenol (TNP) a výsledný konjugát sa môže precipitovať anti-DNP alebo anti-TNP IgM za tvorby dimérnych konjugátov, kde hodnota valencie pre TNF väzbové miesta je 10.

Taktiež sa môžu pripraviť rekombinantné fúzne proteíny so skrátenej sTNFR, kde každá rekombinantná chimerická molekula má sekvenciu sTNFR (ako sa opisuje vyššie) substituovanú za variabilné domény buď ktorejkoľvek samotnej alebo obidvoch častí imunoglobulínovej molekuly (ľahké alebo ťažké reťazce) a s úplnými alebo časťami konštantných domén (ale najmenej s jednou konštantnou doménou) ťažkého alebo ľahkého reťazca ľudských imunoglobulínov. Napríklad každý takýto chimerický skrátenej sTNFR/IgG1 fúzny proteín sa môže pripraviť z dvoch chimerických génov: chiméra skrátenej sTNFR/ľudský kapa ľahký reťazec (skrátenej sTNFR/Ck) a chiméra skrátenej sTNFR/ľudský gama-1 ťažký reťazec (skrátenej sTNFR/Cg-1). Po transkripcii a translácii dvoch chimerických génov, ako sa opisuje ďalej, môže byť génový produkt zložený do jednej chimerickej molekuly, kde je skrátenej sTNFR bivalentný. Ďalšie podrobnosti vzťahujúce sa na konštrukciu takýchto chimerických molekúl sú uvedené v United States Patent 5 116 964, PCT Publication No. WO 89/09622, PCT Publication No. WO 89/16437 a EP 315062, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom.

V ďalšom aspekte sa môžu pripraviť rekombinantné fúzne proteíny so skrátenej sTNFR, kde každá rekombinantná chimerická molekula má sekvenciu sTNFR opísanú vyššie a aspoň časť regiónu 186-401 osteoprotegerínu (OPG - osteoprotegerin), ako sa opisuje v European Patent Application No. 96309363.8.

Polynukleotidy

Predkladaný vynález poskytuje aj polynukleotidy, ktoré kódujú skrátené sTNFR. Na základe uvedeného výkladu s použitím tabuľky kodónov môže priemerný odborník ľahko určiť všetky nukleotidové sekvencie, ktoré kódujú aminokyselinové sekvencie skrátených sTNFR. V súčasnosti preferované sekvencie nukleových kyselín zahŕňajú polynukleotidové sekvencie kódujúce sTNFR-I 2.6D/C105, sTNFR-I 2.6D/C106, sTNFR-I 2.6D/N105, sTNFR-I 2.3D/d8, sTNFR-I 2.3D/d18 a sTNFR-I 2.3D/d15. Príklady rozličných polynukleotidov sú uvedené na obrázkoch 2, 3, 4, 5, 6 a 7.

Na prípravu týchto polynukleotidov a na expresiu kódovaných proteínov sa môžu použiť techniky rekombinantnej expresie uskutočnenej v zhode s opismi vysvetlenými ďalej. Napríklad vloženie sekvencie nukleových kyselín, ktoré kódujú skrátené sTNFR, do vhodného vektora, môže odborník ľahko vytvoriť veľké množstvo požadovaných nukleotidových sekvencií. Tieto sekvencie sa môžu ďalej použiť na prípravu detekčných sond alebo amplifikačných primerov. Polynukleotidy kódujúce skrátené sTNFR sa môžu tiež včleniť do expresívnych vektorov. Vloženie expresívnych vektorov do vhodného hostiteľa sa môže produkovať požadovaný skrátený sTNFR vo veľkých množstvách.

Ako sa opisuje ďalej, na zmnoženie požadovanej sekvencie nukleových kyselín a/alebo produkciu skrátených sTNFR existuje rad dostupných systémov hostiteľ/vektor. Patria k nim okrem iných plazmidy, vírusové a inzerčné vektory a prokaryotickí a eukaryotickí hostitelia. Odborník môže upraviť systém hostiteľ/vektor, ktorý je schopný propagácie alebo expresie heterológnej DNA na produkciu alebo expresiu sekvencií predkladaného vynálezu.

Okrem toho odborníci ocenia vzhľadom na predkladaný opis nové sekvencie nukleových kyselín vrátane degenerovaných sekvencií nukleových kyselín kódujúcich skrátené sTNFR so sekvenciami uvedenými v sekcii Obrázky a tie sekvencie

nukleových kyselín, ktoré hybridizujú (prednostne za stringentných hybridizačných podmienok) s doplnkami týchto sekvencií nukleových kyselín (Maniatis et al. (1982), *Molecular cloning (A Laboratory Manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory, strany 387-389). Vzorové stringentné hybridizačné podmienky sú hybridizácia v 4x SSC pri 62 až 67 °C s následným odmyvaním počas asi jednej hodiny v 0,1x SSC pri 62 až 67 °C. Inými vzorovými stringentnými hybridizačnými podmienkami je hybridizácia v 45% až 55% formamide, 4x SSC pri 40 až 45 °C. Zahnuté sú aj sekvencie DNA, ktoré hybridizujú k sekvenciám nukleových kyselín vyznačeným na obrázkoch 1 a 9 za miernejších hybridizačných podmienok a ktoré kódujú skrátené sTNFR. Príklady takých menej stringentných hybridizačných podmienok sú 4xSSC pri 45 až 55 °C alebo hybridizácia s 30% až 40% formamidom pri 40 až 45 °C.

Predkladaný vynález poskytuje aj rekombinantné konštrukty DNA obsahujúce vektorové DNA so sekvenciami DNA kódujúcimi skrátené sTNFR. V každom takomto konštrukte DNA je sekvencia nukleových kyselín kódujúca skrátený sTNFR (s alebo bez signálnych peptidov) operačne spojená (in operation association) s vhodnou sekvenciou, riadiacou expresiu alebo regulačnou, schopnou riadiť replikáciu a/alebo expresiu skráteného sTNFR vo vybranom hostiteľovi.

Rekombinantné expresie

Príprava polynukleotidov

Sekvencie nukleových kyselín kódujúce skrátené sTNFR sa môžu ľahko získať radom spôsobov, ku ktorým patrí napríklad chemická syntéza, testovanie cDNA alebo genómovej knižnice, testovanie expresívnej knižnice a/alebo PCR amplifikácia cDNA. Tieto a ostatné metódy, ktoré sú užitočné na izoláciu sekvencií nukleových kyselín, sa uvádzajú v Sambrook et al., *Molecular*

Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989); v Ausubel et al., eds Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols . Press, (1994); a v Berger and Kimmel, Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques, Vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA, (1987), ktorých opis je tu zahrnutý odkazom.

Chemická syntéza sekvencií nukleových kyselín, ktoré kódujú skrátene STNFR, sa môže uskutočniť napríklad použitím metód dobre známych odborníkom, ktoré uvádza napríklad Engels et al., (1989) Angew. Chem. Intl. Ed., 28:716-734 a Wells et al., (1985), Gene, 34:315, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom. Tieto metódy zahŕňajú okrem iného fosfotriesterovú, fosforamiditovú a H-fosfonátovú (phosphotriester, phosphoramidite and H-phosphonate) metódu syntézy sekvencie nukleových kyselín. Veľké sekvencie nukleových kyselín, napríklad dlhšie ako asi 100 nukleotidov, sa môžu syntetizovať ako niekoľko fragmentov. Fragmenty sa potom môžu spojiť ligáciou tak, aby vytvorili sekvenciu nukleových kyselín kódujúcu skrátene STNFR. Preferovanou metódou je syntéza na polyméroch (polymer-supported) s použitím štandardnej fosforamiditovej chémie.

Príslušné sekvencie nukleových kyselín sa môžu získať aj testovaním rôznych knižníc cDNA (t.j. knižníc pripravených z jedného alebo viacerých pletív, kde sa predpokladá expresia proteínu) alebo genómových knižníc (knižnica pripravená z celkovej genómovej DNA). Zdroj pre knižnicu cDNA je typicky pletivo akéhokoľvek druhu, kde sa predpokladá expresia požadovaného proteínu v rozumných množstvách. Zdroj pre genómovú knižnicu môže byť akéhokoľvek pletivo alebo pletivo z akéhokoľvek cicavca alebo iného druhu, kde sa predpokladá gén kódujúci skrátene STNFR.

Hybridizačné médiá sa môžu testovať na prítomnosť DNA kódujúcej skrátene STNFR použitím jednej alebo viacerých sond z

nukleových kyselín (oligonukleotidy, cDNA alebo fragmenty genómovej cDNA, ktoré majú prijateľný stupeň homológie s cDNA alebo klonovaným génom), ktorá bude hybridizovať selektívne s cDNA alebo génom (génmi) prítomným v knižnici. Typické sondy použité na testovanie kódujú malú oblasť sekvencie DNA z rovnakého alebo podobného druhu, ako je druh, z ktorého bola pripravená knižnica. Sondy môžu byť aj degenerované, ako sa opisuje ďalej.

Hybridizácia sa typicky uskutočňuje prichytením (annealing) oligonukleotidovej sekvencie alebo cDNA ku klonom za takých stringentných podmienok, ktoré vylúčia nešpecifické naväzovanie, ale umožnia naviazanie tých klonov, ktoré majú významnú hladinu homológie so sondou alebo primerom. Typické stringentné hybridizačné a premývacie podmienky závisia čiastočne od veľkosti cDNA alebo oligonukleotidovej sondy (t.j. od počtu nukleotidov) a od toho, či je sonda degenerovaná. Pri navrhovaní hybridizačného média sa berie do úvahy aj pravdepodobnosť identifikácie klonu (t.j. či sa testuje genómová alebo cDNA knižnica).

Keď sa ako sonda použije fragment DNA (ako napr. cDNA), typické hybridizačné podmienky zahŕňajú tie, ktoré sú opísané v Aubel et al. (1994), eds., supra. Po hybridizácii sa hybridizačné médium odmyje za stringentných podmienok. Tie sa volia v závislosti od niekoľkých faktorov, ako je veľkosť sondy, očakávaná homológia sondy a klonu, testovaného hybridizačného média, počtu testovaných klonov atď. Príklady stringentných premývacích roztokov (ktoré majú spravidla nízku iónovú silu a používajú sa pri relatívne vysokých teplotách) sú nasledovné: 0,015 M NaCl, 0,05 M Na-citrát a 0,1% SDS pri 55 až 65 °C alebo iný - 1mM Na₂EDTA, 40 mM NaHPO₄, pH 7,2 a 1 % SDS pri 40 až 50 °C alebo ešte iný 0,2x SSC a 0,1% SDS pri asi 50 až 60 °C.

Existujú aj ukážkové protokoly pre stringentné premývacie podmienky, kde sa na testovanie hybridizačných médií používajú oligonukleotidové sondy. Napríklad prvý protokol používa 6x SSC s 0,05% pyrofosfátu sodného pri teplote približne od 35 do 63 °C v závislosti od dĺžky sondy. Napríklad sonda s dĺžkou 14 báz sa premýva pri 35 až 40 °C, s dĺžkou 17 báz pri 45 až 50 °C, s dĺžkou 20 báz pri 52 až 57 °C a s dĺžkou 23 báz pri 57 až 63 °C. Teplota sa môže zvýšiť o 2 až 3 °C, ak je pozadie dané nešpecifickým naväzovaním sondy vysoké. Druhý protokol používa na premývanie tetrametylamóniumchlorid (TMAC). Stringentný premývací roztok tak môže mať nasledovné zloženie: 3M TMAC, 50mM Tris-HCl, pH 8 a 0,2% SDS.

Inou vhodnou metódou na získanie vhodných sekvencií nukleových kyselín je polymerázová reťazová reakcia (PCR). Pri použití tejto metódy sa pripraví cDNA z poly(A)+RNA alebo celkovej RNA použitím enzýmu reverzná transkriptáza. Dva primery (oligonukleotidy), typicky komplementárne k dvom oddeleným oblastiam cDNA kódujúcej skrátený sTNFR, sa pridajú k cDNA spoločne s polymerázou (ako je napr. Taq polymeráza) a tá amplifikuje oblasť cDNA medzi dvoma primermi.

Oligonukleotidové sekvencie vybrané ako sondy alebo primery by mali mať príslušnú dĺžku a mali by byť dostatočne jednoznačné tak, aby sa minimalizovalo nešpecifické naväzovanie počas testovania alebo PCR amplifikácie. Konkrétne sekvencia sondy alebo primerov je spravidla založená na konzervovaných alebo vysoko homológnych sekvenciách alebo oblastiach. Sondy alebo primery môžu byť prípadne úplne alebo čiastočne degenerované, t.j. môžu obsahovať zmes sond/primerov, kde všetky kódujú tú istú aminokyselinovú sekvenciu, ale s použitím rôznych kodónov. Alternatívou degenerovaných sond je použitie inozínu na niektorých alebo všetkých kodónových polohách, kde sa líšia podľa druhu. Oligonukleotidové sondy alebo primery sa

môžu pripraviť metódami chemickej syntézy DNA, ako sa opísalo vyššie.

Ako sa opisuje vyššie, alternatívna sekvencia je prírodná (napríklad alelický variant) alebo syntetická sekvencia, ktorá obsahuje jednu alebo viac nukleotidových substitúcií, delécií a/alebo inzercií pri porovnaní so sekvenciou na obrázkoch 2, 3, 4, 5, 6 a 7, ktoré vedú k expresii varinálnych aminokyselinových sekvencií (pri porovnaní s pôvodnou (wild type) aminokyselinovou sekvenciou). Príprava syntetických variantov sekvencií je odborníkom dobre známa a opísaná napríklad v Sambrook et al. (1989), supra a Wells et al. (1985), Gene, 34:315, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom.

Vektory

Dna kódujúca skrátené sTNFR sa môže na ďalšie klonovanie (amplifikáciu DNA) alebo expresiu včleniť do vektorov. Vhodné vektory sú komerčne dostupné alebo sa môžu špeciálne pripraviť. Výber alebo konštrukcia vhodného vektora bude závisieť 1) od toho, či sa bude používať na amplifikácie DNA alebo expresiu DNA, 2) od veľkosti DNA, ktorá sa má včleniť do vektora, 3) od zamýšľanej hostiteľskej bunky, ktorá sa bude transformovať vektorom.

Každý z vektorov obsahuje sekvenciu nukleových kyselín, ktorá kóduje požadovaný proteín, funkčne spojenú s jednou alebo viacerými regulačnými sekvenciami alebo riadiacimi expresiu, schopnými riadiť alebo inak ovplyvňovať expresiu požadovaného proteínu vybranou hostiteľskou bunkou. Každý vektor obsahuje rôzne komponenty v závislosti od jeho funkcie (amplifikácie DNA alebo expresie DNA) a jeho kompatibility so zamýšľanou hostiteľskou bunkou. Komponenty vektora spravidla zahŕňajú (ale nie sú obmedzené len na ne): signálne sekvencie, počiatok replikácie, jeden alebo viac signálnych (marker) génov, promótor, zosilňovacie elementy, sekvenciu ukončujúcu trans-

kripciu atď. Tieto komponenty sa môžu získať z prirodzených zdrojov alebo sa môžu syntetizovať známymi postupmi.

Príkladom vhodných prokaryotických klonovacích vektorov môžu byť bakteriofágy (napr. odvodené od lambdy) alebo plazmidy z *E. coli* (napr. pBR322, colE1, pUC, F-faktor, odvodeniny Bluescript® (Stratagene, LaJolla, CA)). Na uvedené účely sa môže použiť rad ďalších vhodných expresívnych vektorov, ktoré sú odborníkom známe.

Signálne sekvencie

Nukleová kyselina kódujúca signálnu sekvenciu sa môže vložiť na 5'-konci sekvencie kódujúcej skrátený sTNFR. Môže byť napr. zložkou vektora alebo môže byť časťou nukleovej kyseliny kódujúcej skrátený sTNFR. Nukleové kyseliny kódujúce pôvodné signálne sekvencie sTNFR-I a sTNFR-II sú známe (EP 393 438 a EP 422 339).

Počiatok replikácie

Expresívne aj klonovacie vektory všeobecne zahŕňajú sekvenciu nukleových kyselín, ktorá umožňuje vektoru replikovať sa v jednej alebo viacerých vybraných hostiteľských bunkách. V klonovacom vektore je touto sekvenciou typicky tá, ktorá umožňuje vektoru replikovať sa nezávisle od hostiteľskej chromozómovej DNA a zahŕňa počiatok replikácie alebo autonómne sa replikujúce sekvencie. Takéto sekvencie sú dobre známe. Počiatok replikácie z plazmidu pBR322 je vhodný pre väčšinu gramnegatívnych baktérií. Rôzne počiatky (napr. SV40, polyoma, adenovírus, VSV alebo BVP) sú vhodné na klonovanie vektorov v cicavčích bunkách. Všeobecne nie je počiatok replikácie nutný pre cicavčie expresívne vektory (napr. počiatok SV40 sa často používa len preto, že obsahuje včasný promótor).

Selekčný gén

Expresívne aj klonovacie vektory typicky obsahujú selekčný gén. Tento gén kóduje „značkový“ (marker) proteín nevyhnutný na prežitie alebo rast transformovaných hostiteľských buniek, ak rastú v selekčnom kultivačnom médiu. Hostiteľské bunky, ktoré nie sú transformované vektorom, nebudú obsahovať selekčný gén, a preto neprežijú v kultivačnom médiu. Typické selekčné gény kódujú proteíny, ktoré: a) udeľujú rezistenciu na antibiotiká alebo iné toxíny, napr. ampicilín, neomycín, metotrexát (methotrexate) alebo tetracyklín, b) doplnia auxotrofný nedostatok alebo c) poskytnú nutné živiny, ktoré nie sú v živnom médiu.

Na amplifikáciu génov, ktoré sa majú exprimovať, sa môžu použiť aj iné selekčné gény. Amplifikácia je proces, kde gény, ktoré sú dôležitejšie na produkciu proteínov nevyhnutných na rast, sa tandemovo opakujú vnútri chromozómov nasledujúcich generácií rekombinantných buniek. Príklady vhodných selekčných markerov pre cicavčie bunky zahŕňajú napr. dihydrofolátreduktázu (dihydrofolate reductase - DHFR) a tymidínkinázu. Bunkové transformanty sú vystavené selekčnému tlaku, kde len transformanty sú schopné sa adaptovať a prežiť vďaka markerom prítomným vo vektore. Selekčný tlak je vyvolaný pestovaním transformovaných buniek za podmienok, kedy koncentrácia selekčného činidla v médiu sa postupne mení, a tým dochádza k amplifikácii selekčného génu aj DNA, ktorá kóduje skrátené sTNFR. Výsledkom je zvýšené množstvo skrátených sTNFR, ktoré sa syntetizujú z amplifikovanej DNA.

Napríklad bunky transformované selekčným génom pre DHFR sa najskôr identifikujú pestovaním všetkých transformantov v živnom médiu, ktoré obsahuje metotrexát (kompetitívny analóg DHFR). Pri použití divého typu DHFR je vhodnou hostiteľskou bunkou bunková línia z vaječníkov chrčka (Chinese Hamster ovary cell line) bez aktivity DHFR (Urlaub a Chasin (198), Pro. Natl.

Acad. Sci., USA, 77:(7):4216-4220, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom). Transformované bunky sa potom vystavia zvýšenej hladine metotrexátu. To vedie k syntéze viacerých kópií génu DHFR a sprievodne viacerým kópiám iných génov obsiahnutých v expresívnom vektore, ako je DNA kódujúca skrátenu sTNFR.

Promótory

Expresívne aj klonovacie vektory typicky obsahujú promótor, ktorý sa rozpoznáva hostiteľským organizmom a je operačne spojený so sekvenciou nukleovej kyseliny kódujúcej skrátenu sTNFR. Promótor je netranslatovaná sekvencia umiestnená pred (5')-štartovacím kodónom štruktúrneho génu (spravidla v rámci 100 až 1000 pb), ktorá riadi transkripciu a transláciu určitej sekvencie nukleových kyselín, ktoré kódujú napríklad skrátenu sTNFR. Promótor môže byť vhodne zaradený do jednej z dvoch tried - inducibilné promótory a konštitutívne promótory. Inducibilné promótory iniciujú zvýšenie transkripcie z DNA pod svojím riadením ako odpoveď na niektoré výživové zmeny alebo zmeny teploty. Je známy celý rad promótorov rozoznávaných radom potenciálnych hostiteľských buniek. Promótor sa môže operačne pripojiť k DNA kódujúcej skrátenu sTNFR tak, že sa restriktčnými enzýmami odstráni promótor zo zdrojovej DNA a včlení sa požadovaná promótorová sekvencia. Pôvodná promótorová sekvencia sTNFR-I alebo promótorová sekvencia sTNFR-II sa môže použiť na priamu amplifikáciu a/alebo expresiu DNA kódujúcej skrátenu sTNFR. Preferuje sa ale heterológny promótor, ak to vedie k väčšej transkripcii a k vyššiemu výťažku exprimovaného proteínu v porovnaní s pôvodným promótorom a ak je kompatibilný s hostiteľským bunkovým systémom, ktorý bol vybraný na použitie. Napríklad na priamu amplifikáciu a/alebo expresiu DNA kódujúcej skrátenu sTNFR sa môže použiť ktorákoľvek z pôvodných promótorových sekvencií ostatných členov rodiny NGF/TNF.

Promótorový vhodný na použitie pri prokaryotických hostiteľoch zahŕňajú beta-laktamázový a laktózoový promótorový systém; promótor alkalické fosfatázy; tryptofánový (trp) promótorový systém; systém bakteriálneho luminiscenčného (luxR) génu a hybridné promótorové, ako je promótor tac. Vhodné sú aj iné bakteriálne promótorové. Ich nukleotidové sekvencie boli publikované, a tým sa umožnilo odborníkom pripojiť ich k požadovanej sekvencii DNA (sekvenciám) použitím spojok (linkers) a adaptorov (adaptors), keď je nutné doplniť požadované restriktívne miesto.

Vhodné promótorové sekvencie na použitie pri cicavčích hostiteľských bunkách sú tiež dobre známe a patria k nim promótorové získané z genómov vírusov, ako je polyoma vírus, vírus kiahní hydiny (fowlpox vírus), adenovírus (ako napr. Adenovirus 2), hovädzí papiloma vírus (bovine papilloma vírus), vtáčí sarkómový vírus (avian sarcoma vírus), cytomegalovírus, retrovírus, vírus žltčky B a najmä opičí vírus 40 (SV40). Ďalšie vhodné cicavčie promótorové zahŕňajú heterológne cicavčie promótorové, napr. „heat-shock“ promótorové a aktínový promótor.

Zosilňovacie prvky (Enhancer Element)

Expresívne aj klonovacie vektory budú spravidla obsahovať zosilňovacie sekvencie na zvýšenie transkripcie sekvencie DNA kódujúcej skrátený sTNFR vo vyšších eukaryotoch. Zosilňovače sú cis-pôsobiace (cis-acting) komponenty DNA s dĺžkou spravidla 10 až 300 pb, ktoré pôsobením na promótor zvyšujú jeho transkripciu. Zosilňovače sú relatívne orientačne a pozične nezávislé. Nachádzajú sa na 5'-konci aj na 3'-konci transkripčnej jednotky. Kvasnicový zosilňovač je výhodne spojený s kvasnicovými promótorami. Je známych niekoľko zosilňovacích sekvencií dostupných z cicavčích génov (napr. globín, elastáza, albumín, alfa-fetoproteín a inzulín). Navyše vírusové zosilňovače, ako napr. zosilňovač SV40, zosilňovač

včasného promótoru cytomegalovírusu, zosilňovač polyoma a zosilňovače adenovírusov sú príkladmi zosilňovacích prvkov na aktiváciu eukaryotických promótorov. Aj keď zosilňovač môže byť na 3'- aj na 5'-konci DNA kódujúcej skrátenej sTNFR, typicky je na 5'-pozícii od promótoru.

Ukončenie transkripcie

Všetky expresívne vektory použité v eukaryotických hostiteľských bunkách obsahujú sekvencie nevyhnutné na ukončenie transkripcie a na stabilizáciu mRNA. Také sekvencie sú bežne dostupné z 5'- a niekedy z 3'-oblastí, kde nedochádza k translácii eukaryotických DNA alebo cDNA. Tieto oblasti obsahujú nukleotidové segmenty transkribované ako polyadenylované fragmenty na oblastiach mRNA kódujúcej skrátenej sTNFR, kde nedochádza k translácii.

Konštrukcia vektora

Konštrukcia vhodného vektora obsahujúceho jednu alebo viac z predtým uvedených zložiek (spoločne so sekvenciou kódujúcou skrátenej sTNFR) sa dosiahne štandardnou ligačnou technikou. Izolované plazmidy alebo fragmenty DNA sa rozštiepia, upravia a znova spoja v požadovanom poradí tak, aby sa vytvoril požadovaný vektor. Aby sa overila správnosť sekvencie konštruktu, ligačnú zmes možno použiť na transformáciu *E. coli* a úspešné transformanty sa môžu vybrať technikami opísanými vyššie. Potom sa pripraví vektor z transformantov vo väčších množstvách a vektor sa analyzuje rozštiepením restriktívnymi endonukleázami a/alebo sekvenovaním, aby sa potvrdila prítomnosť požadovaného konštruktu.

Môže sa použiť aj vektor, ktorý v cicavčích bunkách zaistí prechodnú (transient) expresiu DNA kódujúcej skrátenej sTNFR. Všeobecne zahŕňa prechodná expresia použitie expresívneho vektora, ktorý je schopný účinne sa replikovať v hostiteľskej

bunke, takže hostiteľská bunka akumuluje mnoho kópií expresívneho vektora a následne syntetizuje vysoké hladiny požadovaného proteínu kódovaného expresívnym vektorom. Každý prechodný expresívny systém skladajúci sa z expresívneho vektora a hostiteľskej bunky je vhodný na pozitívnu identifikáciu proteínov kódovaných klonovanými DNA a aj na rýchle testovanie takých proteínov na požadované biologické alebo fyziologické vlastnosti, t.j. na identifikáciu biologicky aktívnych skrátených sTNFR.

Hostiteľské bunky

Predkladný vynález poskytuje aj všetky rekombinantné hostiteľské bunky, ktoré obsahujú sekvencie nukleových kyselín použiteľných pri expresii požadovaného proteínu. Vzorové prokaryotické a eukaryotické hostiteľské bunky zahŕňajú bunky bakteriálne, cicavčie, hmyzie, bunky húb a kvasiniek a rastlinné bunky.

Prokaryotické hostiteľské bunky zahŕňajú (ale nie sú obmedzené len na ne) eubaktérie, ako napríklad grampozitívne alebo gramnegatívne organizmy (napr. *E.coli* (HB101, DH5a, DH10 a MC1061), bacily, ako *B. subtilis*; druh *Pseudomonas*, ako *P. aeruginosa*; poddruhy *Streptomyces*; *Salmonella typhimurium* alebo *Serratia marcescans*. V špecifickom prípade sa môže požadovaný proteín exprimovať v *E. coli*.

Navyše okrem prokaryotických hostiteľských buniek môžu byť vhodnými hostiteľmi na expresiu skrátených sTNFR eukaryotické mikróby, ako napr. vláknité huby alebo kvasnice. Medzi nižšími eukaryotickými hostiteľskými organizmami sa najčastejšie používa *Sacharomyces cerevisiae* alebo bežné droždie, ale dobre známy a bežne dostupný je rad ďalších tried, druhov a kmeňov.

Skrátené sTNFR sa môžu exprimovať v glykozylovannej forme ktoroukoľvek z radu vhodných hostiteľských buniek odvodených z viacbunkového organizmu. Takéto hostiteľské bunky sú schopné

komplexného spracovania a glykozylačných aktivít. Väčšinou sa môže použiť akákoľvek eukaryotická bunková kultúra, či už buniek stavovcov alebo bezstavovcov vrátane rastlinných a hmyzích buniek. Vo zvláštnom prípade sa môže požadovaný proteín exprimovať v bunkách baculovírusov.

Môžu sa použiť bunky stavovcov, pretože ich množenie v kultúre (tkanivové kultúry) je dobre známe. Príklady vhodných línii cicavčích hostiteľských buniek zahŕňajú napríklad líniu z opičích obličiek CV1 transformovanú SV40 (COS-7), líniu z embryonálnych ľudských obličiek (bunky 293 alebo bunky 293 subklonované na rast v suspenznej kultúre), bunky z obličiek mláďat chrčkov a bunky z vaječníkov chrčkov. Medzi ostatné vhodné cicavčie bunkové línie patria napr. HeLa, myšie L-929-bunky, 3T3-línie odvodené zo Swiss, Balb-c alebo NIH myši a bunkové línie BHK alebo HaK z chrčka. V určitom prípade sa môže požadovaný proteín exprimovať v bunkách COS.

Hostiteľská bunka sa môže transfektovať alebo lepšie transformovať požadovanou nukleovou kyselinou za vhodných podmienok, kedy dochádza k expresii nukleovej kyseliny. Výber vhodných hostiteľských buniek, metódy transformácie, pestovania, amplifikácie, testovania a produkcie produktu a jeho purifikácie je odborníkom dobre známy (Gething a Sambrook (1981), Nature, 293:620-625 alebo Kaufman et al. (1985), Mol. Cell. Biol., 5(7):1750-1759 alebo U.S. Pat. No. 4 419 446, ktorých opisy sú tu zahrnuté odkazom. Napríklad pre cicavčie bunky bez bunkovej steny sa môže použiť precipitačná metóda s fosfátom vápenatým (calcium phosphate). Ďalej sa môže použiť elektroporácia, mikroinjekcie a ostatné známe techniky.

Skrátené sTNFR možno produkovať aj homológnu rekombináciou alebo metódami rekombinantnej produkcie využívajúcimi riadiace elementy vnesené do buniek, ktoré už obsahujú DNA kódujúcu skrátené sTNFR. Homológna rekombinácia je technika pôvodne vyvinutá na zameranie génov na indukciu alebo opravu

mutácií v transkripčne aktívnych génoch (Kucherlapati (1989), Prog. In Nucl. Acid Res. And Mol. Biol., 36:301, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom). Základná technika sa vyvinula ako metóda na vnesenie špecifických mutácií do špecifických oblastí cicavčieho genómu (Thomas et al. (1986), Cell, 44:419-428; Thomas a Capecchi (1987), Cell, 51:503-512 a Doetschman et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., 85:8583-8587, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom) alebo na opravu špecifických mutácií vnútri chybného génu (Doetschman et al. (1987), Nature, 330:576-578, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom). Vzorové techniky sa opisujú v U.S. Patent No. 5 272 071; WO92/01069; WO93/03183; WO 94/12650 a WO 94/31560, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom.

Vďaka homológnej rekombinácii sa môže sekvencia DNA určená na včlenenie do genómu umiestniť do určitej oblasti príslušného génu jej prichytením k cieľovej DNA. Cieľová DNA je DNA, ktorá je komplementárna (homológna) k oblasti genómovej DNA. Malé úseky cieľovej DNA, ktoré sú komplementárne k špecifickej oblasti genómu, sa dostanú do kontaktu s rodičovským prameňom počas procesu replikácie DNA. DNA, ktorá sa vniesla do bunky, všeobecne hybridizuje, a teda rekombinuje s inými úsekmi endogénnej DNA zdieľaním homológnych oblastí. Ak sa tento komplementárny prameň pripojí k oligonukleotidu, ktorý obsahuje mutáciu alebo odlišnú sekvenciu DNA, táto sa tiež zainkorporuje do novosyntetizovaného prameňa (ako výsledok rekombinácie). Vďaka proofreadingovej funkcii je možné, že táto nová sekvencia slúži ako templát. Takto sa prenesená DNA inkorporuje do genómu.

Ak je známa sekvencia určitého génu (napríklad sekvencia nukleových kyselín skráteného *STNFR*), môže sa syntetizovať alebo inak získať (napríklad vhodným restriktčným štiepením pôvodnej DNA na miestach okolo oblasti, ktorá nás zaujíma) sekvencia riadiaca expresiu (úsek DNA, ktorý je komplementárny

k vybranej oblasti génu). Tento úsek slúži ako cieľová sekvencia na vloženie do bunky a bude hybridizovať k svojej homológnej oblasti vnútri genómu. Ak k tejto hybridizácii dôjde v priebehu replikácie DNA, tento úsek DNA (a akákoľvek ďalšia takto pripojená sekvencia) bude slúžiť ako Okazakiho fragment a bude vsadený do novosyntetizovaného dcérskeho reťazca DNA.

K týmto úsekom cieľovej DNA sú pripojené oblasti DNA, ktoré sa môžu navzájom ovplyvňovať s expresiou skráteného sTNFR. Napríklad do genómu určenej hostiteľskej bunky sa vloží v dostatočnej blízkosti a v správnej orientácii promótor/-zosilňovač, supresor alebo exogénny transkripčný modulačný element, aby sa ovplyvnila transkripcia DNA kódujúcej požadovaný skrátený sTNFR. Riadiaci element nekóduje skrátený sTNFR, ale namiesto toho riadi časť DNA prítomnej v genóme hostiteľskej bunky. Expresia skráteného sTNFR sa tak môže dosiahnuť nie transfekciou DNA, ktorá kóduje skrátený sTNFR, ale skôr použitím cieľovej DNA (obsahujúcej homológne oblasti s endogénnym génom, ktorý nás zaujíma) spojenej s DNA regulačným úsekom DNA, ktorý poskytne endogénna génová sekvencia s rozpoznateľným signálom pre transkripciu skráteného sTNFR.

Pestovanie hostiteľských buniek

Metódy kultivácie všetkých (jednej alebo viacerých) rekombinantných hostiteľských buniek na produkciu požadovaného proteínu závisia od mnohých faktorov a úvah; optimálny výrobný postup pre danú situáciu bude odborníkom zrejmý po niekoľkých experimentoch. Rekombinantné hostiteľské bunky sa pestujú vo vhodnom médiu a exprimujú skrátený sTNFR, ktorý sa prípadne izoluje a purifikuje zo živného média (alebo z buniek, ak sa exprimuje intracelulárne) vhodnými, odborníkom známymi postupmi.

Konkrétne každá z rekombinantných buniek použitých na produkciu požadovaného skráteného sTNFR sa môže pestovať

v médiu vhodnom na indukciu promótorov, na výber vhodných rekombinantných hostiteľských buniek alebo na amplifikáciu génov kódujúcich požadovaný skrátený sTNFR. Médium sa môže doplniť (ak je to nutné) hormónmi a/alebo ostatnými rastovými faktormi (ako je inzulín, transferín alebo epidermálny rastový faktor), soľami (chlorid sodný, vápnik, horčík a fosfát), tlmivými roztokmi (ako je HEPES), nukleotidmi (ako je adenosín a tymidín), antibiotikami (ako je gentamycín), stopovými prvkami (sú definované ako anorganické zlúčeniny spravidla prítomné v konečných koncentráciách rádovo mikromol) a glukózou alebo iným zdrojom energie. Môžu sa doplniť aj inými doplnkami vo vhodných koncentráciách podľa názoru odborníkov. Vhodné podmienky pestovania, ako napr. teplota, pH a podobne, sú odborníkom zbehlým v práci s vybranými hostiteľmi dobre známe.

Farmaceutické zloženie

Každá farmaceutická zmes všeobecne obsahuje terapeuticky účinné množstvo skrátených sTNFR a chemicky modifikované deriváty skrátených sTNFR (spoločne „skrátený(é) sTNFR produkt(y)“) s prísadou nosiča. Nosič prednostne obsahuje jeden alebo viac farmaceuticky a fyziologicky prijateľných materiálov s prísadou skráteného sTNFR produktu(ov) a riadenú uvoľňovanú látku.

Primárne rozpúšťadlo v nosiči môže byť buď vodnej alebo nevodnej povahy. Nosič môže navyše obsahovať ďalšie farmaceuticky prijateľné substancie na úpravu alebo udržanie pH medzi 5 a 6,5 alebo ešte lepšie medzi 5,5 a 6 (napríklad tlmivé roztoky, ako citrátový, fosfátový a aminokyseliny, ako je glycín); látky zväčšujúce objem lyofilizovaného preparátu (napríklad manitol a glycín); osmomolarity (napr. manitol alebo chlorid sodný); povrchovo aktívne látky (napr. polysorbát 20, polysorbát 80, triton a pluroniká (pluronic)); viskozity;

jasnosti; farby; sterility; stability (napr. sacharóza a sorbitol); antioxidanty (napr. sulfát sodný a hydrogensulfit sodný); konzervačné látky (napr. kyselina benzoová a kyselina salicylová); vône preparátu; látky ovplyvňujúce chuť a riediace činidlá; rýchlosti rozpúšťania (napr. rozpúšťadlá a rozpúšťacie činidlá, ako alkohol, polyetylén glykol a chlorid sodný); rýchlosti uvoľňovania; emulzifikačné látky; suzpenzné činidlá; rozpúšťadlá; plnivá; prostriedky na transport (delivery vehicles); riedidlá; inertné substancie a/alebo farmaceutické zosilňovače. Dajú sa predvídať aj ďalšie účinné formy administrácie, ako napr. parenterálny pomaly sa uvoľňujúci prípravok (parenteral slow-release formulation), inhalačné hmly, orálne aktívne prípravky (orally-active formulations) alebo čapíky. Zmes môže obsahovať aj jednotlivé prípravky polymérnych zlúčenín, ako napr. značne narušené polyméry (bulk erosion polymers) (napr. tieto látky - kopolyméry poly(kyselina lactic-co-glycolic (PLGA), zmesi PLGA polyméru, blokujúce kopolyméry PEGu, a kyselina mliečna a glykolová, polykynoakryláty); povrchovo erózne polyméry (napr. polyanhydridy a polyortoestery); hydrogél estery (napríklad pluronic polyoly, polyvinylalkohol, polyvinylpyrolidón, kopolyméry maleic anhydrid-alkyl vinyl ether, celulóza, deriváty kyseliny hyalurónovej, alginát, kolagén, želatína, albumín a škroby a dextrány) a ich kompozitné formy; alebo prípravky lipozómov alebo mikrogulôčok (liposomes or microspheres). Takéto prípravy môžu ovplyvniť fyziologický stav, stabilitu, rýchlosť uvoľňovania *in vivo* a rýchlosť odbúravania prítomných proteínov a derivátov *in vivo*. Optimálne farmaceutické zloženie pre požadovaný proteín určí odborník v závislosti od spôsobu podávania a požadovanej dávky. Príklady farmaceutických zložení sa uvádzajú v Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA 18042, strany 1435-1712; Gombotz and Pettit (1995), Bioconjugate Chem., 6:332-351; Leone-Bay, et al. (1995), Journal of Medicinal Chemistry, 38:4263-4269; Haas, et al. (1995), Clinical Immunology and Immunopathology, 76(1): 93; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772 a WO 94121235,

ktorých opis je tu zahrnutý odkazom.

Špecifické postupne sa uvoľňujúce zmesi sú dostupné od nasledovných výrobcov: Depotech (Depofoam™, multivezikulárny lipozóm - multivesicular liposome) : Alkermes (ProLease™, PLGA mikrogulôčky (microshepre)). Ako sa tu uvádza, pod hyalurónanom (hyaluronan) sa rozumie hyalurónan, kyselina hyalurónová (hyaluronan, hyaluronic acid) a jej soli (napr. hyalurónan sodný - sodium hyaluronate), estery, étery, enzymatické deriváty a krížovo spojené gély kyseliny hyalurónovej (cross-linked gels of hyaluronic acid), ako je hylan (hylan). Príklady foriem hyalurónanu sú uvedené v Peyron and Balazs (1974), *Path. Biol.*, 22(8):731-736; Isdale et al. (1991), *J. Drug Dev.*, 4(2):93-99; Larsen et al. (1993), *Journal of Biomedical Materials Research*, 27:1129-1134; Namiki, et al. (1982), *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, 20(11):501-507; Meyer et al. (1995), *Journal of Controlled Release*, 35:67-72; Kikuchi et al. (1996), *Osteoarthritis and Cartilage*, 4:99-110; Sakakibara et al. (1994), *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 299:282-292; Meyers a Brandt (1995), 22(9):1732-1739; Laurent et al. (1995), *Acta Orthop Scand*, 66(266):116-120; Cascone et al. (1995), *Biomaterials*, 16 (7):569-574; Yerashalmi et al. (1994), *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 313(2):267-273; Bernatchez et al. (1993), *Journal of Biomedical Materials Research*, 27(5): 677-681; Tan et al. (1990), *Australian Journal of Biotechnology*, 4(1):38-43; Gombotz a Pettit (1995), *Bioconjugate Chem.*, 6: 332-351; U. S . Patent Nos. 4 582 865, 4 605 691, 4 636 524, 4 713 448, 4 716 154, 4 716 224, 4 772 419, 4 851 521, 4 957 774, 4 863 907, 5 128 326, 5 202 431, 5 336 767, 5 356 883; European Patent Application Nos. 0 507 604 A2

a 0 718 312 A2; a WO 96/05845, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom. Určité hyalurónanové zmesi sú dostupné od nasledovných dodávateľov: BioMatrix, Inc. Ridgefield, NJ (Synvisc™, zmes 90:10 hylan tekutiny a hylan gélu (mixture of a hylan fluid and hylan gel)); Fidia S.p.A., Abano Terme, Italy (Hyalgan™, sodná soľ rozčlenenej kyseliny hyalurónovej (sodium salt of a rooster comb-derived hyaluronic acid) (molekulová hmotnosť asi 500 000 až asi 700 000)); Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan (Artz™, 1% roztok rozčlenenej kyseliny hyalurónovej s molekulovou hmotnosťou asi 700 000); Pharmacia AB, Stockholm, Sweden (Healon™, rozčlenená kyselina hyalurónová s molekulovou hmotnosťou asi 4×10^6); Genzyme Corporation, Cambridge, MA (Surgicoat™, rekombinantná kyselina hyalurónová); Pronova Biopolymer, Inc. Portsmouth, NH (Hyaluronic Acid FCH, vysoká molekulová hmotnosť (napr. okolo 1,5 až $2,2 \times 10^6$), kyselina hyalurónová pripravená z kultúry *Streptococcus zooepidemicus*; Sodium Hyaluronate MV (molekulová hmotnosť približne 1,0 až $1,6 \times 10^6$) a Sodium Hyaluoronate LV (molekulová hmotnosť približne 1,0 až $2,2 \times 10^6$); Calbiochem-Novabiochem AB, Lautelfingen, Schwitterland (sodná soľ kyseliny hyalurónovej) (Hyaluronic Acid, sodium salt) (katalógové číslo v katalógu z roku 1997 385908) pripravené z druhu *Streptococcus*); Intergen Company, Purchase, NY rozčlenená kyselina hyalurónová s molekulovou hmotnosťou asi 1×10^6); Diosynth Inc., Chicago, IL; Amerchol Corp., Edison, NJ and Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan.

Len čo je dané farmaceutické zloženie, môže sa skladovať v sterilných ampulkách ako roztok, suspenzia, gél, tuhá alebo dehydratovaná emulzia alebo lyofilizovaný prášok. Takéto zloženie sa môže skladovať buď vo forme pripravenej na použitie, alebo vo forme vyžadujúcej pred použitím rekonštitúciu (napr. lyofilizovanej).

V špecifickom prípade sa vynález zameriava na súpravy na produkciu jednodávkových aplikačných jednotiek. Súpravy môžu obsahovať nádobku so sušeným proteínom a nádobku s vodným prípravkom. Súpravy v rámci tohto vynálezu zahŕňajú jedno- alebo viackomorové predplnené injekčné striekačky; Ukážkovo predplnené injekčné striekačky (napr. tekuté injekčné striekačky (liquid syringes), lyo-injekčné striekačky (lyosyringes) (ako napr. Lyo-Ject, dvojkomorové predplnené lyo-injekčné striekačky), ktoré sú dostupné od Vetter GmbH, Ravensburg, Nemecko.

Použitie

Skrátené sTNFR produkty môžu byť užitočné ako látky na výskum alebo ako terapeutické a diagnostické látky. Skrátené sTNFR sa môžu použiť v diagnostických testoch *in vitro* a/alebo *in vivo* na kvantifikáciu množstva prirodzeného sTNFR-I alebo sTNFR-II v pletivách alebo vzorkách orgánu alebo na určenie a/alebo izolovanie buniek, ktoré exprimujú TNF (Scallan et al. (1995)), v testoch na kvantifikáciu množstva prirodzeného sTNFR-I alebo sTNFR-II v pletivách alebo vzorkách orgánu alebo na určenie a/alebo izolovanie buniek, ktoré exprimujú TNF (Scallan et al. (1995), vid' vyššie). V testoch pletív alebo orgánov bude (v porovnaní so štandardnou väzbovou krivkou ^{125}I -skrátených sTNFR) menej rádioaktivity ^{125}I zo skrátených sTNFR viažucich sa na TNF vďaka neoznačenému prirodzenému sTNFR-I alebo sTNFR-II viažucemu sa na TNF. Podobne ^{125}I -skrátené sTNFR sa môžu použiť na detekciu prítomnosti TNF v rôznych typoch buniek.

Tento vynález predpokladá aj použitie skrátených sTNFR produktov na tvorbu protilátok a výslednej protilátky (konkrétne vrátane tých, ktoré sa budú viazať aj na pôvodný sTNFR-I alebo sTNFR-II). Môžu sa pripraviť protilátky, ktoré sa budú viazať ku skráteným sTNFR, napríklad k epitopu vnútri

aminokyselinovej sekvencie R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 alebo vnútri aminokyselinovej sekvencie R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 . Pracovník s bežnými schopnosťami môže použiť dobre známe a publikované postupy na získanie monoklonálnych a polyklonálnych protilátok alebo rekombinantných protilátok, ktoré špecificky rozoznajú a viažu sa na rôzne proteíny kódované aminokyselinovými sekvenciami predkladaného vynálezu. Také protilátky sa potom môžu použiť na purifikáciu a charakterizáciu hotového, 30 kDa TNF inhibítora s plnou dĺžkou a hotového 40 kDa TNF inhibítora s plnou dĺžkou.

Predkladaný vynález sa vzťahuje aj na metódy liečenia určitých chorôb a lekárskeho stavu (mnoho z nich môže byť charakterizovaných ako zápalové ochorenia), ktoré sú sprostredkované TNF (mediated by TNF). Choroba alebo lekárskeho stav sa pokladá za „ochorenie sprostredkované TNF“, ak je spontánna alebo experimentálna choroba spojená so zvýšenými hladinami TNF v telesných tekutinách alebo pletivách prilahlých k ohnisku ochorenia alebo sa objavuje v organizme. Ochorenia sprostredkované TNF sa môžu rozlišovať pomocou nasledovných dvoch podmienok: 1) patologické nálezy spojené s chorobou sa môžu vyvolať experimentálne na zvieratách podávaním TNF a 2) patológia indukovaná na experimentálnych zvieracích modeloch ochorenia sa môže inhibovať alebo odstrániť použitím látok, ktoré inhibujú pôsobenie TNF. Mnoho ochorení sprostredkovaných TNF spĺňa dve z týchto troch podmienok, ostatné spĺňajú všetky tri. Neúplný zoznam chorôb sprostredkovaných TNF spolu s príslušnými následnými ochoreniami a symptómami, ktoré sa všetky môžu liečiť metódami podľa predkladaného vynálezu sú: syndróm respiračných ťažkostí u dospelých (adult respiratory distress syndrome); kachexia/anorexia (cachexia/anorexia); rakovina (napr. leukémia); syndróm chronickej únavy (chronic fatigue syndrom); odmietnutie štepu hostiteľom; hyperalgézia (hyperalgesia); zápalové ochorenie čriev (bowel inflammatory

disease); zápalové neuro ochorenie (neuroinflammatory disease); ischemické/reperfúzne poškodenie (ischemic/reperfusion injury) vrátane mogovej ischémie (poškodenie mozgu ako výsledok traumy, epilepsia, krvácanie alebo mŕtvica, čo vo všetkých prípadoch môže viesť k neurodegeneráciám); diabetes (napr. počiatok detského diabetu mellitus typu 1); násobná skleróza; očné ochorenia; bolesť; pankreatitída; pľúcna fibróza (pulmonary fibrosis); reumatické ochorenia (napr. reumatická artritída, osteoartritída, (osteoarthritis), detská (reumatoidná) artritída, séroneгатívna polyartritída, ankylózna spondilitída (ankylosing spondylitis), Reiterov syndróm a reaktívna artritída (Reithers syndrom and reactive arthritis), lupienková artritída, enteropatická artritída (enteropathic arthritis), polymyozitída (polymyositis), dermatomyozitída (dermatomyositis), sklerodermia (scleroderma), systematická skleróza (systemic sclerosis), vaskulitída (vasculitis), mozgová vaskulitída, Sjögrenov syndróm, reumatická horúčka, polychondritída (polychondritis) a reumatická polymyalgia (polymyalgia rheumatica) a arteritída veľkých buniek (giant cell arteritis; septický šok, vedľajšie účinky radiačnej terapie; systémová lupus erythematosus; dočasné mandibulárne kĺbové ochorenie; tyreoiditída a transplantácia pletív.

Skrátené sTNFR produkty sa môžu podávať pacientom v terapeuticky účinných množstvách na liečenie ochorení sprostredkovaných TNF (ako sa definujú vyššie) vrátane napríklad reumatických ochorení (napr. lymské ochorenie, detská (reumatoidná) artritída, osteoartritída, lupienková artritída, reumatická artritída a stafylokokmi vyvolaná („septická“) artritída). Pod pojmom „pacient“ sa myslia zvieratá (napr. mačky, psi, kone) aj ľudia.

Skrátený sTNFR produkt sa môže podávať lokálne, enterálne a parenterálne vrátane (a nielen) intravenózne, intramuskulárnej, intraarteriálnej, intratekálnej, do puzdra (intracap-

sular), intraorbitálnej (intraorbital), intrakardiálnej (intracardiac), intradermálnej, intraperitoneálnej, transtracheálnej, subkutánnej, subkutikulárnej (subcuticular), intraartikulárnej (intra-articular), subkapsulárnej (subcapsular), do mozgovej pleny (subarachnoid), intraspinálnej, intravertikulárnej a intrasternálnej injekcie a infúzie. Skrátený sTNFR produkt sa môže podávať aj orálne alebo cez mukóznú membránu (through mucus membranes), t.j. intranazálne, sublingválne, bukálne alebo rektálne; vždy sa jedná o systémovú aplikáciu.

Preferuje sa, keď sa skrátené sTNFR produkty aplikujú intraartikulárnou, subkutánnou, intramuskulárnou alebo intravenóznou injekciou. Skrátené sTNFR produkty sa môžu podávať aj nepretržitou infúziou (napríklad implantovaný alebo externý infúzne zariadenie meniaci stály alebo prerušovaný prietok), a tak sa zaistí plynule požadovaná úroveň skrátených sTNFR v krvi počas podávania. Prednostne sa to dosahuje prostriedkami kontinuálnej infúzie, napr. minipumpou, ako je osmotická minipumpa. Pri týchto spôsoboch je istota, že množstvo liečiva sa udržiava na požadovanej úrovni a že možno odoberať vzorky krvi a sledovať množstvo liečiva v krvnom obeh. Komerčne sú dostupné rôzne pumpy od dodávateľov, ako MiniMed Inc, Sylmar, CA (napr. MT507) a AlzaCorp., Palo Alto, CA (napr. osmotická pumpa Alzet, model 2MLI).

Uvažuje sa aj o iných spôsoboch kontinuálneho alebo takmer kontinuálneho dávkovania. Napríklad chemické úpravy môžu viesť k formám s ustáleným uvoľňovaním proteínu, čo tiež vedie k ich stálej prítomnosti v krvnom obeh v predvídanom množstve založenom na určenom dávkovom režime.

Spôsoby použitia skrátených sTNFR produktov na liečenie ochorení sprostredkovaných TNF (vrátane zápalových stavov kĺbov (napr. osteoartritída, lupienková artritída a reumatická artritída) sú vysvetlené v European Patent Application 567566, ktorého obsah je tu uvedený odkazom. V špecifickom prípade sa

môžu skrátené sTNFR produkty (napríklad pri liečení reumatickej artritídy a osteoartritídy) podávať intraartikulárne. V inom špecifickom prípade (pri liečení reumatoidnej artritídy, zápalovom ochorení čriev (inflammatory bowel disease), kachexii/anorexii alebo násobnej skleróze sa môžu skrátené sTNFR produkty aplikovať subkutánne alebo intramuskulárne. V ďalšom špecifickom prípade sa môžu skrátené sTNFR podávať intravenózne - pri liečení poškodenia mozgu ako výsledku traumy, epilepsie, krvácania alebo mŕtvice. Medzi preferované spôsoby pri liečení artritídy patria: 1) jednotlivé intraartikulárne injekcie skrátených sTNFR produktov podávaných opakovane podľa potreby na prevenciu alebo liečenie vypuknutej artritídy a 2) opakované subkutánne injekcie skrátených sTNFR produktov. Začatie liečby pri septickom šoku by malo začať čo možno najskôr po otrave krvi (septicemia) alebo keď sa diagnostikuje nebezpečenstvo otravy krvi. Liečenie môže napríklad začať ihneď po chirurgickom zákroku alebo nehode alebo akejkolvek inej udalosti, s ktorou je spojené riziko septického šoku. K preferovaným spôsobom liečenia pri syndróme dýchacích ťažkostí u dospelých (adult respiratory distress syndrome) patrí: 1) jednotlivá alebo viacnásobná intratracheálna aplikácia skrátených sTNFR produktov a 2) bolus (bolus) alebo nepretržitá intravenózna infúzia skrátených sTNFR produktov.

V inom prípade sa uvažuje o bunkovej terapii, napr. implantácii buniek produkujúcich skrátené sTNFR. Tento prípad predkladaného vynálezu môže zahŕňať implantáciu buniek, ktoré sú schopné syntetizovať a vylučovať biologicky aktívne formy skrátených sTNFR pacientovi. Takýmito bunkami produkujúcimi skrátené sTNFR môžu byť bunky, ktoré neprodukujú normálne sTNFR, ale ktoré sa modifikovali na produkciu skrátených sTNFR, alebo to môžu byť bunky, ktorých schopnosť produkovať skrátené sTNFR sa zvýšila transformáciou polynukleotidom vhodným na

expresiu a sekréciu skráteného sTNFR. Aby sa minimalizovala potenciálna imunologická reakcia pacientov podávaním skrátených sTNFR odlišných druhov, preferuje sa, keď sú bunky z toho istého druhu ako pacient (napríklad človek) alebo keď bunka môže byť opuzdrená materiálom, ktorý poskytne zábranu proti rozpoznaniu imunitným systémom alebo keď môžu byť bunky umiestnené do imunologicky zvláštnej anatomickej polohy, ako napríklad do semenníkov, oka alebo centrálneho nervového systému.

Ludské alebo iné bunky sa môžu implantovať do pacientov v biokompatibilných, semipermeabilných polymérnych obaloch (enclosures) alebo membránach, ktoré uvoľňujú skrátené sTNFR, ale zabránia deštrukcii buniek pacientovým imunitným systémom alebo inými škodlivými faktormi z okolitých tkanív. Alebo sa môžu vlastné bunky pacienta transformované mimo organizmu (*ex vivo*), aby produkovali skrátené sTNFR, implantovať priamo pacientovi bez takýchto obalov. Metodológia obalenia živých buniek membránou je odborníkom známa, takže sa môže uskutočniť príprava opuzdrených buniek a ich implantácia pacientom.

V inom prípade možno predvídať génovú terapiu *in vivo*, kedy sa sekvencia nukleovej kyseliny kódujúca skrátený sTNFR vnesie priamo do pacienta. Napríklad sekvencia nukleovej kyseliny kódujúca skrátený sTNFR sa vnesie do cieľovej bunky miestnou injekciou konštruktu nukleovej kyseliny (s vhodným vektorom alebo bez neho, napríklad adenovírusového vektora). Ďalšími vektormi môžu byť (medzi inými) retrovírusy, adenovírusy, herpes simplex vírus vektor a papiloma vírus vektor. Fyzický prenos sa môže dosiahnuť *in vivo* lokálnou injekciou konštruktu požadovanej nukleovej kyseliny alebo iného vhodného transportného vektora obsahujúceho požadovanú sekvenciu nukleových kyselín, prenosom sprostredkovaným lipozómami, priamou injekciou (obnažená DNA), prenosom

sprostredkovaným receptorom (komplex ligand-DNA) alebo bombardovaním mikročasticami (génové delo).

Príklady techník bunkovej a génovej terapie sa uvádzajú v U.S. Patent No. 4 892 538; v U.S. Patent No. 5 011 472; v U.S. patent No. 5 106 627; v DE 4219626, WO 94/20517 a 96/22793, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom.

Bez ohľadu na spôsob aplikácie vyžaduje liečenie chorôb sprostredkovaných TNF dávkový alebo celkový dávkový (dose or total dose) režim skrátených sTNFR účinný na obmedzenie alebo zmiernenie symptómov ochorenia. Ostatné faktory pri určení vhodnej dávky môžu zahŕňať ochorenie alebo stav, ktorý sa má liečiť alebo ktorému sa má predísť, závažnosť ochorenia, spôsob podávania, vek, pohlavie a lekársky stav pacienta. Ďalšie spresnenie výpočtov nevyhnutných na určenie vhodnej dávky na liečenie rutinne uskutočňujú odborníci, najmä vo svetle informácií o dávkovaní „ad assays“ tu obsiahnutých. Dávka sa môže určiť aj použitím známych skúšok na určenie dávok použitých v spojení s vhodnými údajmi o odpovedi na dávky. Určitá dávka sa kalkuluje podľa približnej telesnej hmotnosti alebo telesného povrchu pacienta.

Frekvencia dávkovania závisí od farmakokinetických parametrov skráteného sTNFR v použitom prípravku. Skrátené sTNFR sa môžu podať raz alebo v prípade vážnych a dlhotrvajúcich ťažkostí denne v menej frekventovaných dávkach alebo sa môžu podávať s počiatočným bolusom nasledovaným nepretržitými alebo udržiavacími dávkami. Pri parenterálnom podávaní môže mať každá dávka napríklad až 10 mg alebo skôr až 15 mg alebo ešte skoršie až 20 mg. Pri podaní do kĺbovej dutiny (articular cavity) sa farmaceutické zloženie prednostne aplikuje ako jedna injekcia (napríklad 3 až 10ml injekčná striekačka obsahujúca dávku od 5 mg/ml do 10 mg/ml) skrátených sTNFR rozpustených v roztoku izotonického, fosfátom pufovanej soli. Prípravok sa môže aplikovať do kĺbovej dutiny napríklad raz za 7 až 10 dní.

Takýmto spôsobom sa uskutočňuje aplikácia napríklad 4 až 5-krát, pričom dávka sa môže (ak je to nutné) upraviť.

V niektorých prípadoch sa môžu skrátené sTNFR podávať ako doplnok inej terapie a taktiež s inými farmaceutickými prípravkami vhodnými na liečnú indikáciu. Skrátený sTNFR a akákoľvek z tradičných alebo nových protizápalových látok (alebo viac týchto látok) sa môže podávať samostatne alebo v kombinácii.

Skrátené sTNFR produkty (napr. proteíny R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) a akákoľvek z doplnkových protizápalových látok (alebo viac týchto látok) sa môže podávať samostatne alebo v kombinácii. Informáciu o nasledovných zlúčeninách možno nájsť v The Merck Manula of Diagnosis and Therapy, Sixteen Edition, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, NJ (1992) a vo Pharmaprojects, PJB Publications Ltd.

Terajšie liečenie ochorení sprostredkovaných TNF (ako sa definujú vyššie) vrátane akútnych a chronických zápalov, ako sú reumatické ochorenia. (napr. lymská choroba, detská (reumatická) artritída, osteoartritída, lupienková artritída, reumatická artritída a stafylokokmi indukovaná („septická“) artritída) zahŕňa najskôr použitie liečiv na ovplyvnenie bolesti a zápalu, klasifikovaných ako nesteroidné protizápalové liečivá (NSAIDs - non-steroidal antiinflammatory). Druhotné liečenie zahŕňa kŕtikosteroidy, pomaly pôsobiace antireumatické liečivá (SAARDs - slow acting antirheumatic drugs) alebo ochorenia upravujúce (DM - disease modifying) liečivá.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skráteného sTNFR produktu (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) a akéhokoľvek (jedného alebo viacerých) NSAID na liečenie ochorení sprostredkovaných TNF, ako sa definujú vyššie, vrátane akútnych a chronických zápalov, ako reumatických ochorení (napr. lymská choroba, detská (reumatická) artritída, osteoartritída, lupienková artritída, reumatická

artritída a stafylokokmi indukovaná („septická“) artritída; a ochorenie vyvolané vzťahom trnásplantát versus hostiteľ. NSAID vďačí svojim protizápalovým účinkom aspoň čiastočne za inhibíciu syntézy prostagaldínov (Goodman a Gilman v „The Pharmaceutical Basis of Therapeutics“, MacMillan, 7th Edition (1985)). NSAID sa môžu rozdeliť do deviatich skupín: 1) deriváty kyseliny salicylovej, 2) deriváty kyseliny propiónovej, 3) deriváty kyseliny octovej, 4) deriváty kyseliny fenámovej (fenamic acid), 5) deriváty kyseliny karboxylovej, 6) deriváty kyseliny maslovej, 7) oxikamy (oxicams), 8) pyrazoly (pyrazoles), 9) pyrazolóny (pyrazolones).

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými derivátmi kyseliny salicylovej, prekurzormi jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami. Medzi tieto deriváty kyseliny salicylovej, prekurzory jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľné soli patria (názvy nie sú prekladané): acetaminosalol, aloxiprin, aspirin, benorylate, bromosaligenin, calcium acetylsalicylate, choline magnesium trisalicylate, diflusinal, etersalate, fendosal, gentisic acid, glycol salicylate, imidazole salicylate, lysine acetylsalicylate, mesalamine, morpholine salicylate, 1-naphthyl salicylate, olsalazine, parsalmide, phenyl acetylsalicylate, phenyl salicylate, salacetamide, salicylamide O-acetic acid, salsalate a sulfasalazine.

Štruktúrne podobné deriváty kyseliny salicylovej s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými derivátmi kyseliny

propiónovej, prekursori jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami. Medzi tieto deriváty kyseliny propiónovej, prekursor jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľné soli patria (názvy nie sú prekladané): alminoprofen, benoxaprofen, bucloxic acid, carprofen, dexindoprofen, fenoprofen, flunoxaprofen, fluprofen, flurbiprofen, furclopofen, ibuprofen, ibuprofen aluminum, ibuproxam, indoprofen, isoprofen, ketoprofen, loxoprofen, mioprofen, naproxen, oxaprozin, piketoprofen, pimeprofen, pirprofen, pranoprofen, protizinic acid, pyridoxiprofen, suprofen, tiaprofenic acid a tioxaprofen.

Štruktúrne podobné deriváty kyseliny propiónovej s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými derivátmi kyseliny octovej, prekursori jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami. Medzi tieto deriváty kyseliny octovej, prekursor jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľné soli patria (názvy nie sú prekladané):

acemetacin; alclofenac, amfenac, bufexamac, cinmetacin, clopirac, delmetacin, diclofenac sodium, etodolac, felbinac, fenclofenac, fenclorac, fenclozic acid, fentiazac, furofenac, glucametacin, ibufenac, indomethacin, isofezolac, isoxepac, lonazolac, metiazinic acid, oxametacin, oxpinac, pimetacin, progiumetacin, sulindac, talmetacin, tiaramide, tivpinac, tolmetin, zidometacin a zomepirac.

Štruktúrne podobné deriváty kyseliny octovej s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne

s liečbou) s jedným alebo viacerými derivátmi kyseliny fenámovej, prekursori jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami. Medzi tieto deriváty kyseliny fenámovej, prekursory jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľné soli patria (názvy nie sú prekladané):

enfenamic acid, etofenamate, flufenamic acid, isonixin, meclofenamic acid, meclofenamate sodium, medofenamic acid, mefanamic acid, niflumic acid, talniflumate, terofenamate, tolfenamic acid and ufenamate.

Štruktúrne podobné deriváty kyseliny fenámovej s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými derivátmi kyseliny karboxylovej, prekursori jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami. Medzi tieto deriváty kyseliny karboxylovej, prekursory jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľné soli patria (názvy nie sú prekladané):

clidanac, diflunisal, flufenisal, inoridine, ketorolac a tinoridine.

Štruktúrne podobné deriváty kyseliny karboxylovej s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými derivátmi kyseliny maslovej, prekursori jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami. Medzi tieto deriváty kyseliny maslovej, prekursory jej esterov alebo farmaceuticky akceptovateľné soli patria (názvy nie sú prekladané):

bumadizon, butibufen, fenbufen a xenbucin.

Štruktúrne podobné deriváty kyseliny maslovej s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými oxikamami (oxicams), prekursorami ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami. Medzi oxikamy, prekursory ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľné soli patria (názvy nie sú prekladané): droxicam, enolicam, isoxicam, piroxicam, sudoxicam, tenoxicam a 4-hydroxyl-1,2-benzothiazine 1,1-dioxide 4-(N-phenyl) carboxamide.

Štruktúrne podobné oxikamy s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými pyrazolmi (pyrazoles), prekursorami ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami. Medzi pyrazoly, prekursory ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľné soli patria (názvy nie sú prekladané): difenamizole a epirizole. Štruktúrne podobné pyrazoly s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými pyrazolónmi (pyrazolones), prekursorami ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami. Medzi pyrazolóny, prekursory ich esterov alebo

farmaceuticky akceptovateľné soli patria (názvy nie sú prekladané):

apazone, azapropazone, benzpiperylon, feprazone, mofebutazone, morazone, oxyphenbutazone, phenylbutazone, pipebuzone, propylphenazone, ramifenazone, suxibuzone a thiazolinobutazone.

Štruktúrne podobné pyrazolóny s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými NSAID (názvy nie sú prekladané): ϵ -acetamidocaproic acid, S-adenosylmethionine, 3-amino-4-hydroxybutyric acid, amixetrine, anitrazafen, antrafenine, bendazac, bendazac lysinate, benzydamine, beprozín, broperamole, bucolome, bufezolac, ciproquazone, cloximate, dazidamine, deboxamet, detomidine, difenpiramide, difenpyramide, difisalamine, ditazol, emorfazone, fanetizole mesylate, fenflumizole, floctafenine, flumizole, flunixin, fluproquazone, fopirtoline, fosfosal, guaimesal, guaiazolene, isonixirn, lefetamine HCl, leflunomide, lofemizole, lotifazole, lysin clonixinate, meseclazone, nabumetone, nictindole, nimesulide, orgotein, orpanoxin, oxaceprolm, oxapadol, paranyline, perisoxal, perisoxal citrate, pifoxime, piroxén, pirazolac, pirfenidone, proquazone, proxazole, thielavin B, tiplamizole, timegadine, tolectin, tolpadol, tryptamid a látky označené firemnými kódmi ako 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, EK-506, GV3658, ITF182, KCNTEI6090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (4-benzoyl-1-indancarboxylic acid), TVX2706, U60257, UR2301 a WY41770.

Štruktúrne podobné NSAID s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami ako vyššie uvedené NSAID sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými kortikosteroidmi, prekurzormi ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami na liečbu ochorení sprostredkovaných TNF (ako sa definujú vyššie), vrátane akútneho a chronického zápalu, ako sú reumatické ochorenia (napr. lymská choroba, detská (reumatická) artritída, osteoartritída, lupienková artritída, reumatická artritída a stafylokokmi indukovaná („septická“) artritída; a skleróza multiplex (multiple sclerosis). Kortikosteroidy, prekurzory ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľné soli zahŕňajú hydrokortizón a zlúčeniny, ktoré sú odvodené od hydrokortizónu, ako napríklad (názvy nie sú prekladané):

21-acetoxypregnenolone, alclomerasone, algestone, amcinonide, beclomethasone, betamethasone, betamethasone valerate, budesonide, chloroprednisone, clobetasol, clobetasol propionate, clobetasone, clobetasone butyrate, clocortolone, cloprednol, corticosterone, cortisone, cortivazol, deflazacort, desonide, desoximetasone, dexamethasone, diflorasone, diflucortolone, difluprednate, enoxolone, fluazacort, flucloronide, flumethasone, flumethasone pivalate, flunisolide, flucinolone acetonide, fluocinonide, fluorocinolone acetonide, fluocortin butyl, fluocortolone, fluorocortolone hexanoate, diflucortolone valerate, fluorometholone, fluperolone acetate, fluprednidene acetate, fluprednisolone, flurandrenolide, formocortol, halcinonide, halometasone, halopredone acetate, hydrocortamate, hydrocortisone, hydrocortisone acetate, hydrocortisone butyrate, hydrocortisone phosphate, hydrocortisone 21-sodium succinate, hydrocortisone tebutate, mazipredone, medrysone, meprednisone, methylprednicolone, mometasone furoate, paramethasone, prednicarbate, prednisolone, prednisolone 21-diedryaminoacetate, prednisolone sodium phosphate, prednisolone sodium succinate, prednisolone sodium 21-m-

sulfobenzoate, prednisolone sodium 21-stearoglycolate, prednisolone tebutate, prednisolone 21-trimethylacetate, prednisone, prednival, prednylidene, prednylidene 21-diethylaminoacetate, tixocortol, triamcinolone, triamcinolone acetonide, triamcinolone benetonide a triamcinolone hexacetonide.

Štruktúrne podobné kortikosteroidy s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými pomaly pôsobiacimi antireumatickými liekmi (SAARD) alebo antireumatickými liekmi ovplyvňujúcimi chorobu (DMARDS), prekurzormi ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami na liečbu ochorení sprostredkovaných TNF (ako sa definujú vyššie), vrátane akútneho a chronického zápalu, ako sú reumatické ochorenia (napr. lymská choroba, detská (reumatická) artritída, osteoartritída, lupienková artritída, reumatická artritída a stafylokokmi indukovaná („septická“) artritída; a skleróza multiplex (multiple sclerosis). SAARD a DMARDS, prekurzory ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľné soli zahŕňajú (názvy nie sú prekladané): allocupreide sodium, auranof in, aurothioglucose, aurothioglycanide, azathioprine, brequinar sodium, bucillamine, calcium 3-aurothio-2-propanol-1-sulfonate, chlorambucil, chloroquine, clobuzarit, cuproxoline, cyclophosphamide, cyclosporin, dapsone, 15-deoxyspergualin, diacerein, glucosamine, soli zlata (napr. cycloquine gold salt, gold sodium thiomalate, gold sodium thiosulfate), hydroxychloroquine, hydroxyurea, kebuzone, levamisole, lobenzarit, melittin, 6-mercaptapurine, methotrexate, mizoribine, mycophenolate mofetil, myoral, nitrogen mustard, D-penicillamine, pyridinol imidazoles ako SKNF86002 a SB203580, rapamycin, thiols, thymopoietin a vincristine.

Štruktúrne podobné SAARD alebo DMARD s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými inhibítormi COX2, prekurzormi ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami na liečbu ochorení sprostredkovaných TNF (ako sa definujú vyššie), vrátane akútneho a chronického zápalu. Príklad inhibítorov COX2, prekurzorov ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľných solí zahŕňa celocoxib (názov nie je prekladaný). Štruktúrne podobné inhibítory COX2 s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými bakteriostatikami (antimicrobials), prekurzormi ich esterov alebo farmaceuticky akceptovateľnými soľami na liečbu ochorení sprostredkovaných TNF (ako sa definujú vyššie), vrátane akútneho a chronického zápalu. Bakteriostatiká zahŕňajú napríklad (názvy nie sú prekladané): ampicillin, amoxycillin, aureomicin, hacitracin, ceftazidime, ceftriaxone, cefotaxime, cepachlor, cephalixin, cephradine, ciprofloxacin, clavulanic acid, cloxacillin, dicloxacillin, erythromycin, flucloxacillin, gentamicin, gramicidin, methicillin, neomycin, oxacillin, penicillin a vancomycin.

Štruktúrne podobné bakteriostatiká s podobnými analgetickými a protizápalovými vlastnosťami sú taktiež zahrnuté v tejto skupine.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jednou alebo viacerými z nasledovných zlúčenín na liečbu ochorení sprostredkovaných TNF (ako sa definujú vyššie), vrátane akútneho a chronického zápalu (niektoré názvy nie sú prekladané): faktor stimulujúci kolónie granulocytov

(granulocyte colony stimulating factor); thalidone; BN 50730; tenidap; E 5531; tiapafant PCA 4248; nimesulide; panavir; rolipram; RP 73401; peptide T; MDL 201 449A; (1R, 3S)-Cis-1-[9-(2,6-diaminopuriny)]-3-hydroxy-4-cyclopentene hydrochloride; (1R, 3R)-trans-1-[9-(2,6-diamino)purine]-3-acetoxycyclopentane; (1R,3R)-trans-1-[9-adenyl]-3-azidocyclopentane hydrochloride a (1R,3R)-trans-1-(6-hydroxy-purin-9-yl)-3-azidocyclopentane.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými inhibítormi TNF na liečbu ochorení sprostredkovaných TNF (ako sa definujú vyššie), vrátane akútneho a chronického zápalu. Inhibítory TNF zahŕňajú zlúčeniny a proteíny, ktoré blokujú syntézu *in vivo* alebo extracelulárne uvoľňovanie TNF vrátane nasledovných zlúčenín.

Ďalšie inhibítory TNF zahŕňajú protilátky anti-TNF (napr. protilátku MAK 195F Fab (Holler et al. (1993), 1st International Symposium on Cytokines in Bone Marrow Transplantation, 147; monoklonálnu protilátku CDP 571 anti-TNF (Rankin et al. (1995), British Journal of Rheumatology, 34:334-342 (ktorých opis je tu zahrnutý odkazom); myšiu monoklonálnu protilátku BAY X 1351 proti faktoru nekrotizujúcemu tumor (murine anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) (Kieft et al. (1995), 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 9, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom; monoklonálnu

protilátku CentTNF cA2 anti-TNF (Elliott et al. (1994), Lancet, 344:1125-1127 a Elliott et al. (1994), Lancet, 344-1105-1110, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom).

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s rozpustným rekombinantným ľudským antigénom Fas alebo s jeho rekombinantnými verziami (WO 96/20206 a Mountz et al., J. Immunology, 155:4829-4837 a EP 510 691), ktorých opis je tu zahrnutý odkazom. WO 96/20206 opisuje sekretovaný ľudský antigén Fas (prirodzený a rekombinantný vrátane fúzneho proteínu Ig), metódy izolácie génov zodpovedných za kódovanie rozpustného rekombinantného ľudského antigénu Fas, metódy klonovania génu vo vhodnom vektore a vo vhodných typoch buniek a metódy produkcie inhibítorov expresii génu. EP 510 691 opisuje DNA kódujúcu ľudský antigén Fas vrátane rozpustného antigénu Fas, vektory exprimujúce dané DNA a transformanty transfekované vektorom. Pri parenterálnom podávaní sú dávky fúzneho proteínu antigénu Fas od 1 ug/kg do 100 ug/kg.

V špecifickom prípade sa predkladaný vynález orientuje na použitie skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s jedným alebo viacerými inhibítormi interleukínu-1 na liečbu ochorení sprostredkovaných TNF (ako sa definujú vyššie), vrátane akútneho a chronického zápalu, ako sú

reumatické ochorenia (napr. lymská choroba, detská (reumatická) artritída, osteoartritída, lupienková artritída, reumatická artritída a stafylokokmi indukovaná („septická“) artritída; poškodenie mozgu ako následok traumy, epilepsie, krvácania alebo mŕtvice; a skleróza multiplex (multiple sclerosis). Triedy inhibítorov interleukín-1 zahŕňajú antagonisty receptora interleukínu 1 (akákoľvek zlúčenina špecificky zabraňujúca aktivácii bunkových receptorov IL-1), ako IL-1ra, ako je opísané ďalej; monoklonálnu protilátku proti anti-IL-1 (napr. EP 623674, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom); väzbové proteíny IL-1, napr. rozpustné receptory IL-1 (napr. U.S.P. 5 492 888, U.S.P. 5 488 032, U.S.P. 5 464 937, U.S.P. 5 319 071 a U.S.P. 5 180 812, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom); monoklonálne protilátky anti-IL-1 (napr. WO 9501997, WO 9402627, WO9006371, U.S.P. 4935343, EP 364778, EP 267611 a EP 220063, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom); doplnkové proteíny receptora IL-1, napr. WO 96/23067 (ktorého opis je tu zahrnutý odkazom) a ostatné zlúčeniny a proteíny, ktoré blokujú syntézu *in vivo* alebo extracelulárne uvoľňovanie IL-1.

Antagonistom receptora IL-1 (IL-1ra) je ľudský proteín, ktorý pôsobí ako prirodzený inhibítor interleukínu-1. Preferované antagonisty receptora spolu s metódou ich prípravy a použitia sú opísané v U.S. Patent No. 5 075 222 (tu odkazovaný ako '222 patent); WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; WO 92/16221; WO93/21946; PCT International Application No. US97/02131, ktorý uvádza farmaceutické zloženie zahŕňajúce a) účinné množstvo kontrolovane uvoľňovaného polyméru (napr. kyseliny hyalurónovej) a b) účinné množstvo IL-1ra; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626; WO 94/20517; a WO 96/22793, ktorých opis je tu zahrnutý odkazom.

Proteíny zahŕňajú glykozylované a neglykozylované antagonisty receptora IL-1.

V U. S. Patent No. 5 075 222 (Hannum et al. nazvanom „Interleukin-1 Inhibitors“) sa konkrétne uvádzajú a opisujú tri preferované formy IL-1ra (IL-1ra α , IL-1ra β a IL-1rax), z ktorých každý je odvodený z tej istej DNA kódujúcej sekvencie. Tento U.S. Patent (tu uvádzaný ako '222 patent) je tu konkrétne uvedený odkazom. Všetky tri interleukín-1 inhibítory majú podobné funkčné a imunologické aktivity. V '222 patente sa uvádzajú aj metódy produkcie IL-1 inhibítorov, najmä IL-1ras. Jedna z uvedených metód zahŕňa izoláciu inhibítorov z ľudských monocytov (kde sú prirodzene produkované). Druhá uvedená metóda zahŕňa izoláciu génu zodpovedného za kódovanie IL-1ras, klonovanie génu vo vhodných typoch vektorov a buniek, expresiu génu vedúcu k produkcii IL-1ras a získaniu IL-1ras. Predkrovanou metódou tohto vynálezu je druhá metóda, ktorá je všeobecným príkladom rekombinantných DNA metód. V špecifickom prípade obsahuje IL-1ra metionylovanú skupinu na N-konci ako dôsledok expresie v *E. coli*. Predkladaný vynález zahŕňa aj modifikovaný IL-1ras. Modifikovaný IL-1ras zahŕňa napríklad muteíny (muteins) takýchto inhibítorov, kde cysteínový zvyšok je nahradený za aminokyselinu v jednej alebo viacerých polohách aminokyselinovej sekvencie prirodzene sa vyskytujúceho inhibítora. Také muteíny môžu potom selektívne miestne reagovať s funkčnými jednotkami polyetylénglykolu (PEG) alebo inými polyétermi obsahujúcimi sulfhydryl (sulfhydryl-containing polyethers), a tak vzniknú IL-1ra PEG druhy. PCT Publication No. WO 92/16221 uvádza rad modifikovaných IL-1ra druhov a metódy prípravy týchto inhibítorov modifikovaných PEGom.

Ďalšia trieda interleukín-1 inhibítorov zahŕňa zlúčeniny schopné špecificky zabrániť aktivácii bunkových receptorov IL-1. K takýmto zlúčeninám patria IL-1 väzbové proteíny, napríklad

rozpustné receptory a monoklonálne protilátky. Patria sem aj monoklonálne protilátky proti receptorom.

Ďalšia trieda inhibítorov interleukínu-1 zahŕňa zlúčeniny a proteíny, ktoré blokujú syntézu *in vivo* a/alebo extracelulárne uvoľňovanie IL-1. jedná sa o látky, ktoré ovplyvňujú transkripciu génu IL-1 alebo úpravu nehotového pre-proteínu IL-1.

Vyššie uvedené príklady nevyklúčujú vopred iné liečenie súbežne s týmito protizápalovými zlúčeninami, ktoré sú odborníkom známe a ktoré by odborníci mohli získať použitím smerníc uvedených v tomto opise.

Na ľahšie podávanie a rovnomernosť dávkovania je obzvlášť výhodné vyrábať (to formulate) zmesi doplnkových protizápalových zlúčenín vo forme dávkových jednotiek (dosage unit). „Forma dávkovej jednotky“ sa tu vzťahuje na fyzicky oddelenú jednotku vhodnú na jednotkové dávkovanie liečených cicavčích subjektov, pričom každá jednotka obsahuje vopred určené množstvo doplnkových protizápalových zlúčenín určených tak, aby sa dosiahol (v spojení s požadovaným farmaceutickým nosičom) požadovaný terapeutický účinok. „Farmaceuticky akceptovateľný nosič“ zahŕňa všetky rozpúšťadlá, disperzné médiá, obalové, antimikrobiálne a protihubové činidlá, izotonické činidlá a činidlá spomaľujúce absorpciu atď., ktoré sú kompatibilné s aktívnymi látkami, so spôsobom podávania a ďalšími zložkami danej zmesi a ktoré nie sú škodlivé pre príjemcu. Použitie takýchto agens a médií je odborníkom známe (viď napríklad Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA 18042, strany 1435-1712, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom). Do zmesi sa môžu včleniť aj dodatočné aktívne zložky.

Na orálne terapeutické podávanie môžu byť dodatočné protizápalové zlúčeniny zahrnuté s excipientmi (inertnými nosičmi) a použité vo forme tabliet na prehĺtnutie, bukalných

(ústnych) tabliet, pastiliek, kapsúl, suspenzií, sirupov, oblátok a podobne, alebo môžu byť zainkorporované priamo do potravy. Tablety, pastilky, pilulky, kapsuly a ďalšie formy môžu obsahovať aj: spojivo (binder), ako napr. „žuvačku“ z kozinca, agátu (gum tragacants, acacia), obilný škrob alebo želatínu; inertné nosiče (excipients) ako napríklad fosforečnan vápenatý (dicalcium phosphate); rozvolňujúce látky, ako obilný škrob, kyselinu alginovú (alginic acid) a podobne; lubrikant, ako je stearan horečnatý; sladidlo, ako je sacharóza, laktóza alebo sacharín; príchut'ové látky, ako mäťová silica, libavkový olej, čerešňovú alebo pomarančovú príchut'. Ak je dávkovacou jednotkou kapsula, môže okrem vyššie uvedených látok obsahovať tekutý nosič. Môže sa použiť aj rad ďalších materiálov, ktoré modifikujú obal alebo fyzikálnu formu dávkovacej jednotky. Napríklad tablety, pilulky alebo kapsuly sa môžu potahovať šelakom, cukrom alebo obidvoma látkami. Všetky materiály použité na prípravu akejkoľvek dávkovacej jednotky musia byť pochopiteľne farmaceuticky čisté a použitých množstvách netoxické. Navyše sa môžu do postupne uvoľňovaných prípravkov a zloženia pridávať doplnkové protizápalové zlúčeniny. Množstvo týchto doplnkových protizápalových zlúčenín v danej terapeuticky užitočnej zmesi sa volí tak, aby sa dosiahla vhodná dávka.

Na parenterálne podávanie môžu všetky protizápalové zlúčeniny obsahovať sterilný roztok vhodný na injekcie. Sterilný roztok vhodný na injekcie sa môže pripraviť zlúčením požadovaného množstva doplnkovej protizápalovej zlúčeniny vo vhodnom, farmaceuticky prijateľnom nosiči s rôznymi ďalšími prísadami vymenovanými nižšie (požadovanými) a následnou sterilizáciou filtráciou. Všetky disperzie sa môžu pripraviť včlenením protizápalovej zlúčeniny do sterilného nosiča, ktorý obsahuje základné disperzné médium a ďalšie požadované ingrediencie z tých, ktoré sú vymenované vyššie. Všetky

sterilné roztoky vhodné na injekcie sa môžu pripraviť zlúčením prášku doplnkovej protizápalovej zlúčeniny a (prípadne) akejkolvek ďalšej požadovanej ingrediencie z predchádzajúcej prípravy jej sterilného roztoku. Prášok sa pripraví akoukoľvek vhodnou technikou (napr. vákuové sušenie a lyofilizácia).

Špecifická dávka doplnkovej protizápalovej zlúčeniny sa vypočíta podľa približnej telesnej hmotnosti alebo telesného povrchu pacienta. Pri určení vhodnej dávky sa môžu zahrnúť aj ďalšie faktory, ak sa jedná o akútne alebo chronické zápalové ochorenie a ak sa jedná o liečbu alebo prevenciu, vážnosť ochorenia, spôsob aplikácie, vek, pohlavie a zdravotný stav pacienta. Odborníci ľahko uskutočnia presnejšie výpočty nutné na vhodné dávkovanie pri liečbe, pri zohľadnení všetkých vyššie uvedených formulácií. Dávkovanie sa môže určiť aj pomocou známych testov na určenie dávky použitých v spojení s príslušnými údajmi o reakcii na dávky.

Zámerom tohto vynálezu je napríklad to, že dávky doplnkových protizápalových zlúčenín vybraných na liečenie určitého akútneho alebo chronického ochorenia, ako napríklad reumatických chorôb (napr. lymská choroba, detská (reumatoidná) artritída, osteoartritída a stafylokokmi indukovaná („septická“) artritída) môžu byť na dosiahnutie terapeutického účinku rôznorodé. Keď má jedna z doplnkových protizápalových zlúčenín vedľajšie účinky, môže sa podávať pacientom počas obdobia alternatívnej liečby kombinačnej terapie. Napríklad dlhodobé liečenie metotrexátom (chronic methotrexate treatment) je spojené s toxicitou gastrointestinálnou, pečňovou, pľúcnou a toxicitou kostnej drene (Sandoval et al., (1995) British Journal of Rheumatology, 34:49-56, ktorého opis je tu zahrnutý odkazom.

Testy na monitorovanie zlepšenia zdravotného stavu môžu zahŕňať špecifické testy zamerané napríklad na určenie systémovej odpovede na zápal, čo zahŕňa rýchlosť sedimentácie

erythroctov (ESR - erythrocyte sedimentation rate), reaktanty akútnej fázy (APR - acute phase reactant). Pozoruje sa opuch postihnutej časti tela. Môže sa pozorovať aj zlepšenie stuhlosti a stisku (siffness and grip (ak je to možné) a zníženie bolesti. Ak je pacientov stav stabilný, podáva sa mu rovnaká dávka týždenne a taktiež týždenne sa hodnotí jeho stav. Ak je pacientov stav stabilný, môže sa v liečbe pokračovať. Po šiestich mesiacoch liečby sa zistia rádiologickým snímaním (napríklad röntgenom) anatomické zmeny na kostre.

Na konci každého obdobia sa pacient hodnotí znova. Porovnanie rádiologického zhodnotenia pred a po liečení, hodnoty ESR a APR ukazujú na účinnosť liečenia. Podľa účinnosti liečenia a pacientovho stavu sa dávkovanie môže počas liečenia zvýšiť alebo zachovať na tej istej úrovni.

Predkladaný vynález sa prednostne zameriava na metódu (voliteľne s jednou z nasledovných kombinácií) na liečenie alebo prevenciu akútnych alebo chronických zápalových ochorení a stavov (ako sú definované vyššie), ako sú reumatické ochorenia (napr. lymská choroba, detská (reumatoidná) artritída, osteoartritída, lupienková artritída, reumatoidná artritída a stafylokokmi indukovaná („septická“) artritída): skrátený sTNFR produkt (napr. proteín R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) a metotrexát (methotrexate); skrátený sTNFR produkt (napr. proteín R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) metotrexát a inhibítor IL-1, prednostne IL-1ra; skrátený sTNFR produkt (napr. proteín R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) a jedna alebo viac nasledovných látok - metotrexát, imunosupresívum (napr. cyklosporín), ciproflaxín, antigén Fas a inhibítor IL-1, prednostne IL-1ra; skrátený sTNFR produkt (napr. proteín R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) a metotrexát a imunosupresívum (napr. cyklosporín); skrátený sTNFR produkt (napr. proteín R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) metotrexát ciprofloxacín; skrátený sTNFR produkt (napr. proteín R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂), metotrexát a inhibítor IL-1, prednostne IL-1ra; skrátený sTNFR

produkt (napr. proteín R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) a jedna alebo viac nasledovných látok - metotrexát, sulfasazín (sulphasazine) a hydroxychlórchinón (hydroxychloroquine); skrátený sTNFR produkt (napr. proteín R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) metotrexát a hydroxychlórchinón (hydroxychloroquine); skrátený sTNFR produkt (napr. proteín R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) metotrexát a sulfasazín.

V špecifickom preferovanom prípade metóda zahŕňa podávanie (napr. do kĺba (intraarticular), subkutánne alebo intramuskulárne) skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 , voliteľne vo forme s postupným uvoľňovaním (napr. hyalurónan)) alebo v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s metotrexátom a/alebo inhibítorom IL-1 (napr. IL-1ra) a/alebo rozpustným ľudským rekombinantným antigénom Fas na liečbu reumatických ochorení, ako je uvedené vyššie (napr. lymská choroba, detská (reumatická) artritída, osteoartritída, lupienková artritída, reumatická artritída a stafylokokmi indukovaná („septická“) artritída a symptómov spojených s nimi.

V špecifickom preferovanom prípade metóda zahŕňa podávanie (napr. intravenózne alebo intravertikulárne) skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 , voliteľne vo forme s postupným uvoľňovaním (napr. hyalurónan)) a voliteľne v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s aktivátorom pletivového plazminogénu a/alebo s inhibítorom IL-1 (napr. IL-1ra) na liečbu poškodenia mozgu ako výsledku traumy, epilepsie, krvácania alebo mŕtvice, ktoré všetky vedú k neurodegenerácii.

V špecifickom preferovanom prípade metóda zahŕňa podávanie (napr. subkutánne alebo intramuskulárne) skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 , voliteľne vo forme s postupným uvoľňovaním (napr. hyalurónan)) alebo v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou)

s (jednou alebo viacerými látkami) - kortikosteroidom, cyklosporínom, FK-506 alebo interferónom (napr. alfa-interferón, beta-interferón, gama-interferón alebo konsenzuálny (cosensus) interferón) a/alebo IL-1ra na liečbu sklerózy multiplex (multiple sclerosis).

V špecifickom preferovanom prípade metóda zahŕňa podávanie (napr. subkutánne alebo intramuskulárne) skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 , voliteľne vo forme s postupným uvoľňovaním (napr. hyalurónan)) alebo v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s G-CSF a/alebo IL-1ra na liečbu zápalového ochorenia čriev (inflammatory bowel disease).

V špecifickom preferovanom prípade metóda zahŕňa podávanie (napr. subkutánne alebo intramuskulárne) skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 , voliteľne vo forme s postupným uvoľňovaním (napr. hyalurónan)) alebo v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s leptínom, Marinolom (Marinol™) alebo Megace (Magace™) na liečbu kachexie/anorexie.

V špecifickom preferovanom prípade metóda zahŕňa podávanie (napr. subkutánne, intraventrikulárne alebo intratekálne) skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 , voliteľne vo forme s postupným uvoľňovaním (napr. hyalurónan)) alebo v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s NSAID (napr. indometacínom (indomethacin) a/alebo inhibítorom IL-1 (napr. IL-1ra) na liečbu Alzheimerovej choroby).

V špecifickom preferovanom prípade metóda zahŕňa podávanie (napr. subkutánne, intraventrikulárne alebo intratekálne) skrátených sTNFR produktov (napr. proteínu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 , voliteľne vo forme s postupným uvoľňovaním (napr. hyalurónan)) alebo v kombinácii (pred liečbou, po liečbe alebo súčasne s liečbou) s rozpustným rekombinantným

ľudským antigénom Fas na liečbu rakoviny (napríklad leukémií); detského diabetes mellitus typu 1; odmietnutia štepú hostiteľom; hepatitídy; ischemického/reperfúzneho (reperfusion) poškodenia, vrátane mozgovej ischemie (poškodenia mozgu ako následku traumy, epilepsie, krvácania alebo mŕtvice, ktoré môžu viesť k neurodegenerácii); zápalové neuro ochorenia; reumatické ochorenia, ako sú vymedzené vyššie (napr. lymská choroba, detská (reumatická) artritída, osteoartritída, lupienková artritída, reumatická artritída a stafylokokmi indukovaná („septická“) artritída a transplantácia pletív).

Po uvážení ďalej uvedených ilustratívnych príkladov budú jasné ďalšie stránky a výhody tohto vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Rad aspektov a výhod predkladaného vynálezu bude zrejmý po prezretí obrázkov, kde:

Obr. 1 zobrazuje sekvenciu nukleových kyselín (SEQ ID NO:1) kódujúcu Asp¹-Asn¹⁶¹ - rekombinantný ľudský sTNFR s plnou dĺžkou. Zobrazuje sa aj sekvencia aminokyselín Asp¹-Asn¹⁶¹ (SEQ ID NO:2).

Obr. 2 zobrazuje sekvenciu nukleovej kyseliny (SEQ ID NO:3) kódujúcu NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNSIC-[Cys¹⁹-Cys³⁰]-FC-COOH (uvádzaný aj ako sTNFR-I 2.6D/C105). Zobrazuje sa aj sekvencia aminokyselín NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNSIC-[Cys¹⁹-Cys³⁰]-FC-COOH (SEQ ID NO:4).

Obr. 3 zobrazuje sekvenciu nukleovej kyseliny (SEQ ID NO:5) kódujúcu NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-

COOH (uvádzaný aj ako sTNFR-I 2.6D/C106). Zobrazuje sa aj sekvencia $\text{NH}_2\text{-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (SEQ ID NO:6).

Obr. 4 zobrazuje sekvenciu nukleovej kyseliny (SEQ ID NO:7) kódujúcu $\text{NH}_2\text{-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FN-COOH}$ (uvádzaný aj ako sTNFR-I 2.6D/N105). Zobrazuje sa aj sekvencia aminokyselín $\text{NH}_2\text{-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FN-COOH}$ (SEQ ID NO:8).

Obr. 5 zobrazuje sekvenciu nukleovej kyseliny (SEQ ID NO:11) kódujúcu $\text{NH}_2\text{-MYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (uvádzaný aj ako sTNFR-I 2.3D/d8). Zobrazuje sa aj sekvencia aminokyselín $\text{NH}_2\text{-MYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (SEQ ID NO:12).

Obr. 6 zobrazuje sekvenciu nukleovej kyseliny (SEQ ID NO:9) kódujúcu $\text{NH}_2\text{-M-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (uvádzaný aj ako sTNFR-I 2.3D/d18). Zobrazuje sa aj sekvencia aminokyselín $\text{NH}_2\text{-M-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (SEQ ID NO:10).

Obr. 7 zobrazuje sekvenciu nukleovej kyseliny (SEQ ID NO:13) kódujúcu $\text{NH}_2\text{-MSIS-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (uvádzaný aj ako sTNFR-I 2.3D/d15). Zobrazuje sa aj sekvencia aminokyselín $\text{NH}_2\text{-MSIS-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (SEQ ID NO:14).

Obr. 8 zobrazuje sekvenciu nukleových kyselín (SEQ ID NO:34) kódujúcu $\text{Leu}^1\text{-Thr}^{179}$ hotového rekombinantného ľudského sTNFR-II. Zobrazuje sa aj sekvencia aminokyselín $\text{Leu}^1\text{-Thr}^{179}$ (SEQ ID NO:35).

Obr. 9 znázorňuje rozsah opuchu (amount of swelling) indukovaného v reaktivačnom (reactivation) modeli indukovanom streptokokálnou bunkovou stenou podľa opisu v časti príklady II.

Obr. 10 zobrazuje plazmové profily sTNFR-I 4D/C105db u zdravých paviánov po dvoch minútach intravenózneho infúzie 0,2 mg/kg podľa opisu v časti príklady III.

Obr. 11 zobrazuje plazmové profily sTNFR-I 3D/C105db u zdravých paviánov po dvoch minútach intravenózneho infúzie 0,2 mg/kg podľa opisu v časti príklady III.

Obr. 12 zobrazuje plazmové profily sTNFR-I 2,6D/C105db u zdravých paviánov po dvoch minútach intravenózneho infúzie 0,2 mg/kg podľa opisu v časti príklady III.

Obr. 13 zobrazuje vzťah medzi dávkou a odbúraváním rôznych dimérových sTNFR-I konštruktov podľa opisu v časti príklady III.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Štandardné metódy tvoriace základ pracovných postupov opísaných v nasledovných príkladoch alebo iné vhodné pracovné postupy sa opisujú v známych molekulovo-biologických príručkách, napr. Sambrook et al. (1989), vid' vyššie, a Ausubel et al. (1990), vid' vyššie. Pre väčšiu názornosť sa používa skratka „mL“ pre mililiter a „L“ pre liter.

Príklad 1

Nasledovný príklad opisuje produkciu rôznych foriem skráteného rekombinantného rozpustného sTNFR-I:

NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FC-COOH (sTNFR-I 2.6D/C105); NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (sTNFR-I 2.6D/C106); NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FN-COOH (sTNFR-I 2.6D/N105); NH₂-MYIHPQNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (sTNFR-I 2.3D/d8); NH₂-M-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (sTNFR-I 2.3D/d18) a NH₂-MSIS-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (sTNFR-I 2.3D/d15).

A. Príprava DNA

1. sTNFR-I 2,6D/C106

Klonovaná DNA odvodená z klonu lambda - gt107ctnfbp (EP 422339) slúži ako matrica v PCR amplifikačnej reakcii použitím nasledovných PCR primerov:

5' OLIGO #1: (SEQ ID NO: 68)

5' - GGTTAGCCATATGGACAGCGTTTGCCCCCAA-3'

3' OLIGO #2: (SEQ ID NO: 69)

5' -CCCAAGCTTTTACAGAGAGCAATTGAAGCACTG-3'

OLIGO #1 a OLIGO #2 obsahujú miesta *NdeI* a *HindIII* a hybridizujú s 5'-koncom (OLIGO #1) a 3'-koncom (OLIGO #2) skráteného génu. PCR amplifikačná reakcia prebieha v 25 cykloch; každý cyklus sa skladá z 30 sekúnd pri 94 °C (denaturácia), 15 sekúnd pri 55 °C (hybridizácia primerov) a 1 minúty pri 72 °C (polymerizácia) [termocykler typ 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)]. PCR produkt sa prečistí pomocou QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) podľa návodu výrobcu. Prečistený PCR produkt sa štiepi

enzýmami *NdeI* a *HindIII* a potom izoluje z gélu pomocou QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) podľa návodu výrobcu. PCR produkt izolovaný z gélu sa vloží do vektora pAMG11 (WO 95/26746) a vnesie transformáciou do buniek *E. coli* FM 15 (ATCC 55765).

2. sTNFR-I 2,6D/C105

PCR amplifikácia sTNFR-I 2,6/C105 sa uskutočňuje použitím pľazmidovej DNA sTNFR-I 2,6D/C106 ako matrice a nasledovných PCR primerov:

OLIGO #3: (SEQ ID NO: 70)

5' -ACTCGA GGATCCGCGGATAAATAAGTAACGATCCGGTCCA- 3'

OLIGO #4: (SEQ ID NO: 71)

5'-CAGGTCGGATCCTATCAGCAGAAGCACTGGAAAAGGTTTTC-3'

OLIGO #3 a OLIGO #4 obsahujú miesto *BamHI* a mutáciu N (105) nasledovanú stop kodónom. Primery sú navrhnuté tak, aby úplná amplifikácia matrice zaistila nové miesto *BamHI* vhodné na ligáciu. PCR amplifikačná reakcia prebieha v 35 cykloch; prvých 10 cyklov sa skladá z 10 sekúnd pri 92 °C (denaturácia), 30 sekúnd pri 55 °C (hybridizácia primerov) a 4 minút pri 68 °C (polymerizácia), nasleduje 25 cyklov zložených z 10 sekúnd pri 92 °C (denaturácia), 30 sekúnd pri 55 °C (hybridizácia primerov) a 4 minúty + 20 sekúnd pri 68 °C (polymerizácia) [termocykler typ 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)]. PCR produkt sa prečistí z gélu pomocou QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) podľa návodu výrobcu, štiepi enzýmom *BamHI*, extrahuje zmesou fenolu a chloroformu a prezráža etanolom. Resuspenduje sa, vloží do vektora pAMG11 (WO 95/26764) a vnesie transformáciou do buniek *E. coli* FM 15.

3. sTNFR-I 2,6D/N105

PCR amplifikácia sTNFR-I 2,6D/N105 sa uskutočňuje použitím plazmidovej DNA sTNFR-I 2,6D/C106 ako matrice a nasledovných PCR primerov:

5' OLIGO #5: (SEQ ID NO: 72)

5'-GGTTAGCCATATGGACAGCGTTTGGCCCCAA-3'

3' OLIGO #6: (SEQ ID NO: 73)

5'-CGCGGATCCCTATTAATTGAAGCACTGGAAAAGG-3'

OLIGO #5 a OLIGO #6 obsahujú miesta *NdeI* a *BamHI* a hybridizujú s 5'-koncom (OLIGO #5) a 3'-koncom (OLIGO #6) skráteného génu. PCR amplifikačná reakcia prebieha v 30 cykloch; každý cyklus sa skladá zo 45 sekúnd pri 95 °C (denaturácia), jednej minúty pri 65 °C (hybridizácia primerov) a dvoch minút pri 72 °C (polymerizácia) [termocykler typ 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)].

PCR produkt sa prečistí pomocou Wizard™ Clean-Up Systém (Promega, Madison, WI) podľa návodu výrobcu. Prečistený PCR produkt sa štiepi enzýmami *NdeI* a *BamHI*, extrahuje zmesou fenolu a chloroformu a prezráža etanolom. Potom sa resuspenduje, vloží do reaktora pAMG11 a vnesie transformáciou do buniek *E. coli* FM 15.

Pracovníci s bežnou znalosťou molekulových techník sú si vedomí, že na základe opisu tohto vynálezu sa môžu ľahko na vydarenú expresiu v hostiteľskej bunke (napr. *E. coli* a iné baktérie) použiť alebo upraviť rozmanité genetické materiály a metódy.

4. sTNFR-I 2,3D/d18; sTNFR-I 2,3D/d8 a sTNFR-I 2,3D/d15

PCR amplifikácia sTNFR-I 2,3D/d18; sTNFR-I 2,3D/d8 a sTNFR-I 2,3D/d15 sa zakaždým uskutoční použitím plazmidovej DNA 2,6D/C106 ako matrice pomocou nasledovných PCR primerov: sTNFR-I 2,3D/d8 PCR primery:

5' OLIGO #7: (SEQ ID NO:74)
 5'-CCCCATATGTATATCCACCCTCAAATAAT-3'
 3' OLIGO #8: (SEQ ID NO:75)
 5'-CCCAAGCTTTTACAGAGAGCAATTGAAGCACTG-3'

sTNFR-I 2,3D/d15 PCR primery:

5' OLIGO #9: (SEQ ID NO:76)
 5'-CCCCATATGTGCGATTAGCTGTACCAAGTGCCACAAAGG-3'
 3' OLIGO #10: (SEQ ID NO:77)
 5'-CCCAAGCTTTTACAGAGAGCAATTGAAGCACTG-3'

sTNFR-I 2,3D/d18 PCR primery:

5' OLIGO #11: (SEQ ID NO:78)
 5'-CCCCATATGTGTACCAAGTGCCACAAAGGA-3'
 3' OLIGO #12: (SEQ ID NO:79)
 5'-CCCAAGCTTTTACAGAGAGCAATTGAAGCACTG-3'

Každý z primerov OLIGO #7, OLIGO#9 a OLIGO #11 obsahuje miesto *NdeI* a každý z primerov OLIGO#á, OLIGO#10 a OLIGO#12 obsahuje miesto *HindII*. PCR amplifikačná reakcia prebieha v 25 cykloch; každý cyklus sa skladá zo 45 sekúnd pri 95 °C (denaturácia), jednej minúty pri 65 °C (hybridizácia primerov) a dvoch minút pri 72 °C (polymerizácia) [termocykler typ 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)]. PCR produkty sa prečistia pomocou Wizard™ Clean-Up Systém (Promega, Madison, WI) podľa návodu výrobcu. Prečistené PCR produkty sa štiepia

enzýmami *NdeI* a *BamHI*, extrahujú zmesou fenolu a chloroformu a prezrážajú etanolom. Potom sa resuspendujú, vložia do reaktora pAMG11 a vnesú transformáciou do buniek *E. coli* FM15.

B. Produkcia v *E. coli*

Najprv sa rozmnoží čerstvé inokulum vybraného rekombinantného kmeňa *E. coli* nesúceho požadovaný konštrukt sTNFR-I 2,6D/N105, sTNFR-I 2,6D/C105, sTNFR-I 2,6D/C106, sTNFR-I 2,3D/d18, sTNFR-I 2,3D/d8 a sTNFR-I 2,3D/d15. celý obsah zmrazenej glycerolovej konzervy v zásobnej ampulke (asi 1,5 mL) sa preniesie do 2L nádoby, ktorá obsahuje 500 mL pôdy podľa Luriho (LB). Bakteriálna kultúra sa inkubuje pri teplote 37 °C v rotačnej trepačke pri 350 ot/min. Hustota kultúry sa stanovuje meraním absorbanice pri 660 nm (OD₆₆₀). Inokulum sa kultivuje až do hustoty väčšej ako 2,0 OD₆₆₀. V tomto okamihu sa 125 mL kultúry asepticky preniesie do produkčného fermentora s objemom 15 L, ktorý obsahuje 10 L sterilného média.

Produkčné médium a podmienky fermentácie na vlastnú produkciu ako komplexné médium a podmienky fermentácie opisuje Sniff (1993) v doktorandskej práci nazvanej „Chemicky definované médium na nadprodukciu rekombinantných proteínov v *E. coli*“, Colorado State University. Táto práca doporučuje použitie komplexného média obsahujúceho hydrolyzát kazeínu, solí, glycerol a prostriedok proti peneniu (antifoam). Tieto zložky média sa sterilizujú vo fermentore. Po ochladení fermentora na teplotu nižšiu ako 40 °C sa pridajú stopové minerály a hydrochlorid tiamínu, sterilizované filtráciou.

Po ustálení teploty média na 37 °C sa toto médium naočkuje inokulom. Rast kultúry sa sleduje meraním OD₆₆₀. pH kultúry sa udržiava na hodnote 6,0 automatickým pridávaním 5 M hydroxidu sodného a 5 M kyseliny chlorovodíkovej. Keď OD₆₆₀ dosiahne hodnotu 9,5 až 10,5, kultúra sa indukuje aseptickým pridaním sterilného izopropyl-β-D-tiogalaktopyranozidu (IPTG) po konečnú koncentráciu 0,50 mM. Kultúra sa pozberá po zastavení rastu.

Kultivačné médium a podmienky rastu sa použijú v podobe opísanej Sniffom (1993), vid' vyššie, s nasledovnými rozdielmi: do média sa pridá síran amónny (2,0 g/L) a monohydrát hydrochloridu L-cysteínu (1,0 g/L), hydrochlorid tetracyklínu sa vynechá, pH sa udržiava na hodnote 6,0 pomocou hydroxidu sodného a kyseliny chlorovodíkovej namiesto hodnoty 7,0 udržiavanej len pomocou hydroxidu sodného, teplota kultivácie sa zvýši na 37 °C, koncentrácia induktora sa zvýšila z 0,15 mM na 0,50 mM IPTG, čas zberu sa určí okamihom zastavenia rastu namiesto časom, ktorý uplynul od indukcie.

Po ukončení fermentácie sa bakteriálne bunky pozberajú centrifugáciou v 500 mL kyvetách. Centrifugujú sa pri 10 000 ot/min 30 minút. Kašovitá bakteriálna peleta sa nariedi na hustotu 15% tuhých častíc v lytickom tlmivom roztoku zloženom z 50 mM Tris a 5 mM EDTA, pH 8,0. Resuspendované bunky sa potom lyzujú trojnásobným pretlačením suspenzie homogenizátorom (APV Gaulin, Inc., Everett, MA) pri tlaku 57 MPa (8000 libier na štvorcový palec). Centrifugáciou homogenizátu pri 10 000 ot/min 30 minút sa získajú inklúzne telieska (IT). Inklúzne telieska sa premyjú v lytickom tlmivom roztoku a centrifugujú tretí raz pri 10 000 ot/min 30 minút. Po resuspendovaní IT v deionizovanej vode (v pomere 1:1) sa naposledy centrifugujú pri 10 000 ot/min 30 minút. Tento krok predstavuje druhé premytie. Premyté inklúz-

ne telieska každého proteínu sa pripravia na rozpustenie, renaturáciu a purifikáciu. Každá várka dáva výťažok asi 200 až 250 IT.

Skrátený sTNFR-I sa môže pripraviť fermentáciou podľa iného postupu:

Najprv sa rozmnoží čerstvé inokulum vybraného rekombinantného kmeňa *E. coli* nesúceho požadovaný konštrukt sTNFR-I 2,6D/N105 alebo sTNFR-I 2,6D/C106. Celý obsah zmrazenej glycerolovej konzervy v zásobnej ampulke (asi 1,5 mL) sa preniesie do 2L nádoby, ktorá obsahuje 500 mL kvasnicového extraktu BBL (10 g/L, pH 7,0). Kultúra sa inkubuje pri teplote 33 °C v rotačnej trepačke pri 300 ot/min. Hustota kultúry sa stanovuje meraním absorpcie pri 600 nm (OD_{600}). Inokulum sa kultivuje až do hustoty väčšej ako 2,0 OD_{600} . V tomto okamihu sa 80 mL kultúry asepticky preniesie do produkčného fermentora s objemom 15 L, ktorý obsahuje 7 L sterilného rastového média.

Produkčná fermentácia využíva postup kontinuálneho dopĺňania živín do média. Produkčné médium je komplexné médium obsahujúce kvasnicový extrakt, soli a prostriedok proti peneniu (antifoam). Tieto zložky média sa sterilizujú vo fermentore. Po ochladení fermentora na teplotu nižšiu ako 40 °C sa pridávajú stopové minerály, glukóza, síran horečnatý a hexametafosfát, sterilizované filtráciou. Použijú sa dve živiny, jedna je zdrojom uhlíka (glukóza/síran horečnatý), druhou je kvasnicový extrakt obsahujúci dusík.

Po ustálení teploty produkčného média na 33 °C sa toto médium naočkuje inokulom. Rast kultúry sa sleduje meraním OD_{600} . pH kultúry sa udržiava na hodnote 7,0 automatickým pridávaním hydroxidu amónneho a kyseliny citrónovej (48,7%). Keď OD_{600} dosiahne hodnotu 8,0 až 12,0, začne sa pridávať živina I exponenciálnou rýchlosťou. Keď sú hodnoty OD_{600}

v rozmedzí 30 až 40, začína pridávanie živiny II konštantnou rýchlosťou. Po dosiahnutí hodnôt OD_{600} 67 až 83 sa kultúra indukuje aseptickým pridaním sterilného autoinduktora (laktón homoserínu) po konečnú koncentráciu 0,6 mg/L. V okamihu indukcie sa rýchlosti pridávania živín I a II zmenia na konštantné. Kultúra sa pozberá 16 hodín (+/-2) po indukciu.

Po ukončení fermentácie sa bakteriálne bunky pozberajú centrifugáciou v 500 mL kyvetách pri 10 000 ot/min počas 30 minút. Kašovitá bakteriálna peleta sa nariedi na hustotu 15% tuhých častíc v lytickom tlmivom roztoku zloženom z 50 mM Tris a 5 mM EDTA, pH 8,0. Resuspendované bunky sa potom lyzujú trojnásobným pretlačením suspenzie homogenizátorom (APV Gaulin, Inc., Everett, MA) pri tlaku 57 MPa (8000 libier na štvorcový palec). Centrifugáciou homogenizátu pri 10 000 ot/min 30 minút sa získajú inklúzne telieska (IT). Inklúzne telieska sa premyjú v lytickom tlmivom roztoku a centrifugujú tretí raz pri 10 000 ot/min 30 minút. Po resuspendovaní IT v deionizovanej vode (v pomere 1:1) sa naposledy centrifugujú pri 10 000 ot/min 30 minút. Tento krok predstavuje druhé premytie. Premyté inklúzne telieska každého proteínu sa pripravujú na rozpustenie, renaturáciu a purifikáciu.

C. Rozpúšťanie/ Renaturácia:

Premyté IT z každej 10 L fermentácie sa rozpustia v 800 mL solubilizačného tlmivého roztoku (50 mM Tris, 8 M močovina, 160 mM cysteín, pH 9,5). pH solubilizačnej zmesi sa nastaví na hodnotu 9,5 pomocou 10N NaOH, zmes sa mieša pri laboratórnej teplote 2 až 3 hodiny. Každá várka poskytla výťažok asi 200 až 250 g IT.

Jednotlivé solubilizačné zmesi sa riedia v pomere 1:20 v chladnom renaturačnom tlmivom roztoku (50 mM Tris, 1,1 M močovina). Konečný objem je asi 16 L. Potom sa pH jednot-

livých zmesí nastaví na hodnotu 9,7 pomocou 6N HCl. Zmesi sa pomaly miešajú pri 4 °C 2 až 3 dni.

Potom sa pH jednotlivých zmesí nastaví na hodnotu 5,0 ľadovou kyselinou octovou a 6N HCl. Zrazenina, ktorá sa v každej zmesi vytvorí, sa odstráni centrifugáciou pri 10 000 g v centrifúge Beckman, typ J2-HS. Získaný supernatant sa potom filtruje na 5µm a 0,22µm filtri.

D. Purifikácia

Renaturovaný proteín sa pripraví na purifikáciu na kolóne IX-1 SP Sepharose Big Bead™ (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

Kolóna IX-1 SP Sepharose Big Bead™ (4,4 cm x 20 cm)

Tlmivý roztok A	Tlmivý roztok B
25 mM octan	25 mM octan
50 mM NaCl	375 mM NaCl
pH 5,0	pH 5,0

Pred nanesením renaturovaného materiálu sa každá kolóna ekvilibruje 4 až 5 objemami kolóny tlmivým roztokom A. Materiál z jednotlivých várok sa oddelene nanáša na kolóny na prečistenie. Na každú kolónu sa nanesie maximálne 12 g proteínu na liter polyméru. Potom sa každá kolóna premyje 3 až 4 objemami kolóny tlmivého roztoku A (ak sa hodnota UV nevráti k základnej línii). Proteíny sa eluujú pomocou lineárne rastúceho gradientu soli v rozmedzí 50 až 375 mM NaCl s celkovým rozsahom 8 objemov kolóny. Celá bielkovinová frakcia sa zhromaždí. Zachytávanie bielkovinovej frakcie na každej kolóne začína, keď UV absorbancia vzrastie na 20 % maxima. Zber eluátu sa zastaví v prípade dosiahnutia hodnôt 50 % maxima UV absorbancie alebo ak absorbancia prestáva klesať.

Rýchlosť prietokov:

7,5 objemov kolóny/hod - ekvilibrácia, premývanie

15 objemov kolóny/hod - nanášanie

6 objemov kolóny/hod - elúcia

Celá purifikácia na kolónach sa uskutočňuje pri 4 °C.

Spojené frakcie z každej IX-I kolóny sa pripraví na ďalšie prečistenie na kolóne Toyo Pearl™ Butyl 650M HIC (Toso Haas, Philadelphia, PA).

Kolóna 300 mL - Toyo Pearl™ Butyl 650M (4,4 cm x 20 cm)

Tlmivý roztok A	Riediaci tlmivý roztok	Tlmivý roztok B
20 mM NaPO ₄	40 mM NaPO ₄	Milli Q H ₂ O
1,8 M NaCl, pH 6,0		4 M NaCl pH 6,0

Pred nanesením spojenej frakcie z kolóny IX-I sa kolóna ekvilibruje 4 až 5 objemami kolóny tlmivým roztokom A. Spojené frakcie z IX-1 sa zriedia 1:1 riediacim tlmivým roztokom a pH sa upraví na hodnotu 6,0. Zriedená spojená frakcia z IX-I sa naniesie na kolónu. Na každú kolónu sa naniesie maximálne desať gramov proteínu na liter polyméru. Potom sa každá kolóna premyje 3 objemami kolóny tlmivého roztoku A. Proteíny sa eluujú pomocou lineárne klesajúceho gradientu soli v rozmedzí 1,8 mM NaCl až H₂O s celkovým rozsahom 8 objemov kolóny. Zachytávanie každej bielkovinovej frakcie začína, keď UV absorbancia vzrastie na 15 až 20 % maxima. Zber sa ukončí v prípade dosiahnutia hodnôt 50 % maxima UV absorbancie alebo ak absorbancia prestáva klesať.

Rýchlosť prietokov:

6 objemov kolóny/hod - ekvilibrácia, nanášanie a premývanie
3 objemy kolóny/hod - elúcia

Celá purifikácia a kolónach sa uskutočňuje pri laboratórnej teplote.

Zahustenie/diafiltrácia (C/D)

V kroku C/D sa použije 1 štvorcová stopa (30,5 cm x 30,5 cm) PLLC regenerovanej celulózovej membrány s M.V.cutoff 5 000 (Milli-Pore, Bedford, MA). Každá spojená frakcia z kolóny HIC sa zahustí na objem asi 200 mL a potom diafiltruje proti 6 až 7 objemom 20 mM NaPO₄ pH 6,0, kým vodivosť nie je nižšia ako 4 mm/hod.

Zahustenie/diafiltrácia sa uskutočňuje pri laboratórnej teplote.

Každá vzorka po C/D sa pripraví na prečistenie na kolóne IX-2 - 365 mL SP-Sepharose HP™ (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

Kolóna IX-2 - 365 mL SP-Sepharose HP™ (5 cm x 18,5 cm)

Ekvilibračný	Tlmivý roztok A	Tlmivý roztok B
tlmivý roztok		
20 mM Na NaPO ₄	20 mM NaPO ₄	20 mM NaPO ₄
pH 6,0	pH 6,3 50 mM NaCl	pH 6,8

Pred nanesením jednotlivých vzoriek C/D sa každá kolóna ekvilibruje 4 až 5 objemami kolóny ekvilibračného

tlmivého roztokom A. Každá vzorka C/D sa oddelene nanáša na kolónu tak, aby nanesené množstvo neprekročilo osem gramov proteínu na liter polyméru. Potom sa každá kolóna premyje 3 objemami kolóny ekvilibračného tlmivého roztoku a 3 objemami tlmivého roztoku A. Proteíny sa eluujú pomocou lineárneho gradientu pH v rozmedzí 6,3 až 6,8 a gradientu soli v rozmedzí 0 až 50 mM NaCl (tlmivý roztok B) s celkovým rozsahom 8 objemov kolóny. Zber frakcií začína pri hodnote O.D. 1,0 na začiatku a končí pri dosiahnutí 50 % maxima na konci.

Skrátený sTNFR-I sa môže solubilizovať, renaturovať a prečistiť aj iným spôsobom, ktorého opis nasleduje.

C.1 Rozpúšťanie/Renaturácia:

Premyté inklúzne telieska (IT) sa rozpustia v roztoku so zložením 8 M močovina, 60 mM Tris, 100 mM cysteín tak, aby výsledná koncentrácia roztoku bola 6,5 M močovina, 50 mM Tris a 80 mM cysteín, pH 9,4 a 5 až 10 mg/mL skráteného sTNFR-1. (Koncentrácia sTNFR-1 sa stanoví na základe množstva sTNFR-I v premytých IT v g/L.) Roztok sa mieša pri laboratórnej teplote 90 minút a potom sa proteíny renaturujú zriedením 1:10 v chladnom (4 °C až 8 °C) tlmivom roztoku so zložením 0,85 M močovina, 50 mM Tris, pH 9,8 (pH je merané pri teplote 4 °C až 8 °C).

Renaturovaný roztok sa mieša 24 až 72 hodín pri 4 °C až 8 °C. Na konci tohto času sa pridá ľadová kyselina octová (~ 20 mM) a pH sa upraví na 5,0. Vytvorená zrazenina sa odstráni centrifugáciou a supernatant sa uchováva na naniesenie na prvú kolónu.

D.1 Purifikácia

Prejasnený supernatant po kyslej precipitácii sa naniesie na kolónu SP-Sepharose Big Bead™ (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), ktorá sa ekvilibrovala tlmivým roztokom so zložením 20 mM octan sodný, 75 mM NaCl, pH 5,0. Vzorka sa naniesie na kolónu v množstve nepresahujúcom 15 g skráteného sTNFR-1 na L objemu náplne. Po nanesení sa kolóna premyje 3 objemami kolóny 20 mM octanu sodného, 75 mM NaCl, pH 5,0 a eluuje lineárnym 9 kolónovým gradientom v rozmedzí 75 mM až 450 mM NaCl v 20 mM octane sodnom, pH 5,0. Čistenie na kolóne SP-Sepharose Big Bead™ (SP-BB) sa uskutočňuje pri teplote 4 °C až 8 °C.

Spojené frakcie z SP-BB kolóny sa nariedia v pomere 1:1 v 2 M NaCl, 60 mM octane, pH 4,5 a ak je to nutné, pH sa upraví na 4,5. Spojená frakcia z SP-BB kolóny sa naniesie na kolónu Toyopearl™ Butyl 650M (Toso Haas, Philadelphia, PA), ekvilibrovanú tlmivým roztokom so zložením 1M NaCl, 30 mM octan, pH 4,5. Na kolónu sa naniesie skrátený sTNFR-1 v množstve ~ 10 až 13 gramov na liter náplne kolóny. Po nanesení vzorky sa kolóna premyje 3 objemami kolóny tlmivého roztoku so zložením 1 M NaCl, 30 mM octan, pH 4,5 a eluuje lineárnym gradientom (8 objemov kolóny) v rozmedzí 1 M NaCl až 0 M NaCl v 30 mM octane pH 4,5.

Purifikované frakcie skráteného sTNFR-1 z Butyl 650M kolóny sa spoja, zriedia vodou 1:5 a nanesú na kolónu SP-Sepharose High Performance™ (SP-HP) (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) ekvilibrovanú 30 mM octanom, pH 4,5 (nanesené maximálne ~ 15 g/L objemu náplne). Kolóna sa potom premyje 3 objemami 30 mM octanu, pH 4,5 a eluuje lineárnym gradientom (12 objemov kolóny) v rozmedzí 100 mM až 400 mM NaCl v 30 mM octane, pH 4,5. Purifikované frakcie skráteného sTNFR-1 sa spoja a pH sa upraví na 5,0 pomocou NaOH.

C. PEGylácia:

1. Príprava sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa)

K chladnému roztoku (4 °C) sTNFR-I 2,6D/N105 (3,5 mg/mL) v 50mM octane sodnom, pH 4, sa pridá za stáleho miešania trojnásobný molový nadbytok t-BuPEG (mono-terc-butoxypolyetylénglykol, priemerná m.h. = 33 kDa, Sherwater polymers, Inc.). NaCNBH₃ sa pridá do výslednej koncentrácie 20 mM a reakčná zmes sa mieša 18 až 24 hodín pri 7 °C.

Rozsah modifikácie proteínu v priebehu reakcie sa sleduje pomocou SEC HPLC kolóny TSKG3000sw_{XL} (Toso Haas, Montgomeryville, PA), vymývanej fosfátovým tlmivým roztokom so zložením 0,1M fosforečnan sodný, pH 6,9, 0,5M NaCl a 10% etanol rýchlosťou 0,7 ml/min (Toso Haas, Montgomeryville, PA).

pH reakčnej zmesi sa upraví na hodnotu asi 3,5 pomocou 1M HCl a reakčná zmes sa zriedi vodou na výslednú koncentráciu 1,5 mg/ml.

sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) sa oddelí od zvyšku t-BuPEG a iných vedľajších produktov ionexovou chromatografiou na SP-Sepharose HP 16/10TM (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

Reakčná zmes sa nanesie na kolónu a nezreagovaný t-BuPEG sa vymyje 3 objemami kolóny štartovacieho tlmivého roztoku A (20mM octan sodný, pH 4,0). sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) sa eluuje lineárnym gradientom (20 objemov kolóny) v rozmedzí 0 až 30 % tlmivého roztoku B (1M NaCl v 20mM octane, pH 4,0). Eluát sa meria pri 280 nm. Každá frakcia obsahujúca sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) sa analyzuje pomocou SDS-PAGE na komerčne pripravených gradientových géloch 4 až 20% (Novex, San Diego, CA). Frakcie sa spoja podľa výsledkov SDS-PAGE, zahustia a sterilne filtrujú. Všetky spojené frakcie prečisteného sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) sa opäť analyzujú pomocou SDS-PAGE a SEC HPLC.

Proteín sa preniesie do roztoku 10 mM fosforečnan sodný, pH 6,5 a 20 mM NaCl.

1. Príprava sTNFR-I 2,6D/N105-33 kDa (MePEG)

K chladenému (7 °C) a miešanému roztoku sTNFR-2,6D/N105 (4 mg/mL) sa pridáva kyselina octová dovtedy, kým hodnota pH nedosiahne 5,0. K tomuto roztoku sa pridá 15 mM NaCNBH₃ a dvojnásobný molový nadbytok t-butoxy PEG (terc-butoxypolyetylén glykol, priemerná m.h. = 33 kDa, Shearwater polymers, Inc.). Reakčná zmes sa pri tejto teplote krátko mieša a potom sa inkubuje asi 18 hodín.

Po 18 hodinách sa reakčná zmes upraví na pH 3,0 kyselinou citrónovou.

sTNFR-I 2,6D/N105-t-MePEG (33 kDa) sa oddelí od zvyšku MePEG a iných vedľajších produktov ionexovou chromatografiou na kolóne SP-Sepharose HPTM (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

Reakčná zmes sa naniesie na kolónu (maximálne 8 mg/ml polyméru) a nezreagovaný MePEG sa eluuje 3 objemami kolóny štartovacieho tlmivého roztoku A (20mM citrát sodný, pH 3,0). sTNFR-I 2,6D/N105-t-MePEG (33 kDa) sa eluuje lineárnym gradientom (16 objemov kolóny) v rozmedzí 0,1 až 0,5 M NaCl v 20mM citráte, pH 3,0. Eluát sa meria pri 280 nm. Každá frakcia obsahujúca sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG(33 kDa) sa analyzuje pomocou SDS-PAGE na komerčne pripravených gradientových géloch 4 až 20% (Novex, San Diego, CA). Frakcie sa spoja podľa výsledkov SDS-PAGE, zahustia a sterilne filtrujú. Všetky spojené frakcie prečisteného sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG(33 kDa) sa opäť analyzujú pomocou SDS-PAGE. Purifikovaný sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (33 kDa) sa zahustí na 5 až 20 mg/mL a preniesie do PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35 až 100 mM NaCl) alebo do 20 mM octanu, 100 mM NaCl, pH 5,0).

3. Príprava sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (20 kDa)

Postup kroku A prípravy sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (33 kDa) sa v podstate zopakuje s tou výnimkou, že MePEG (monometoxypolyetylénglykol, priemerná m.h. = 33 kDa, Shearwater Polymers, Inc.) sa nahradí MePEGom (monometoxypolyetylénglykol, priemerná m.h. = 20 kDa, Shearwater polymers, Inc.). Tento proteín sa preniesie do roztoku 10mM fosforečnan sodný, pH 6,5 a 20mM NaCl.

4. Príprava ďalších konjugátov

Ďalšie konjugáty sTNFR-I 2,6D/N105 sa pripravujú v podstate rovnako ako sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG(33 kDa) s použitím nasledovných typov PEG aldehydov (Shearwater Polymers, Inc.).

Lineárny monofunkčný - m.h. 5 kDa a 57 kDa

Rozvetvený monofunkčný - m.h. 10 kDa, 20 kDa a 40 kDa

Lineárny monofunkčný - m.h. 8 kDa a 20 kDa

Rozvetvený trifunkčný - m.h. 10 kDa

Tieto proteíny sa preniesú do roztoku 10 mM fosforečnan sodný, pH 6,5 a 20 mM NaCl.

5. Iné metódy pegylácie

Skrátené molekuly sTNFR-I sa môžu pegylovať a purifikovať aj inými spôsobmi:

Eluát z kolóny SP-HP (3 až 5 mg/mL, pH upravené na 5,0) reaguje s 2 molmi polyetylénglykolu (napr. MePEG alebo t-BuPEG) na mol sTNFR-I 2,6D/N105 (~ 5 gramov t-BuPEG na gram sTNFR-I 2,6D/N105). Po rozpustení polyetylénglykolu sa pridá 10 až 20 mM kyanoborohydrid a roztok sa inkubuje cez noc pri 7 až 15 °C. Po skončení pegylácie (~ 18 hodín) sa reakcia ukončí pridaním 10 mM glycínu.

Pegylačná zmes sa zriedi 4 objemami 50 mM octanu, pH 4,0, výsledné pH sa upraví na 4,0, ak je to potrebné. Zmes sa naniesie na SP-HP kolónu ekvilibrovanú 50 mM octanom, pH 4,0. Maximálne 8 gramov sTNFR-I 2,6D/N105 na liter objemu náplne sa naniesie na kolónu. Potom sa kolóna premyje 3 objemami kolóny ekvilibračného tlmivého roztoku a eluuje lineárnym gradientom 0 až 0,3M NaCl v 50 mM octanu, pH 4,0. Monopegylované frakcie sTNFR-2,6D/N105-30 kDa sa zbierajú, pH sa upraví na 5,0, ďalej sa zahustia a diafiltrujú do izotonického tlmivého roztoku. Všetky purifikačné kroky sa uskutočňujú pri laboratórnej teplote. Proteín sa preniesie buď do PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35 až 100 mM NaCl), alebo do 20 mM octanu, 100 mM NaCl, pH 5,0.

6. Príprava sTNFR-I 2,6D/C105 a sTNFR-I 2,6D/C106

Polyetylénglykol aktivovaný sulfónovou skupinou (pripravený a prečistený podľa patentov United States Patent Application No. 08/473,809, podaného 7. júna 1995 a United States Patent Application No. 08/611,918, podaného 6. marca 1996) [PEG 20 000-*bis*-vinylsulfón] sa použije na dimerizáciu proteínov v podstate podľa metódy opísanej v PCT Publication No. WO 95/34326, okrem redukcie a reakčný podmienok.

Proteíny sa pred pripojením polyetylénglykolu redukujú 4 molmi DTT na jeden mol proteínu pri teplote 5 až 6 °C, pH 7,6. Všetky reakcie prebiehajú v prítomnosti 30% glycerolu. Dimerizovaný proteín sa nazýva sTNFR-I 2,6D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C106db. Každý proteín sa preniesie do PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35 až 100 mM NaCl) alebo do 20 mM octanu, 100 mM NaCl, pH 5,0.

7. Príprava porovnávacích molekúl sTNFR-I

(i). sTNFR-I 4D/N105 sa pripraví podľa opisu v EP 422339. sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG (33 kDa) sa pripraví pegy-

láciou sTNFR-I 4D/N105 v podstate podľa postupu uvedeného vyššie pre pegyláciu sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG (33 kDa). sTNFR-I 4D/N105-t-MePEG (33 kDa) sa pripraví pegyláciou sTNFR-I 4D/N105 v podstate podľa postupu uvedeného vyššie pre pegyláciu sTNFR-I 2,6D/N105-t-MePEG (33 kDa). Príprava sTNFR-I 4D/C105 a sTNFR-I 4D/C105db sa opisuje v PCT Publication No. WO 95/34326. Tieto proteíny sa rozpustia v 10mM fosforečnane sodnom, pH 6,5 a 20 mM NaCl.

(ii). sTNFR-I 4D/C105-33 kDa (MePEG) sa pripraví pegyláciou 4D/C105 v podstate podľa postupu uvedeného vyššie pre pegyláciu sTNFR-I 2,6D/C105-33 kDa (MePEG) s touto výnimkou: reakcia prebieha pri pH 7,5 a 1,3 molmi DTT na mol sTNFR-I ~ 5 až 6 hodín, potom nasleduje odstránenie DTT na kolóne SP-Shepharose™ FF a PEGylácia s 1,5 až 3 mol PEG na mol proteínu počas najmenej 15 hodín pri laboratórnej teplote. Tento proteín sa rozpustí v PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35 až 100 mM NaCl) alebo v 20 mM octane, 100 mM NaCl, pH 5,0.

(iii). sTNFR-I 3D/N105 (sTNFR-I 4D/N105 skrátený o 34 aminokyselín na C-konci) sa pripraví nasledovným spôsobom. PCR amplifikácia sa uskutoční s matricou sTNFR-I 4D/N105 a primermi OLIGO#13 (nesie miesto *NdeI*, hybridizuje s 5'-koncom skráteného génu) a OLIGO#14 (nesie miesto *HindIII*, hybridizuje s 3'-koncom skráteného génu). PCR amplifikačné reakcie prebiehajú v 25 cykloch; každý cyklus sa skladá z 30 sekúnd pri 94 °C (denaturácia), 15 sekúnd pri 60 °C (hybridizácia primerov) a 1 minúty pri 72 °C (polymerizácia) [termocykler typ 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)]. PCR produkt sa prečistí pomocou QIAquick™ PCR Purification Kit (QUIAGEN, Chatsworth, CA). Prečistený PCR produkt sa štiepi enzýmami *NdeI* a *HindIII* a potom sa izoluje z gélu pomocou QIAquick™ Gel Extraktion Kit (QUIAGEN, Chatsworth,

CA). Produkt PCR izolovaný z gélu sa vloží do vektora pAMG11 a vnesie transformáciou do buniek *E. coli* FM 15.

5' OLIGO#13: (SEQ ID NO:80)

5'-GGTTAGCCATATGGACAGCGTTTGCCCCAA-3'

3' OLIGO#14 (SEQ ID NO:81)

5'-CCCAAGCTTTTAGGTGCACACGGTGTCTGTTT-3'

Tento proteín sa rozpustí v 10 mM fosforečnane sodnom, pH 6,5 a 20 mM NaCl.

(iv). sTNFR-I 3D/C105 (sTNFR-I 4D/C105 skrátený o 34 aminokyselín na C-konci) sa pripraví tak ako sTNFR-I 3D/N105, ako matrica sa však použije sTNFR-I 4D/C105. sTNFR-I 3D/C105 sa rozpustí v PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35 až 100 mM NaCl) alebo v 20 mM octane, 100 mM NaCl, pH 5,0.

(v). sTNFR-I 3D/C105db sa pripraví podobne ako sTNFR-I 4D/C105db, ako východisková látka sa však použije sTNFR-I 3D/C105 namiesto sTNFR-I 4D/C105. sTNFR-I 3D/C105db sa rozpustí v PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35 až 100 mM NaCl) alebo v 20 mM octane, 100 mM NaCl, pH 5,0.

Príklad II

Schopnosť inhibovať aktivitu TNF sa stanovuje pri rôznych formách skráteného rekombinantného rozpustného TNFR-I.

A. WEHI cytotoxický test

Test WEHI je založený na proliferácii buniek *in vitro* (Edwards et al. (1991), *Endocrinology*. 128: 989-996). Bunkové

línie sú citlivé na TNF- α (t. zn. TNF- α je cytotoxický). V prítomnosti inhibítora TNF- α sú bunky ochránené pred cytotoxickým účinkom, a sú preto schopné proliferácie.

Protokol:

Bunky WEHI 164 klon 13, citlivé na TNF (ATCC, Rockville, MD) sa suspendujú v koncentrácii 20×10^4 buniek/mL v médiu RPMI (Gibco, Grand Island, NY) doplnenom 5% Fetal Calf Serum (Hyclone, Ogden, UT) a penicilín (50 jednotiek/mL): streptomycín (50 ng/mL). Sto mikrolitrov tejto bunkovej suspenzie sa preniesie do všetkých jamiek 96-miestnej mikrotitračnej platničky s plochým dnom, bunky sa ponechajú adherovať 4 až 6 hodín pri 37 °C v 5% CO₂. Do každej jamky sa pridá 10 μ l aktinomycínu D (0,0060 mg/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Desať mikrolitrov rekombinantného ľudského TNF- α s koncentráciou 50 ng/ml (výsledná koncentrácia 5 ng/ml) sa pridá do každej jamky. Dvojkový riediaci rad rôznych foriem sTNFR (sTNFR-I 2,6D/C106, sTNFR-I 4D/C105 a sTNFR-I 4D/C105db) sa nariedi v PBS a potom pridá dvojmo do jamiek (10 μ L/jamka) s adherovanými bunkami línie WEHI 164, ku ktorým sa predtým pridal rekombinantný ľudský TNF- α . Bunky WEHI-164 klon 13 sa inkubujú 18 hodín pri 37 °C v 5% CO₂. Po skončení inkubácie sa pridá 10 mL roztoku (2 mg/mL) organického farbiva MTT tetrazólium (3-[4,5-dimetyltiozol-2-yl]-2,5-difenyltetrazóliumbromid; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a bunky sa ďalej inkubujú 4 až 6 hodín. Bunky sa solubilizujú pridaním 50 μ l roztoku DMF/SDS (20% SDS a 50% N,N-dimetylformamid, pH 4,7). Roztok DMF/SDS sa premiešava viacnásobným nabraním a vypustením zo špičky, kým sa všetky kryštáliky MTT nerozpustia a bunky sa ďalej inkubujú 2 až 22 hodín. Hodnoty absorbancie sa merajú na čítacom zariadení Vmax pri 570.

Podiel špecifickej cytotoxicity sa vypočíta z hodnôt optických denzít podľa vzorca: % špecifickej cytotoxicity = $100 \% \times [\text{abs}(\text{bunky} + \text{médium}) - \text{abs}(\text{bunky} + \text{vzorka})] / [\text{abs}(\text{bunky} + \text{médium}) - \text{abs}(\text{bunky} + \text{TX-100})]$. Počet jednotiek TNF v každej vzorke sa určí pomocou podielu špecifickej cytotoxicity myších štandardov, ako sa už predtým opísalo.

Výsledky testu WEHI sú zhrnuté nižšie v tabuľke 2:

TAB. 2: Aktivita *in vitro* v teste WEHI

Látka	IC50 (ng/mL)
sTNFR-1 2,6D/C106	208
sTNFR-1 4D/C105	238
sTNFR-1 4D/C105db	N/A

Na základe výsledku testu WEHI nie sú žiadne významné rozdiely v biologickej účinnosti *in vitro* medzi sTNFR-1 2,6D/C106 a sTNFR-1 4D/C105.

B. Cytotoxický test L929:

Cytotoxický test L929 je založený na proliferácii buniek *in vitro* (Parmely et al. (1993), *J. Immunol.*, 151: 389-396), stanovuje taktiež cytotoxicitu usmrcovania citlivého na TNF- α . Bunkové línie sú citlivé na TNF- α (t. zn. TNF- α je cytotoxický). V prítomnosti rozpustného inhibítora TNF- α sú bunky ochránené pred cytotoxickým účinkom, a sú preto schopné proliferácie.

Protokol:

Bunková línia L929 sa získa z American Type Culture Collection (Catalog number CCL 1, NCTC klon 929, klon kmeňa L, spojivové tkanivo, myš). Na rozmnoženie buniek sa použije RPMI Medium 1640 doplnené 10% FBS + 1% roztok L-glutamínu + 1% roztok penicilín-streptomycínu.

Test sa uskutočňuje na 96-miestnych mikrotitračných platničkách (Corning) tak, že sa použije len 60 vnútorných jamiek. Test sa opakuje trikrát na tej istej platničke pre štandard aj pokusné vzorky.

TNF- α použitý v teste pochádza z R&D Systems (Minneapolis, MN). Konečná koncentrácia TNF- α je 1 ng/mL vo všetkých pokusných jamkách.

Vzorky sa riedia v rastovom médiu L929, 10 ng/mL TNF- α , 10 μ g/mL aktinomycínu D (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) - Assay Diluent.

Platničky sa pozberajú pomocou roztoku XTT/MEN (1,5 mg/mL XTT + 75 mM MEN).

Prvý deň sa bunky vysejú na pokusné platničky. Bunková suspenzia sa pripraví trypsinizáciou a resuspendovaním buniek v koncentrácii $3,33 \times 10^4$ buniek/mL. Do každej z vnútorných 60 jamiek pokusnej platničky sa vyseje 180 μ L tejto bunkovej suspenzie. 200 μ L rastového média sa rozmiestni vo vonkajších 36 jamkách, aby sme sa vyhli pokusným chybám spôsobeným odparovaním. Platničky prikryté fóliou a chránené pred prievanom sa ponechajú pri laboratórnej teplote asi 1 hodinu. Potom sa umiestnia v inkubátore s vysokou vlhkosťou pri teplote 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂. Platničky sa inkubujú asi 20 až 22 hodín, potom sa pridá sTNFR-I v rôznom riedení.

Druhý deň sa pripraví štandard sTNFR-I 4D/N105 a pokusné vzorky týmto spôsobom: Zriedte štandard sTNFR-I 4D/N105 a pokusné vzorky na koncentráciu asi 2,0 mg/mL (alebo na inú

vhodnú koncentráciu). Urobte postupné riedenia tejto koncentrácie tak, aby vznikla riediaca krivka s 10 bodmi siahajúcimi od hodnoty asi $1,0 \times 10^6$ ng/mL k $1,0 \times 10^{-3}$ ng/mL vrátane 0 ng/mL (len Assay Diluent). Môžu sa použiť aj iné vhodné koncentrácie. Pridajte 1000 μ L každého riedenia trojmo na každú pokusnú platničku. Potom inkubujte platničky v inkubátore s vysokou vlhkosťou pri teplote 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂ 20 $\pm$ 1 hodín.

Tretí deň sa pridá 50 μ l na jamku roztoku XTT/MEN do 60 vnútorných jamiek pokusných platničiek. Platničky sa inkubujú v inkubátore s vysokou vlhkosťou pri teplote 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % CO₂ (Falcon, New York, New York) 24 $\pm$ 0,5 hodín.

Štvrtý deň sa stanovia hodnoty optickej hustoty (O. D.) pokusných platničiek pri 450 nm mínus 650 nm na čítacom zariadení ELISA (SpectraMAX, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA). Ak sa získa pri týchto vlnových dĺžkach hodnota 4000 OD pre jamky na platničke, platnička sa musí ihneď znova prečítať pri 490 nm mínus 650 nm a tieto údaje sa musia použiť na výpočet.

Štandardná logaritmická krivka závislosti odpovede od dávky sa stanoví pomocou štvorparametrovej logaritmickkej aproximácie. Pôvodné koncentrácie neznámych vzoriek sa vypočítajú zo štandardnej krivky, ED₅₀ sa vypočíta pre štandard, vypočíta sa korelačný koeficient štandardnej krivky.

Výsledky:

L929

Výsledky cytotoxického testu ^{*L929*} zú zhrnuté v tabuľke 3.

TAB. 3 : Aktivita *in vitro* v cytotoxickom teste L929.

Látka	Koncentrácia (mg/mL)	ED ₅₀ (ng/mL)
sTNFR-I 4D/C105db	7,8	1,0 $\pm$ 0,1
sTNFR-I 2,6D/C105db	2,6	1,1 $\pm$ 0,0
sTNFR-I 2,6D/C106db	2,2	1,0 $\pm$ 0,1
sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG (33 kDa)	2,0	229,2 $\pm$ 8
sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG (33 kDa)	1,1	325,5 $\pm$ 147
sTNFR-I 2,6D/C105-t-BuPEG (33 kDa)	1,7	210,2 $\pm$ 9

Vnútorňý štandard:

sTNFR-I 4D/C105	3,5	314,8 $\pm$ 188,1
-----------------	-----	-------------------

Údaje naznačujú, že sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 2,6D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C106db sú aktívne a majú porovnateľnú odpoveď na dávku v porovnaní so štandardom. Ďalej z týchto údajov vyplýva, že sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33kDa), sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33kDa) a sTNFR-I 2,6D/C105-t-BuPEG(33kDa) majú takmer o dva rády nižšiu aktivitu, avšak sú ešte v tomto teste aktívne v porovnaní s sTNFR-I 4D/C105db.

Pokus #2

sTNFR-I 3D/C105db	0,2	2,27 $\pm$ 0,3
sTNFR-I 3D/C105db	0,2	2,0*
sTNFR-I 3D/C105db	1,9	1,8*
sTNFR-I 3D/N105	2,4	413,3*

Vnútorňý štandard:

sTNFR-I 4D/C105	3,5	115,9 $\pm$ 42,1
-----------------	-----	------------------

- Hodnota založená na jedinom výsledku

Tieto údaje dokazujú, že sTNFR-I 3D/C105db je aktívny a hodnoty ED₅₀ sú v rozmedzí hodnôt charakterizujúcich sTNFR-I 4D/C105db (pokus 1#), sTNFR-I 2,6D/C105db (pokus 1#) a sTNFR-I 2,6D/C106db (pokus 1#). Údaje ukazujú aj to, že sTNFR-I 3D/N105 je menj aktívny ako vnútorný štandard sTNFR-I 4D/C105.

C. Reaktivačný modelový pokus založený na indukcii bunkovou stenou streptokoka

Reaktivačný modelový pokus artritídy indukovanej bunkovou stenou streptokoka u potkanov sa uskutočňuje podľa známych protokolov (Esser et al. (1985), *Arthritis And Rheumatism*, 28: 1402-1411 a Makarov et al. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 402-406).

Protokol:

Samice potkana Lewis (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA), každá s hmotnosťou 175 a 185 g sa injikujú intraartikulárne do kĺbu na pravom členku suspenziou preparátu bunkovej steny streptokoka s obsahom peptidoglykán-polysacharidu (SCW) (Lee Laboratory, Grayson, GA) v dávke 1,5 mg/10 mg na kĺb. Fyziologický roztok sa injikuje do kontralaterálneho kĺba ako kontrola. Intrartikulárna injekcia SCW spôsobuje akútnu artritídu s relatívne krátkym trvaním s opuchom kĺbu, ktorá vrcholí deň až dva po injekcii. Po dvadsiatich dňoch, v priebehu ktorých doznieva akútna zápalová odpoveď, sa opäť podá vnútrožilne SCW v dávke 200 mg/200mL na potkana. Druhá dávka stačí na reaktiváciu zápalu v tom členkovom kĺbe, do ktorého sa predtým injikoval SCW, ale má malý účinok na členok injikovaný

fyziologickým roztokom. Rozsah zápalu v priebehu 72 hodín po vnútrožilnej injekcii SCW sa stanoví meraním zadného členkového kĺba pomocou členkového meradla (kaliper) v časoch 0, 24, 36, 48 a 72 hodín po reaktivácii artritídy, potom sa zadný kontralaterálny článok odoberie na histologické vyšetrenie (napr. zápal, vytvorenie pannusu, poškodenie chrupavky a kosti).

Výsledky:

Účinky podania sTNFR-I 2,6D/C106db na vývoj kĺbového opuchu počas reaktivácie artritídy sa testujú. Inhibítor a slepá vzorka sa podáva každý v jednej vnútrožilnej injekcii 24 hodín pred reaktiváciou pomocou SCW.

sTNFR-I 2,6D/C106db vykazuje štatisticky významnú účinnosť v redukcii opuchu kĺba, dokázanú analýzou rozptylu (ANOVA) vo Fisherovom post-hoc teste (Statview^R), vo všetkých štyroch dávkach podaných dva alebo tri dni po reaktivácii a vo všetkých dávkach s výnimkou jednej (1,5 mg/kg) podaných prvý deň. Táto redukcia opuchu je porovnateľná s pozitívnou kontrolou sTNFR-I 4D/C105db podávanou denne v dávke 0,5 mg/kg (t.j. 8,8 nM) v časovom rozmedzí od prvého dňa pred reaktiváciou do tretieho dňa po reaktivácii. Preparáty sTNFR vykazujú významnú účinnosť aj vtedy, ak hodnotíme rozsah opuchu ako celok v priebehu troch dní. Plocha vymedzená krivkou (AUC) má charakter závislosti odpovede od dávky pri všetkých dávkach (viď obr. 9, sTNFR-I 2,6D/C106db je označený „sTNFR-I 2,6D“ a sTNFR-I 4D/C105db je označený „sTNFR-I 4D“).

sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33kDa) ukazuje významnú redukciu v šírke kĺba a histologických indexoch v porovnaní s kontrolnou skupinou choroby v modelovom pokuse.

D. Modelový pokus s použitím D-galaktozamín/lipopolysacharidu

D-Galaktozamín(D-GalNH₂)/lipopolysacharid (LPS), model (Parmely et al. (1993), viď vyššie) je modelový pokus *in vivo* založený na zvieracej letalite závislej od TNF- α . Okrem toho bola u autoimúnnych myší MRL-*lpr/lpr* dokázaná extrémna citlivosť na TNF- α indukovaný LPS alebo SEB (Mountz et al. (1995), *J. Immunol.*, 155: 4829-4837).

Protokol:

U 6- až 8-týždňových myších samíc (MRL -*lpr/lpr*) (Jakckson Laboratory, Bar Harbor, ME) sa po nočnom hladovaní vyvolá I. P. reakcia pomocou nasledovných farmakologických preparátov: 25 mg D-GalNH₂ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suspendovaný v Hanksovom balancovanom roztoku solí (Gibco Laboratories, Inc., Grand Island, NY) (50 mg/mL); lipopolysacharid (LPS) z *E. coli* sérotyp 0127:B8 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) v sterilnom médiu PBS zbavenom endotoxínu (25 mg/myš); alebo SEB (Toxin Technologies, Sarasota, FL) v bežnom fyziologickom roztoku (50 mg/myš). Rôzne formy sTNFR sa podávajú v postupnom dvojnásobnom riedení (dávky v mg/kg) tak, aby sa získala krivka ED₅₀ pomocou štatistického software od firmy MacIntosh (Stat-view^R, Mountain View, CA). Letalita sa sleduje v priebehu 48 hodín po vyvolaní I. P. reakcie.

Výsledky:

Tabuľka 4 ukazuje, že ak sa sTNFR-I 2,6D/C106db podá tak, ako sa opísalo vyššie, 1 hodinu pred podaním LPS/DGalNH₂, ED₅₀ (t.j. dávka sTNFR-I 2,6D/C106db nutná na záchranu 50 % myší) v čase 48 hodín je ~50 µg/kg (N=8 myší). V porovnaní s sTNFR-I 4D/C105db nie je žiadny významný rozdiel ($P > 0,05$) v schopnosti tejto formy zabraňovať letalite (ED₅₀ = ~50 µg/kg; N=8 myší).

TAB. 4: Porovnanie sTNFR a optimalizovaných foriem sTNFR v modelovom pokuse LPS/D-GalNH₂

Preparát	ED ₁₀₀	ED ₅₀
sTNFR-I 4D/C105db	~100 µg/kg	~50 µg/kg
sTNFR-I 2,6D/C106db	~100 µg/kg	~50 µg/kg
sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa)	~2 mg/kg	~400 µg/kg
sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG(20 kDa)	~800-1000 µg/kg	~1 mg/kg
sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (20 kDa rozvetvený)	2 mg/kg	~1-1,5 mg/kg
sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (40 kDa rozvetvený)	1,5 mg/kg	~1 mg/kg

Uvedené údaje ukazujú, že sTNFR-I 2,6D/C106db má rovnakú aktivitu ako sTNFR-I 4D/C105db, avšak sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG (33kDa) je v tomto modelovom pokuse menej aktívny (ED₅₀ je asi 400 µg/kg n = 5 myší). Aj aktivity sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (20 kDa rozvetvený) a 2,6D/N105-MePEG (40 kDa rozvetvený) sú v tomto pokuse nižšie.

E. Pokusný model artritídy indukovanej pomocou adjuvans:

Reumatoidná artritída indukovaná u potkanov pomocou adjuvans sa v mnohom podobá reumatoidnej artritíde u ľudí. Účelom tohto pokusu je demonštrovať, že systémové podanie skrátených foriem sTNFR má zmierňujúci účinok v patogenéze artritídy vyvolanej pomocou adjuvans u myší.

Protokol:

Samce potkana Lewis (5 až 7 v skupine) (Charles Laboratories, Inc., Wilmington, MA) s hmotnosťou najmenej 200 g sa kanylujú katétrom SQ a nechajú zotaviť niekoľko dní. Potom sa umiestnia v infúzných klietkach, kde si zvykajú týždeň pred začiatkom infúzií.

V deň 0 sa všetky potkany injikujú 100 µl Freundovho kompletného adjuvans (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), ku ktorému sa pridalo syntetické adjuvans N,N-dioktyldecyldecyl-N',N-bis-(2-hydroxyetyl)propándiamín, 50 mg/ml. Osmý deň sa rôznym skupinám potkanov podáva SQ kontinuálna infúzia sTNFR-I 4D/C105 a sTNFR-I 2,6D/N105.

Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 5.

TAB. 5: Artritída indukovaná pomocou adjuvans

Látka	Dávka	AUC%	Hmotnosť tlapky	Zápal	Res. Kosti
				Histopatológia	
	(mg /kg/hod)	(% Inh.)	(% Inh.)	(% Inh.)	(% Inh.)
Štúdiu # 1					
sTNFR-I 4D/C105	5	61	46	37	89
"	1	49	45	26	855
	0,2	33	40	14	34
sTNFR-I 2,6D/N105	1	55	53	33	51
Štúdiu # 2					
sTNFR-I 2,6D/N105	5	42	ND	19	67
	1	38	ND	13	49
Štúdiu # 3					
sTNFR-I 2,6D/N105	9	50	40	13	27
- MePEG(20 kDa)	3	35	34	9	22
	1	36	30	0	0
sTNFR-I 2,6D/N105	9	43	37		
MePEG(33 kDa)	3	38	33		
	1	24	20		

Formy sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG (33 kDa) a sTNFR-I 4D/C105db majú napodiv v prípade artritídy vyvolanej pomocou adjuvans u potkanov Lewis navzájom porovnateľnú antiartritickú aktivitu, aj keď sTNFR-I 4D/C105db je účinnejší v cytotoxických testoch WEHI - 164 a L929 *in vitro*, ako aj v pokusnom modeli LPS/GalN.

F. Artritída indukovaná kolagénom

Artritída indukovaná kolagénom II u potkanov veľmi pripomína reumatoidnú artritídu u ľudí. Účelom tohto pokusu je demonštrovať, že systémové podanie skrátených foriem sTNFR má zmierňujúci účinok v patogenéze artritídy vyvolanej kolagénom typu II u potkanov a myší.

Protokol pre potkany:

Samiciam potkana (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA) sa implantovali kanyly SQ, potkany si privykali na upútanie v priebehu kontinuálnej infúzie. Potom sa imunizujú kravským kolagénom typu II vo Freundovom kompletnom adjuvans. 13., 14 alebo 15. deň po imunizácii sa zvieratá s rozvinutou artritídou náhodne rozdelia do skupín po osem jedincov. Infúzia rôznych dávok sTNFR-I alebo slepej vzorky sa podáva pokusným skupinám sedem dní tak, ako sa opisuje v tab. 6. Zápal v tlapke sa hodnotí denným meraním členkových kĺbov špeciálnym meradlom (kaliper). Siedmy deň sa zvieratá šetrne zabijú a tlapky sa odoberú na určenie hmotnosti, ktorá slúži ako index zápalu. Členkové a kolenné kĺby sa odoberú na histopatologické posúdenie parametrov artritídy.

Výsledky sa uvádzajú v tab. 6A.

TAB. 6A: Artritída indukovaná kolagénom

Látka	Dávka	AUC%	Hmotnosť tlapky	Zápal	Res. Kosti
				Histopatológia	
	(mg /kg/hod)	(% Inh.)	(% Inh.)	(% Inh.)	(% Inh.)
Štúdiu # 1					
sTNFR-I 4D/C105	5	65	81	ND	ND
	1	35	34	ND	ND
	0,2	19	22	ND	ND
sTNFR-I 2,6D/N105	1	39	41	ND	ND
	(mg /kg/hod)				
Štúdiu # 2					
sTNFR-I 2,6D/N105	3	50	60	76	46
MePEG(33 kDa)					
Štúdiu # 3					
sTNFR-I 2,6D/N105	9	25	44	ND	ND
MePEG(33 kDa)					
sTNFR-I 2,6D/N105	3	25	37	ND	ND
MePEG(33 kDa)					
sTNFR-I 2,6D/N105	9	35	52	ND	ND
MePEG(20 kDa)					
sTNFR-I 2,6D/N105	3	35	37	ND	ND
MePEG(20 kDa)					

Je zaujímavé, že v prípade artrózy indukovanej kolagénom je účinnosť vo všetkých liečených skupinách približne rovnaká (napr. tvar krivky, podiel inhibície plochy vymedzenej krivkou (AUC) v rozpätí 30 až 59 %, inhibícia hmotnosti tlapky v rozpätí 40 až 64 %). Skupina, ktorá nebola liečená, sa štatisticky významne odlišuje od všetkých ostatných skupín pri tomto modeli artritídy.

Protokol pre myši:

Samce DBA/1 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) sa imunizujú kravským kolagénom typu II (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) vo Freundovom nekompletnom adjuvans. 24., 25 a 26. deň po imunizácii sa zvieratá s rozvinutou artritídou náhodne rozdelia do skupín s ôsmimi zvieratami. Jedincom v pokusných skupinách sa podáva dvakrát denne IP cestou fyziologický roztok alebo sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (33 kDa) tri dni za sebou (dni +27, +28 , +29). Zápal v tlapke sa hodnotí denným meraním členkových kĺbov špeciálnym meradlom (kaliper). 34. deň sa zvieratá šetrne usmrtia a tlapky sa odoberú na určenie hmotností, ktorá slúži ako index zápalu. Členkové a kolenné kĺby sa odoberú na histopatologické posúdenie parametrov artritídy.

Výsledky sú zhrnuté v tab. 6B.

TAB. 6B: Artritída indukovaná kolagénom

Látka	Dávka (mg/kg 2D)	AUC ₃ (% Inh.)	Celková histopatológia (% Inh.)
Štúdio # 1			
sTNFR-I 4D/C105db	3	49	39
sTNFR-I 4D/N105	3	63	55
-t-BuPEG(33 kDa)			
Štúdio # 2			
sTNFR-I 2,6D/N105-	9	73	ND
MePEG(33 kDa)			
sTNFR-I 2,6D/N105-	3	75	ND
MePEG(33 kDa)			

G. Produkcia TNF- α indukovaného LPS ovplyvnená konti-
nuálnou infúziou u potkanov:

sTNFR-I 2,6D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C106db, sTNFR-I 2,6D/N105 a sTNFR-I 4D/N105 sa podávajú IV do krčnej žily pomocou AlzetTM minipump (Alza Corp., Palo Alto, CA) podľa návodu výrobcu v priebehu 48-hodinovej infúzie (1 mg/kg). Hladiny TNF- α v sére merané testom ELISA (Genzyme, Cambridge, MA) sú významne znížené v porovnaní s kontrolami +2 hodiny po podaní LPS.

Príklad III: Imunogénna štúdia

Imunogénnosť rôznych foriem skráteného rekombinantného rozpustného sTNFR-I sa stanoví u niekoľkých zvieracích modelov.

A. Hlodavce

sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG (33 kDa) a sTNFR-I 4D/C105db sa subkutánne podávajú (4 mg/kg) prvý a piaty pokusný deň samiciam potkana Sprague Dawley (Charles River Labs, Inc., Wilmington, MA) (n = 6 až 8 v skupine). Vzorky krvi sa odoberajú týždenne do 21. dňa po začiatku pokusu. Vo vzorkách sa stanoví produkcia IgM a IgG protilátok.

TAB. 7: Imunogénnosť u hlodavcov

Čas [dni]	0,01	7	14	21
SKUPINA+ZVIERA	Titer IgM	Titer IgM	Titer IgM	Titer IgM
sTNFR-I 2,6D/N105- 33 kDaPEG				
1	NEG	0	0	0
2	NEG	0	0	0
3	NEG	0	0	0
4	NEG	0	0	0
6	NEG	0	0	0
sTNFR-I 2,6D/N105- t-BuPEG (33 kDa)	0	0,00	0,00	0,00
SEM	0	0,00	0,00	0,00

Čas [dni]	0,01	7	14	21
SKUPINA+ZVIERA	Titer IgM	Titer IgM	Titer IgM	Titer IgM
Kontrola				
7	0	0	50	0
8	0	0	50	0
3	0	0	100	0
9	0	0	0	0
10	0	0	100	50
11	0	0	100	0
12	0	0	100	0
13	0	0	0	0
Kontrola	0	0	62,5	6,3
SEM	0	0	15,7	6,3
sTNFR-I 2,6D/N105- t-BuPEG (33 kDa)				
1	NEG	NEG	0	0
2	NEG	NEG	0	0
3	NEG	NEG	0	0
4	NEG	NEG	0	0
6	NEG	NEG	0	0
sTNFR-I 2,6D/N105- t-BuPEG (33 kDa)	0,00	0,00	0,00	0,00
SEM	0,00	0,00	0,00	0,00
Kontrola				
7	NEG	NEG	0	200
8	NEG	NEG	0	200
9	NEG	NEG	0	0
10	NEG	NEG	0	0
11	NEG	NEG	200	400
12	NEG	NEG	0	200
13	NEG	NEG	200	800
14	NEG	NEG	0	50
Kontrola	0	0	50	231,3
SEM	0	0	32,7	94,0

Z tabuľky je 7 vidno, že sTNFR-I 4D/C105db podaný subkutánne (SC) 1. a 5. deň poskytuje vyššie titre potkaních anti-sTNFR-I IgG protilátok do 21. dňa ako sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG (33 kDa), ktorý má takmer nulové titre protilátok. Podobné trendy imunogénnosti sa pozorujú aj v prípade potkanov produkujúcich anti-sTNFR-I IgM protilátky do 21. dňa. sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG (33 kDa) nevyvoláva tvorbu potkaních anti-sTNFR-I IgM protilátok do 21. dňa.

B. *Papio anubis*

Náplňou fázy A časti tejto štúdie je stanovenie farmakokinetiky a imunogénnosti sTNFR-I 2,6D/C105db (0,2 mg/kg živej hmotnosti (BW)), sTNFR-I 3D/C105db (0,2 mg/kg BW) a sTNFR-I 2,6/C105db (0,2 mg/kg BW), ktoré sa podávajú dvakrát IV zdravému paviánovi v 21-dňovom intervale.

Časť 1 je rozdelená do dvoch fáz. Cieľom fázy A je stanovenie farmakokinetiky a imunogénnosti rôznych preparátov sTNFR-I u zdravého paviána v odpovedi na dve aplikácie. Dvanásť paviánov sa rozdelí do troch skupín. Jedince každej skupiny dostávajú v anestézii 0,2 mg/kg BW sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 3D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C105db. Tri paviány sa študujú v priebehu jedného pokusu. Zvieratá sa sledujú 21 dní, potom dostávajú druhú identickú IV aplikáciu proteínu a študujú sa ďalších 21 dní. Farmakokinetika a imunogénnosť sa potom stanovujú v intervaloch.

Cieľom fázy B tejto štúdie je určenie účinnosti týchto preparátov na dobre preskúmanom modeli letality spôsobenej TNF- α (Espat et al., *J. Surg. Res.*, 59: 153-158, 1995). U 16 zvierat rozdelených do skupín po 4 sa indukuje letálna *E. coli* bakterémia podaním 5 až 10 x 10¹⁰ cfu/kg živej hmotnosti. Skupina, ktorá dostala placebo, sa porovnáva s paviánmi, ktoré boli vopred IV injikované sTNFR-I 4D/C105db

(0,2 mg/kg živej hmotnosti), sTNFR-I 3D/C105db (0,2 mg/kg [BW]) a sTNFR-I 2,6D/C105db (1 mg/kg BW).

V obidvoch fázach štúdie 1 sa mladé dospelé paviány *Papio anubis*, samce aj samice (6 až 11 kg), (Biomedical Research Foundation, San Antonio, TX) ponechajú cez noc hladovať. Anestézia zvierat sa uskutoční ketamínom (10 mg/kg i.m.) a žila na hlave sa perkutánne kanyluje. Anestézia sa udržiava prvotným podaním až 35 mg/kg pentobarbitálu sodného, potom nasledujú opakované injekcie 3 až 5 mg/kg/hod pentobarbitálu sodného. Horné cesty dýchacie sa poistia umiestnením endotracheálnej trubice s manžetou, zvieratá dýchajú spontánne. Do stehennej tepny sa umiestni perkutánne katéter umožňujúci opakovaný odber arteriálnych krvných vzoriek ako aj súvislé sledovanie činnosti srdca a stredný arteriálny krvný tlak pomocou monitora anestézie a srdcovej činnosti Datascope 2000 (Datascope, San Antonio, TX). Vzorky krvi z artérie sa odoberajú v intervaloch, po pridaní EDTA alebo heparínu na zamedzenie zrážania sa ihneď po odbere ochladia na ľade. Frakcia krvnej plazmy sa oddelí centrifugáciou pri 4 °C a uloží pri -70 °až do okamihu analýzy. Vnútoraná telesná teplota sa sleduje rektálnou sondou. Nenapučiavajúci Foleyho katéter sa umiestni do močovej rúry, aby bol možné sledovať výdaj moču a vylučovanie kreatinínu. Každých 15 minút sa sledujú hemodynamické parametre. Všetky zvieratá dostanú 0,9% chlorid sodný (4 ml/kg) na udržanie i.v. tekutín. Počas fáze B pokusu dostávajú zvieratá ďalšiu tekutinu (10 ml/kg každých 15 minút), ak sú splnené dve z nasledovných fyziologických kritérií: 1) stredný arteriálny tlak klesne o viac ako 30 %; 2) tepová frekvencia sa zvýši o viac ako 30 %; 3) výdaj moču klesne na menej ako 1 ml/kg/hod. Po odbere krvných vzoriek reprezentujúcich základné hodnoty a po najmenej hodinu trvajúcim období pokoja na ekvilibráciu začína infúzia proteínov.

Počas fáze A tejto štúdie sa na infúziu rekombinantných proteínov využije cefalická vena, zvieratá sa sledujú osem hodín, potom sa všetky katétre odstránia a zvieratá sa vrátia do svojich kliebok na 21 dní. Po 24 a 48 hodinách a 3., 5., 8., 11., 16. a 21. deň sa u zvierat uskutoční ľahká anestézia IM ketamínom (10 mg/kg) a odoberú vzorky žilnej krvi. 21. deň sa uskutoční nová anestézia, podá druhá aplikácia proteínu a celý postup, ako bol vyššie opísaný, sa odo dňa nula opakuje ďalších 21 dní. Po tomto čase sa zvieratá šetrne usmrtia.

Počas fáze B tejto štúdie sa jednu hodinu pred infúziou *E. coli* náhodne vyberú 4 zvieratá, ktoré dostávajú placebo alebo jeden z vyššie uvedených rekombinantných preparátov. Zvieratá sa sledujú osem hodín, potom sa všetky katétre odstránia, zvieratá sa vrátia do kliebok a pozoruje sa prípadné prežívanie letálnej bakterémie. Zvieratá, ktoré nadmerne trpia, sa šetrne usmrtia. Nadmerné utrpenie definuje IACUC takto: 1) neschopnosť stáť alebo sedieť 12 hodín, 2) neschopnosť prijímať potravu alebo vodu 12 hodín, 3) nezávratelné krvácanie z miest, kde boli katétre alebo 4) neodpovedavosť na vonkajšie podnety. Vzorky žilnej krvi sa odoberajú v časoch -1, 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 hodín, 48 hodín a v dňoch 3,5, 8, 11, 16 a 21. 21. deň sa zvieratá, ktoré do tohto času prežijú, šetrne usmrtia.

Prítomnosť *Papio* protilátok proti podaným rekombinantným proteínom sa určuje pomocou testu ELISA sandwich. Stručne opísané, doštičky ELISA sa potiahnu preparátmi sTNFR-1 (1 µg/ml), potom sa pridá riedená (1:50 až 1:100 000) plazma pavánov (100 µL). Po premytí vzoriek sa pridá konjugát chrenovej peroxidázy a proteínu A (0,5 µg/ml), reakcia sa vizualizuje pomocou TMB.

Výsledky (Časť I):

Tri rekombinantné preparáty sa významne odlišovali polčasom pretrvania v plazme. Krivky opisujúce vymiznutie sa stanovia metódou nezávislou od modelu, polčasy sa všeobecne hodnotia medzi 8 a 172 hodinami. U zvierat vstupujúcich do pokusu je polčas pretrvania v plazme najdlhší u paviánov, ktoré dostali 4 doménový preparát (29 hod) a postupne klesá u paviánov, ktorým sa podal sTNFR-I 3D/C105db (24,7 hod) a sTNFR-I 2,6D/C105db (21,5 hod). Rozdiel, aj keď štatistický významný, je len 26 %. Po druhom podaní proteínov príslušným paviánom majú polčasy pretrvania v plazme neočakávanú tendenciu k výraznému skráteniu, čo naznačuje rýchlejšie vylučovanie. Táto redukcia polčasov je najvýraznejšia u paviánov ovplyvnených sTNFR-I 4D/C105db, u ktorých sú polčasy kratšie o 48 % ($p < 0,01$) [obr. 10]. Stredná redukcia polčasov je u paviánov ovplyvnených sTNFR-I 3D/C105db (31 %) [obr. 11] a najmenší u zvierat, ktorý sa podal sTNFR-I 2,6D/C105db (14 %) [obr. 12]. U paviánov, ktoré dostali sTNFR-I 2,6D/C105db, nie sú redukcie polčasov štatisticky odlišné.

Všetky preparáty sú u paviánov imunogénne. Avšak najvyššia hodnota imunogénnosti sa zistila u paviánov ovplyvnených sTNFR-I 4D/C105db, stredná u zvierat ovplyvnených sTNFR-I 3D/C105db a najnižšia u zvierat, ktorým sa podal sTNFR-I 2,6D/C105db (tab. 8).

TAB. 8: Vrcholy protilátkovej odpovede

	Prvých 21 dní		Druhých 21 dní	
	Medián	25%-75%	Medián	25%-75%
sTNFR-I 4D/C105db (n=4)	3,20	3,20 3,20	3,95	3,50 4,40
sTNFR-I 3D/C105db (n=4)	1,60	0,00 3,65	3,50	1,30 4,75
sTNFR-I 2,6D/C105db (n=4)	0,00*	0,00 1,75	1,40	0,00 3,50

¹ logaritmické meradlo (prevrátená hodnota riedenia plazmy potrebná na dosiahnutie polovice maxima absorbancie v teste ELISA sandwich, viď *Experimentálne metódy*)

* $p=0,056$, stanovené podľa Kruskal-Wallis dvojparametrový ANOVA (hodnoty vyjadrené logaritmicky neboli použiteľné v normálnom rozložení)

Protilátková odpoveď sa všeobecne rozvíja okolo ôsmeho dňa po podaní rekombinantného preparátu a je prítomná 21 dní. Protilátková odpoveď sa stáva silnejšou po druhej aplikácii rekombinantného proteínu.

Všetky štyri paviány, ktoré dostali sTNFR-I 4D/C105db tvoria protilátky, dve zo štyroch zvierat, ktorým sa podal sTNFR-I 3D/C105db a jeden zo štyroch paviánov, ktorým sa podal sTNFR-I 2,6D/C105db, tvoria protilátky. Veľkosť protilátkovej odpovede (vyjadrená logaritmicky) podľa Kruskal-Wallis ANOVA sa významne líši medzi tromi skupinami ako funkcia času ($p<0,05$). Post-hoc analýza naznačuje, že významný rozdiel v protilátkovej odpovedi je predovšetkým

medzi zvieratami, ktoré dostali sTNFR-I 4D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C105db so strednými (a nevýznamnými) odpoveďami u zvierat, ktorým sa podal sTNFR-I 3D/C105db.

Pozoruje sa korelácia medzi tvorbou protilátok a zmenou vo vylučovaní medzi obidvoma 21-dennými štúdiami ($p < 0,01$). U zvierat so silnou odpoveďou na prvé podanie rekombinantného preparátu sa podľa očakávania proteín po druhom podaní rýchlejšie vylučuje. Zmena vo vylučovaní po prvej a druhej aplikácii sa porovnáva u zvierat, ktoré vykázali protilátkovú odpoveď ($n=7$) a ktoré nie ($n=5$) [obr. 13].

Priamam toxicita na bunkovej línii ME-180 a neutralizačná kapacita v teste L-929 sa hodnotila pri protilátkach nájdených v plazme paviánov pri vybranom počte zvierat. Žiadna toxicita ani neutralizácia pri protilátkach proti trom skúmaným rekombinantným proteínom nebola zistená.

Ako sa dokázalo v priebehu A fázy štúdia paviánov, zvieratá, ktoré rozvíjajú najsilnejšiu protilátkovú odpoveď, vykazujú najrýchlejšie zvýšenie vo vylučovaní rekombinantného preparátu po jeho druhom podaní. Také zistenia naznačujú, že protilátková odpoveď môže skrátiť biologický polčas, a teda aj terapeutickú účinnosť rekombinantného preparátu, a preto sa môže vyžadovať úprava dávky. Nezdá sa však dokázaná akákoľvek nepriaznivá klinická odpoveď na prítomnosť protilátok po druhom podaní rekombinantného preparátu. Terapeutické úsilie zamerané na modifikácie rekombinantného preparátu, ktoré by znížili imunogénnosť a významne neovplyvnili polčas účinnosti, smerujú primárne k obmedzeniu potreby zvýšiť dávku, nie však k zníženiu rizika nepriaznivej klinickej reakcie.

Výsledky - časť 1, fáza B:

Na záver možno konštatovať, že všetky tri rekombinantné preparáty sú takmer rovnako účinné pri doteraz nedotknutých zvieratách a zabraňujú poškodeniu spôsobenému cytokínmi počas bakterémie *E. coli*, ak sa podávajú v dávke 1,0 mg/kg BW. Prežil jeden zo štyroch paviánov, ktoré dostali placebo, ďalej prežili 4 zo 4 paviánov liečených sTNFR-I 4D/C105db alebo sTNFR-I 3D/C105db a 3 zo 4 paviánov liečených sTNFR-I 2,6D/C105db. Všetky tri rekombinantné preparáty zabraňujú biologickej aktivite TNF α a majú dostatočnú neutralizačnú kapacitu.

Časť II:

Cieľom časti II štúdie u paviánov je rozhodnúť, či má opakovaná expozícia zvierat (t.j. 3 oddelené aplikácie) k rôznym sTNFR-I proteínom za následok zvýšenú imunogénnosť a znížený polčas. Ďalej má táto štúdia porovnať imunogénnosť a farmakokinetiku niekoľkých sTNFR-I preparátov vrátane sTNFR-I 4D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C105db, ďalej sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa). Napokon je táto štúdia zameraná na zhodnotenie klinického významu protilátkovej odpovede a zmeneného vylučovania na následnú odpoveď na poškodenie spôsobené TNF α (*E. coli* bakterémia).

V dňoch 0, 21 a 42 sa paviánom podajú IV (0,2 mg/kg) rôzne rekombinantné proteíny (sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 2,6D/C105db, sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa). 63. deň dostávajú paviány 2,0 mg/kg BW príslušného proteínu. 65. deň (t.j. o 48 hodín neskôršie) sa paviánom podá letálna dávka *E. coli*, ako sa opísalo vyššie v časti I. Hlavné poznatky časti II sú nasledovné.

Výsledky (časť II):

U nedotknutých paviánov majú sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) všeobecne dlhšie polčasy ako sTNFR-I 4D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C105db bez ohľadu na počet domén. Dĺžka polčasu je v rozmedzí 30 až 35 hodín pri monopegylovaných formách sTNFR-I na rozdiel od 10 až 20 hodín pri dimérnych pegylovaných formách. Navyše majú sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 4D/C105db dlhšie polčasy ako sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 2,6D/C105db.

sTNFR-I 4D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C105db sú tiež imuno-génne, s miernym trendom k nižšej imunogénnosti u sTNFR-I 2,6D/C105db. Avšak len sTNFR-I 4D/C105db sa menej vylučuje po opakovanom podávaní. sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) nie sú ani antigénne, ani sa nemení významne ich rýchlosť vylučovania po opakovanom podávaní.

In vitro imunoreaktivita (ELISA sandwich capture) k iným rekombinantným proteínom v sére odobranom každému paviánovi (N=3) 21., 42. a 61. deň sa stanoví pomocou odlišného rekombinantného proteínu použitého ako záchytný (capture) antigén. Napríklad sérum z paviánov, ktorým sa podal sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) 21. deň (tab. 9) „nereaguje“ s sTNFR-I 4D/C105db ani s sTNFR-I 4D/N105 použitými ako záchytné (capture) antigény na doštičke ELISA.

Za pozitívnu sa pokladá protilátková odpoveď s titrom >1:400. Údaje zo 42. a 61. dňa sú zhrnuté v tab. 10 a 11. Za dôležitý sa považuje fakt, že sérum z 1 paviána, ktorému sa podal sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa), dávalo pozitívnu *in vitro* reakciu pri testovaní s sTNFR-I 4D/C105db záchytným (capture) antigénom (tab. 11).

Za pozitívnu sa pokladá protilátková odpoveď s titrom >1:400. Údaje zo 42. a 61. dňa sú zhrnuté v tab. 10 a 11. Za dôležitý sa považuje fakt, že sérum z 1 paviána, ktorému sa podal sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa), dávalo pozitívnu in vitro reakciu pri testovaní s sTNFR-I 4D/C105db záchytným (capture) antigénom.

Podľa účinnosti prevencie poškodenia spôsobeného TNF α u paviánov, ktorým sa trikrát podal rekombinantný preparát, možno zoradiť proteíny počínajúc najúčinnnejším takto: (1) sTNFR-I 4D/C105db, (2) sTNFR-I 2,6D/C105db, (3) sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a (4) sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) (stanovené na základe prežívania, systémového zlyhania orgánov (MSOF), IL-6 a bielych krviniek (WBC) v sére. Nedostatkom tejto štúdie je fakt, že nebrala do úvahy rozdiely v schopnosti rôznych rekombinantných proteínov neutralizovať TNF.

Tabuľka 9

Imunitná reakcia paviánov

I_gG (≥ 1:400 titer) Deň 21

Počet zvierat : n=3	STNFR-I 2.6D/C105db	STNFR-I 2.6D/N105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/N105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/C105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/C105db	STNFR-I 4D/N105
STNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa)		3/3 neg			3/3 neg	3/3 neg
STNFR-I 2.6D/C105db	3/3 neg				3/3 neg	3/3 neg
STNFR-I 4D/N105-t-BuPEG (33kDa)			3/3 neg		3/3 neg	3/3 neg
STNFR-I 4D/C105-t-BuPEG (33kDa)						
STNFR-I 4D/C105db					1/3 reag. (400)	3/3 neg

Tabuľka 10
Imunitná reakcia paviánov
I_gG (≥ 1:400 titer) Deň 42

Počet zvierat: n=3	STNFR-I 2.6D/C105db	STNFR-I 2.6D/N105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/N105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/C105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/C105db	STNFR-I 4D/N105
STNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa)		3/3 neg			3/3 neg	3/3 neg
STNFR-I 2.6D/C105db	1/3 reag. (1600)				3/3 neg	3/3 neg
STNFR-I 4D/N105-t-BuPEG (33kDa)			3/3 neg		3/3 neg	3/3 neg
STNFR-I 4D/C105-t-BuPEG (33kDa)						
STNFR-I 4D/C105db					2/3 reag. (3200)	2/3 reag. (800)

Tabuľka 11

Imunitná reakcia paviánov

I₉G (≥ 1:400 titer) Deň 61

Počet zvierat n=3	STNFR-I 2.6D/C105db	STNFR-I 2.6D/N105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/N105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/C105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/C105db	STNFR-I 4D/N105
STNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa)		3/3 neg			1/3 reag. (1600)	3/3 neg
STNFR-I 2.6D/C105db	2/3 reag. (204800)				1/3 reag. (1600)	1/3 reag. (3200)
STNFR-I 4D/N105-t-BuPEG (33kDa)			3/3 neg		1/3 reag. (6400)	1/3 reag. (6400)
STNFR-I 4D/C105-t-BuPEG (33kDa)						
STNFR-I 4D/C105db					1/3 reag. (6400)	3/3 reag. (12800)

C. Šimpanz

Cieľom tejto štúdie je stanoviť imunogénnosť rôznych foriem sTNFR-I, ktoré sa opakovane injikujú I.V. cestou šimpanzom v priebehu 1 mesiaca. Testujú sa nasledovné formy sTNFR-I: sTNFR-I 2,6D/C105db, sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33 kDa), sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa). V jednej pokusnej skupine sú celkom tri šimpanzy.

Dávkovací režim a parametre tejto štúdie sú nasledovné: Každý šimpanz dostáva pokusnú vzorku v podobe intravenózneho injekcie (0,1 mg/kg) dvakrát týždenne v pondelok a v piatok štyri týždne (celkom 8 dávok). Objem dávky sa mení v závislosti od koncentrácie podávanej vzorky. 5 ml séra sa odoberie každému zvieraťu v deň 0 pred začiatkom pokusu. Ďalšie vzorky séra sa odoberajú tesne pred podaním preparátu 7., 14., 21. a 28. deň.

Základné údaje o imunogénnosti u šimpanza sú uvedené v tab. 12.

Do 28. dňa sa pri všetkých zvieratách (N=3), ktorým sa podával sTNFR-I 4D/C105db alebo sTNFR-I 2,6D/C105db, zaznamená pozitívna reakcia (stanovené testom ELISA), najvyššie namerané titry sú 1:12 800 a 1:3200 (tab. 12). (Poznámka: V tejto časti pokusu sa všetky „imunizačné“ antigény použijú ako príslušné zachytané (capture) antigény imobilizované na doštičke ELISA). Jedno zviera imunizované sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa) má pozitívnu protilátkovú reakciu 21. a 28. deň (tab. 12). Je dôležité, že u žiadnych zvierat imunizovaných počas tohto pokusu sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33 kDa) alebo sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) sa nepozorovala tvorba anti-sTNFR-I protilátok (tab. 12).

Sérum odobrané 28. deň všetkým šimpanzom (N=3) imunizovaným rôznymi formami sTNFR sa testuje na *in vitro* imuno-

reaktivitu proti iným rekombinantným proteínom sTNFR-I použitým ako záchytné (capture) antigény v teste ELISA, ako sa opísalo vyššie v pokusoch s paviánmi. Pozitívnou reakciou je protilátková odpoveď s titrom vyšším ako 1:400. Je významné, že sérum zo šimpanzov, ktorým sa podával sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) „nereaguje“ s sTNFR-I 4D/C105db ani s sTNFR-I 4D/N105, ak sa tieto proteíny použijú ako záchytné (capture) antigény na doštičke ELISA (tab. 13). To isté sa sleduje pri zvieratách imunizovaných sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33 kDa) a podáva sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa) (tab. 13).

Tabuľka 12

Imunitná reakcia I_gG

Titer (počet šimpanzov)

	Deň 0 (Pre-dávka)	Deň 7 (2 dávky)	Deň 14 (4 dávky)	Deň 21 (6 dávok)	Deň 28 (8 dávok)
STNFR-I 2.6D/C106db			100 (1)	400 (1) 1600 (1) 3200 (1)	800 (1) 3200 (2)
STNFR-I 4D/C105db			3200 (1)	400 (1) 1600 (1)	800 (2) 12800 (1)
STNFR-I 4D/N105-t-BuPEG (33kDa)					
STNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa)					
STNFR-I 4D/N105db-t-BuPEG (33kDa)				200 (1) * 1600 (1)	100 (1) * 400 (1)

* Pozn.: Titer pozorovaný použitím STNFR-I 4D/C105db ako väzbovej protilátky

Tabuľka 13

Imunitné výsledky šimpanzov

I_g (≥ 1:400 titer)

Počet zvierat: n=3	STNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa)	STNFR-I 2.6D/N105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/N105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/C105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/C105db	STNFR-I 4D/N105
STNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa)		3/3 neg			3/3 neg	3/3 neg
STNFR-I 2.6D/C105db	3/3 reag. (3200)				2/3 reag. (3200)	1/3 reag. (400)
STNFR-I 4D/N105-t-BuPEG (33kDa)			3/3 neg		2/3 reag. (1600)	2/3 reag. (3200)
STNFR-I 4D/C105-t-BuPEG (33kDa)				3/3 neg	1/3 reag. (400)	3/3 neg
STNFR-I 4D/C105db					3/3 reag. (12800)	3/3 reag. (6400)

Príklad IV

EAE je akútna alebo chronická recidivujúca zápalová demyelinizujúca choroba CNS, ktorá vzniká ako dôsledok pôsobenia neuroantigénov, ako je napríklad myelínový bázičný proteín (MBP), na geneticky citlivé zvieratá. EAE predstavuje uznávaný a často používaný model akútnej ľudskej MS.

Samice potkana Lewis (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) sa v anestézii imunizujú na chodidle ľavej zadnej končatiny (deň 0) 0,1 ml emulzie obsahujúcej myelínový bázičný proteín (MBP) v kompletnom Freundovom adjuvans rozpustený v PBS s rovnakým objemom kompletného Freundovho adjuvans (CFA) obsahujúceho 5 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco Lab MI). Kontrolným potkanom sa podá 0,1 ml emulzie PBS/CFA bez MBP do chodidla ľavej zadnej končatiny.

Klinické hodnotenie choroby je založené na obvyklom bodovacím systéme 0 až 5. Nasledovné stavy sa priradujú jednotlivým hodnotám: 0, normálny; 0,5, čiastočná strata chvostového tonusu; 1, úplná strata chvostového tonusu; 2, vláčenie jednej zadnej končatiny; 3, paralýza oboch zadných končatín; 4, umieranie; 5, smrť. Injekcie rekombinantných preparátov sTNFR-I alebo slepej vzorky sa podávajú S.C. v dávke 1 mg/kg každý ďalší deň počínajúc dňom 9 po imunizácii. Pokus sa ukončí pri všetkých zvieratách 21. deň. Výsledky sú vyjadrené v dvoch podobách, jednak ako skóre klinickej závažnosti v priebehu času a jednak sa integrované skóre každého potkana v celom priebehu choroby spočíta ako plocha vymedzená krivkou závislosti denného klinického skóre od času. Hodnoty integrovaného klinického skóre liečených skupín sa porovnávajú s hodnotami kontrolnej skupiny pomocou Mannovho-Whitneyho testu.

Zvieratá, ktorý sa podala slepá vzorka, prejavujú začiatok ochorenia okolo desiateho dňa, choroba vrcholila 16. deň a potom ustupovala. sTNFR-I 4D/C106db zmierňuje

klinické príznaky o približne 73 % v porovnaní so zvieratami liečenými slepou vzorkou. sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33 kDa) taktiež zmierňuje klinické príznaky o približne 85 %. sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) sú rovnako účinné v zmierňovaní klinických príznakov (64 a 57 %).

Dá sa uzavrieť, že skrátené formy sTNFR sa zdajú klinicky účinné v tomto zvieracom modeli MS.

Tento vynález bol opísaný vyššie všeobecne aj v podobe doporučených konkrétnych postupov a pokusov. Je však jasné, že odborníci môžu navrhnúť na základe tohto opisu ďalšie variácie a modifikácie.

5' - GATAGTGTGTGTCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAAATAATTGATTGCTGTACC -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 D S V C P Q G K Y I H P Q N N S I C C T -
 -AAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGATACGGAC -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D T D -
 -TGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACACTGCCTC -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C R E C E S G S F T A S E N H L R H C L -
 -AGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTGACAGTGGAC -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 S C S K C R K E M G Q V E I S S C T V D -
 -CGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAAAACCTT -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 R D T V C G C R K N Q Y R H Y W S E N L -
 -TTCCAGTGCTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGCACCTCTCCTGCCAGGAG -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 F Q C F N C S L C L N G T V H L S C Q E -
 -AAACAGAACACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTTCTTTCTAAGAGAAAACGAGTGTGTC -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 K Q N T V C T C H A G F F L R E N E C V -
 -TCCTGTAGTAACTGTAAGAAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCCAGATTGAG -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 S C S N C K K S L E C T K L C L P Q I E -
 -AAT-3'
 +-----
 N *

5' -CATATGGACAGCGTTTGCCCCCAAGGAAAATACATCCACCCTCAAATAATTGATTGTC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M D S V C P Q G K Y I H P Q N N S I C -
 -TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCCGGGCAGGAT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D -
 -ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACAC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 T D C R E C E S G S F T A S E N H L R H -
 -TGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTGACACA-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C L S C S K C R K E M G Q V E I S S C T -
 -GTGGACCGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAA-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V D R D T V C G C R K N Q Y R H Y W S E -
 -AACCTTTTCCAGTGCTTCTGCTGATAGGATCC-3'
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N L F Q C F C *

5' - CATATGGACA GCGTTTGCCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAATAATTCGATTTGC -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M D S V C P Q G K Y I H P Q N N S I C -
 -TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGCAGGAT -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D -
 -ACGGA CTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACAC -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 T D C R E C E S G S F T A S E N H L R H -
 -TGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTGACA -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C L S C S K C R K E M G Q V E I S S C T -
 -GTGGACCGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAA -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V D R D T V C G C R K N Q Y R H Y W S E -
 -AACCTTTTCCAGTGCTTCAATTGCTCTCTGTAAAAGCTT - 3'
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N L F Q C F N C S L *

5' - CATATGGACAGCGTTTGCCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAATAATTGATTGTC -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M D S V C P Q G K Y I H P Q N N S I C -
 -TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGAT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D -
 -ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACAC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 T D C R E C E S G S F T A S E N H L R H -
 -TGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTGACACA-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C L S C S K C R K E M G Q V E I S S C T -
 -GTGGACCGGGACACCGTGTGTGGTTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAA-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V D R D T V C G C R K N Q Y R H Y W S E -
 -AACCTTTTCCAGTGCTTCAATTAATAGGGATCC-3'
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N L F Q C F N *

5' -CATATGTATATCCACCCTCAAAATAATTCGATTTGCTGTACCAAGTGCCACAAAGGAACC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M Y I H P Q N N S I C C T K C H K G T -
 -TACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGATACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Y L Y N D C P G P G Q D T D C R E C E S -
 -GGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACACTGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGA-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 G S F T A S E N H L R H C L S C S K C R -
 -AAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTGCACAGTGGACCGGGACACCGTGTGTGGC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 K E M G Q V E I S S C T V D R D F V C G -
 -TGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAAAACCTTTCCAGTGCTTCAATTGC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C R K N Q Y R H Y W S E N L F Q C F N C -
 -TCTCTGTAAAAGCTT-3'
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 S L *

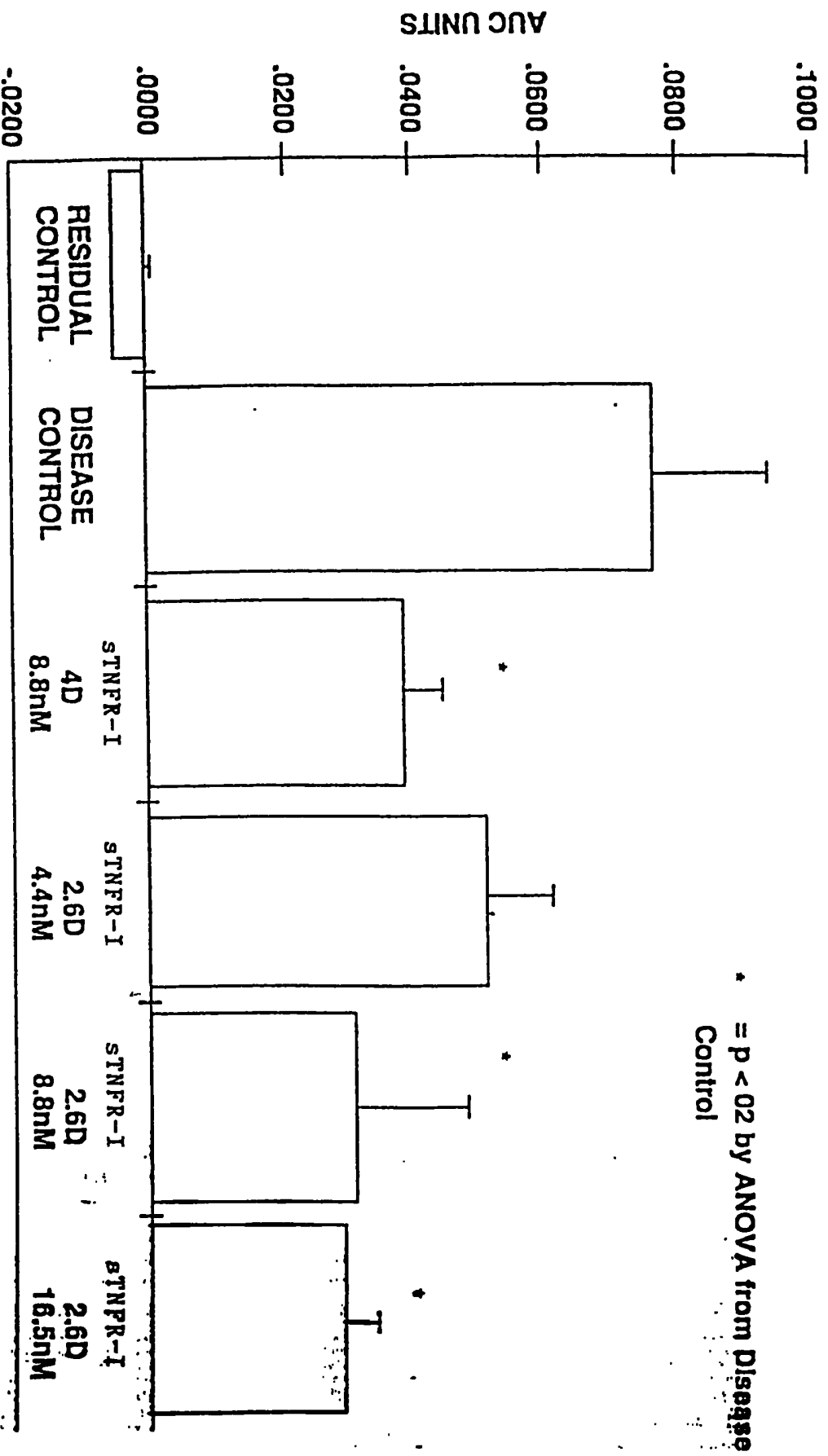
```

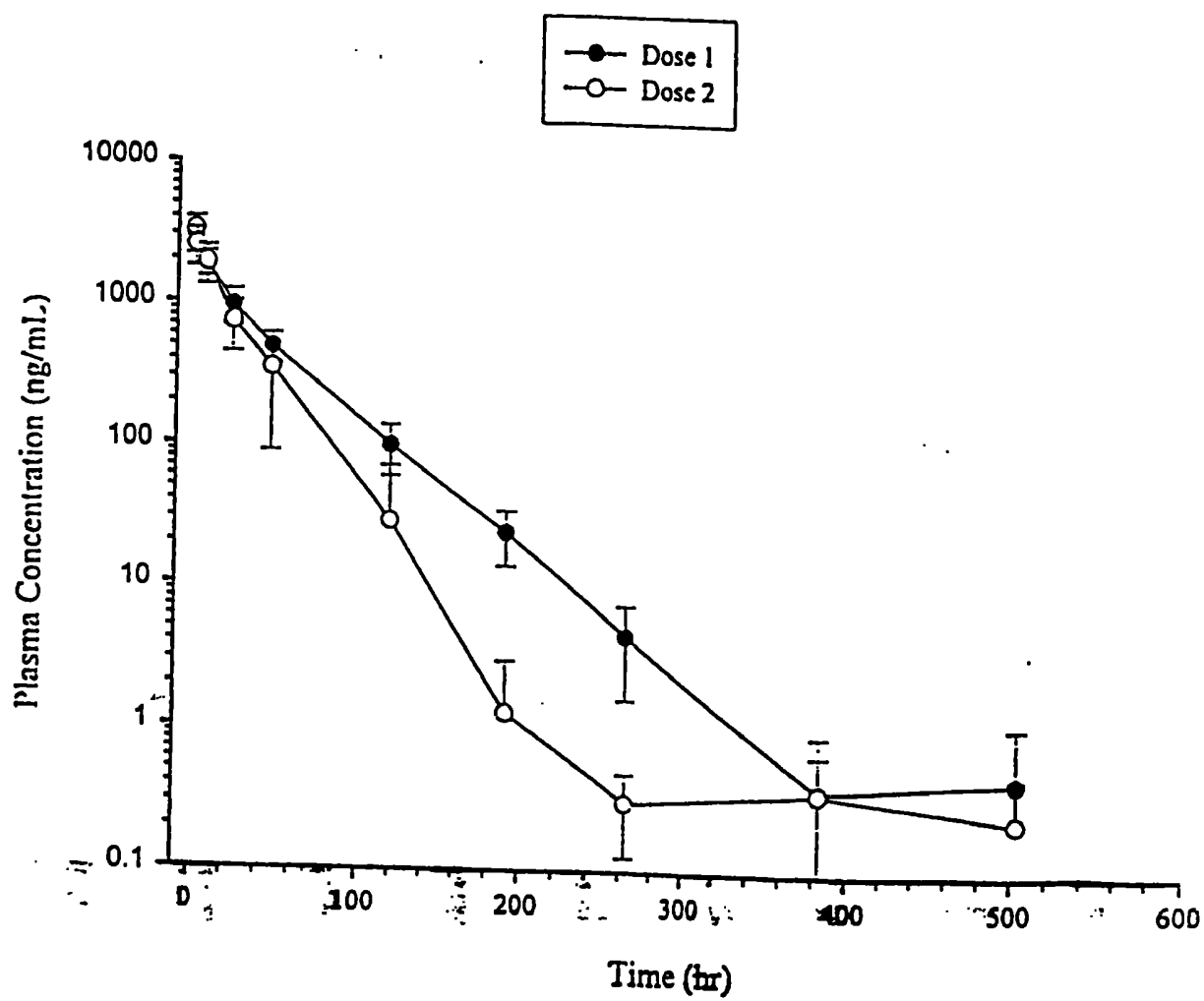
5' -CATATGTGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGG-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
  M C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G -
- CAGGATACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
  Q D T D C R E C E S G S F T A S E N H L -
- AGACACTGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
  R H C L S C S K C R K E M G Q V E I S S -
- TGCACAGTGGACCGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGG-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
  C T V D R D T V C G C R K N Q Y R H Y W -
- AGTGAAAACCTTTTCCAGTGCTTCAATTGCTCTCTGTAAAAGCTT-3'
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
  S E N L F Q C F N C S L *

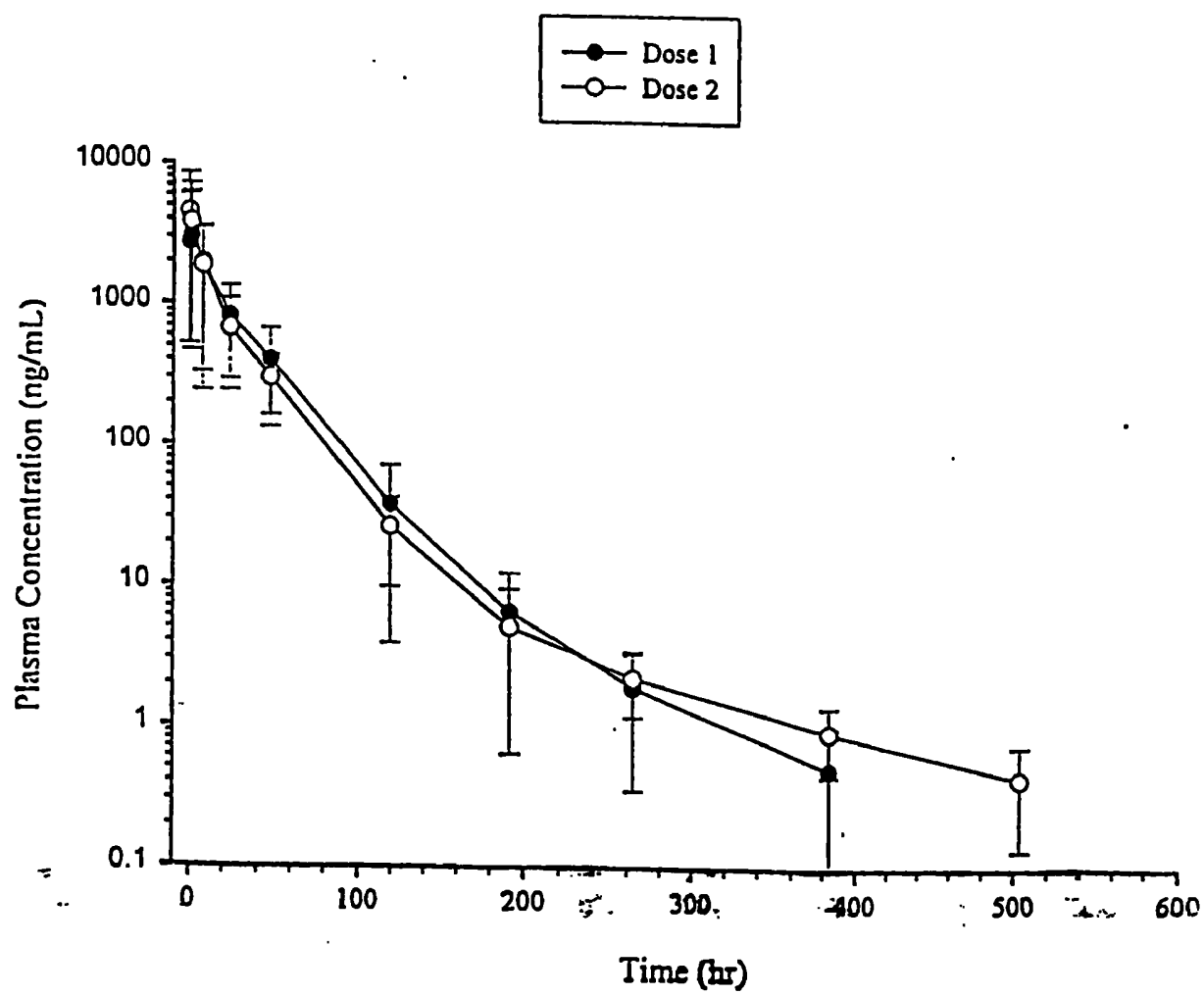
```

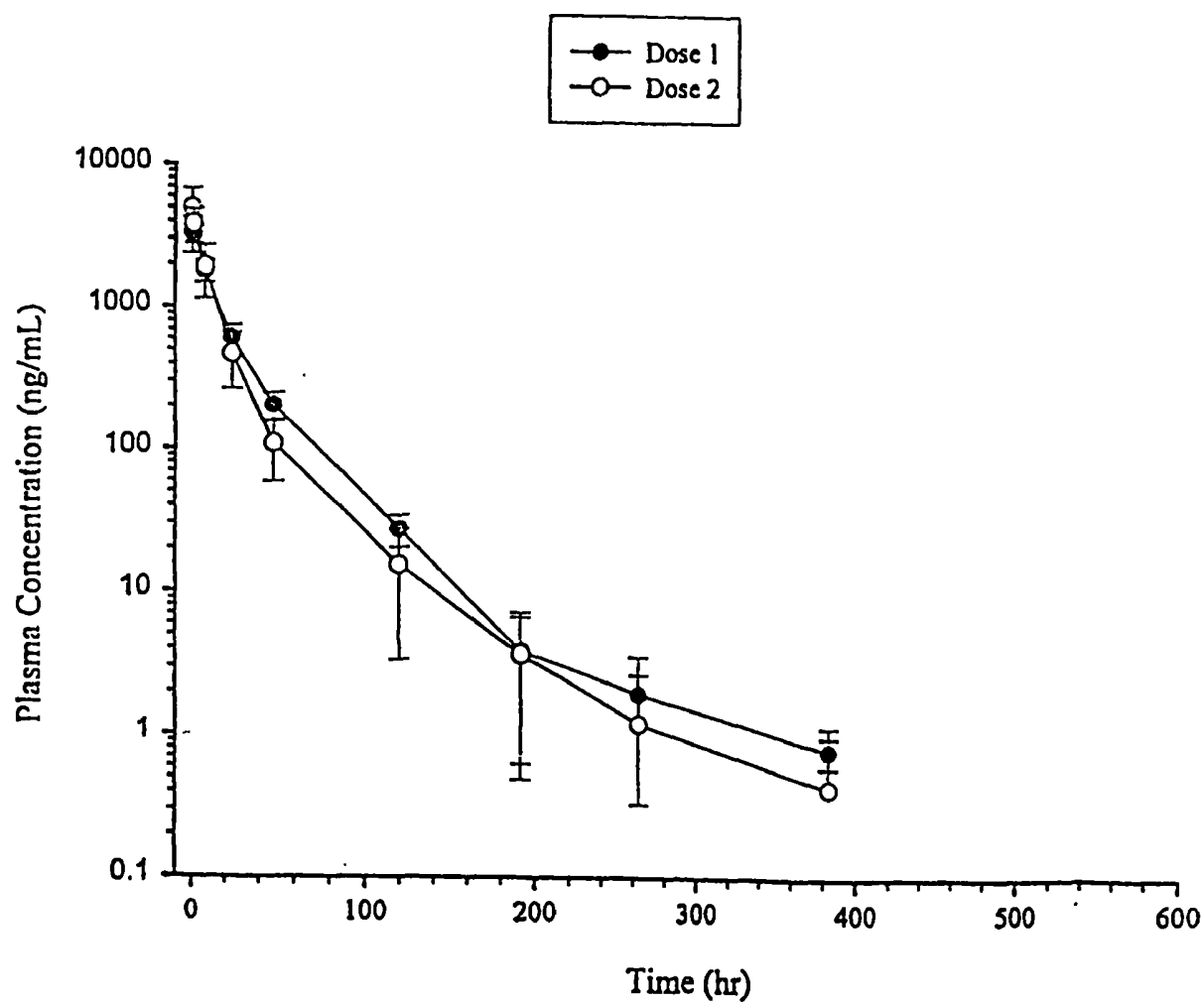
5' - CATATGTCGATTAGCTGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCA -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 M S I S C T K C H K G T Y L Y N D C P -
 -GGCCCGGGGCAGGATACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAA -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 G P G Q D T D C R E C E S G S F T A S E -
 -AACCACCTCAGACACTGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAG -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 N H L R H C L S C S K C R K E M G Q V E -
 -ATCTCTTCTTGACAGTGGACCGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGG -
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 I S S C T V D R D T V C G C R K N Q Y R -
 -CATTATTGGAGTGAAAACCTTTTCCAGTGCTTCAATTGCTCTCTGTAAAAGCTT - 3'
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 H Y W S E N L F Q C F N C S L *

5'-TTGCCC GCCCAGGTGGCATT TACACCCTACGCCCCGGAGCCCGGGAGCACATGCCGGCTC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 L P A Q V A F T P Y A P E P G S T C R L -
 -AGAGAATACTATGACCAGACAGCTCAGATGTGCTGCAGCAAGTGCTCGCCGGGCCAACAT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 R E Y Y D Q T A Q M C C S K C S P G Q H -
 -GCAAAAGTCTTCTGTACCAAGACCTCGGACACCGTGTGTGACTCCTGTGAGGACAGCACA-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A K V F C T K T S D T V C D S C E D S T -
 -TACACCCAGCTCTGGAAGTGGGTTCCCGAGTGCTTGAGCTGTGGCTCCCGCTGTAGCTCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Y T Q L W N W V P E C L S C G S R C S S -
 -GACCAGGTGGAAACTCAAGCCTGCACTCGGGAACAGAACCGCATCTGCACCTGCAGGCCC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 D Q V E T Q A C T R E Q N R I C T C R P -
 -GGCTGGTACTGCGCGCTGAGCAAGCAGGAGGGGTGCCGGCTGTGCGCGCCGCTGCGCAAG-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 G W Y C A L S K Q E G C R L C A P L R K -
 -TGCCGCCCCGGGCTTCGGCGTGGCCAGACCAGGAACTGAAACATCAGACGTGGTGTGCAAG-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 C R P G F G V A R P G T E T S D V V C K -
 -CCCTGTGCCCCGGGGACGTTCTCCAACACGACTTCATCCACGGATATTTGCAGGCCCCAC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 P C A P G T F S N T T S S T D I C R P H -
 -~~CAGATCTGTAACGTGGTGGCCATCCCTGGGAATGCAAGCAGGGATGCAGTCTGCACGTC~~-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Q I C N V V A I P G N A S R D A V C T S -
 -ACGTCCCCCACC CGGAGTATGGCCCCAGGGGAGTACACTTACCCCAGCCAGTGTCCACA-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 T S P T R S M A P G A V H L P Q P V S T -
 -CGATCCCAACACACGCAGCCAACTCCAGAACCAGCACTGCTCCAAGCACCTCCTTCCTG-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 R S Q H T Q P T P E P S T A P S T S F L -
 -CTCCCAATGGGCCCCAGCCCCCAGCTGAAGGGAGCACTGGCGAC-3'
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 L P M G P S P P A E G S T G D *

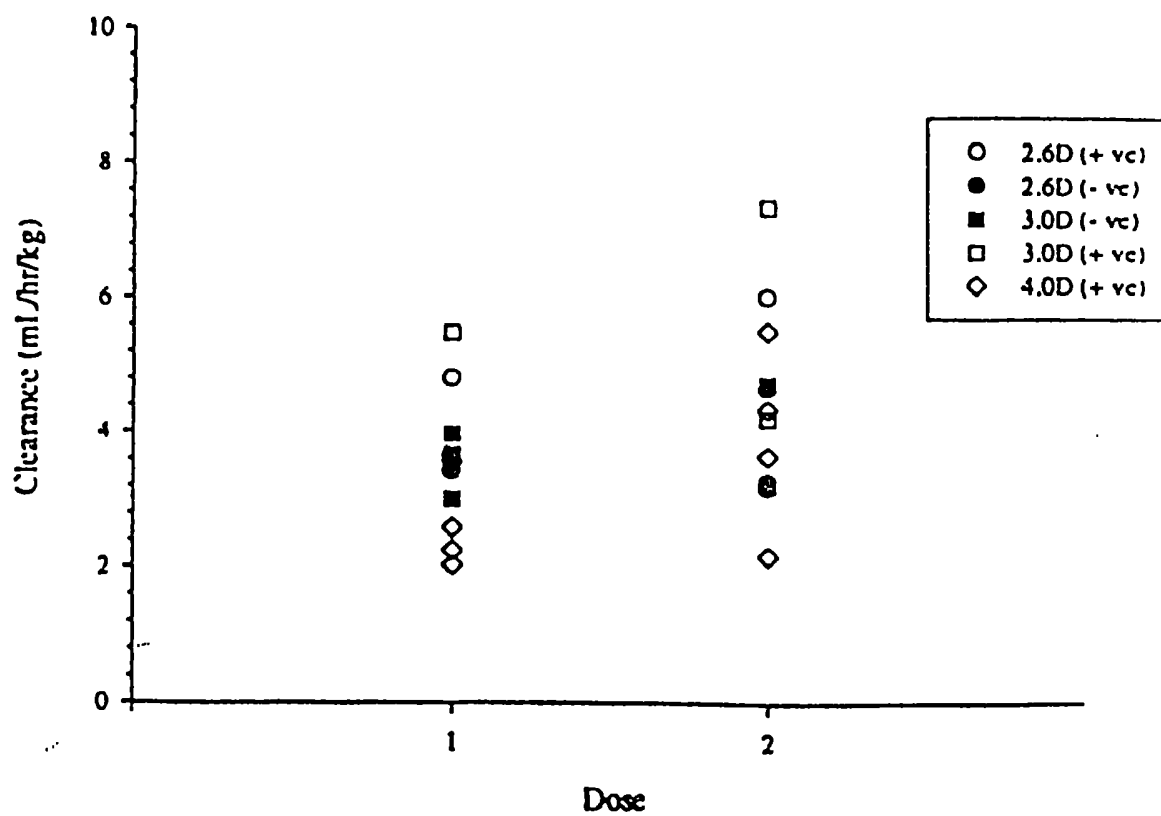








Obr.12



Zoznam sekvencií

<110> Amgen Inc.

<120> Skrátené rozpustné receptory faktora
nekrotizujúceho tumory typu I a typu II

<130> A415Erev

<140> PCT/US 97/12244

<141> 1997-07-09

<150> US 60/021,443

<151> 1996-07-09

<150> US 60/032,534

<151> 1996-12-06

<150> US 60/037,737

<151> 1997-01-23

<150> US 60/039,314

<151> 1997-02-07

<150> US 60/039,792

<151> 1997-03-04

<160> 81

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 483

<212> DNA

<213> Rekombinantná ľudská

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(483)

<400> 1

gat	agt	gtg	tgt	ccc	caa	gga	aaa	tat	atc	cac	cct	caa	aat	aat	tcg	48
Asp	Ser	Val	Cys	Pro	Gln	Gly	Lys	Tyr	Ile	His	Pro	Gln	Asn	Asn	Ser	
1				5				10					15			

att	tgc	tgt	acc	aag	tgc	cac	aaa	gga	acc	tac	ttg	tac	aat	gac	tgt	96
Ile	Cys	Cys	Thr	Lys	Cys	His	Lys	Gly	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Cys	
			20					25					30			

cca	ggc	ccg	ggg	cag	gat	acg	gac	tgc	agg	gag	tgt	gag	agc	ggc	tcc	144
Pro	Gly	Pro	Gly	Gln	Asp	Thr	Asp	Cys	Arg	Glu	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	
		35				40						45				

ttc	acc	gct	tca	gaa	aac	cac	ctc	aga	cac	tgc	ctc	agc	tgc	tcc	aaa	192
Phe	Thr	Ala	Ser	Glu	Asn	His	Leu	Arg	His	Cys	Leu	Ser	Cys	Ser	Lys	
		50				55					60					

tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg gag atc tct tct tgc aca gtg gac 240
Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

cgg gac acc gtg tgt. ggc tgc agg aag aac cag tac cgg cat tat tgg 288
Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc aat tgc agc ctc tgc ctc aat ggg 336
Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

acc gtg cac ctc tcc tgc cag gag aaa cag aac acc gtg tgc acc tgc 384
Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
115 120 125

cat gca ggt ttc ttt cta aga gaa aac gag tgt gtc tcc tgt agt aac 432
His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
130 135 140

tgt aag aaa agc ctg gag tgc acg aag ttg tgc cta ccc cag att gag 480
Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
145 150 155 160

aat 483
Asn

<210> 2

<211> 161

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 2

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
130 135 140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
145 150 155 160

Asn

<210> 3

<211> 332

<212> DNA

<213> Rekombinantná ľudská.

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(324)

<400> 3

cat atg gac agc gtt tgc ccc caa gga aaa tac atc cac cct caa aat 48
Met Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn
1 5 10 15

aat tgc att tgc tgt acc aag tgc cac aaa gga acc tac ttg tac aat 96
Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn
20 25 30

gac tgt cca ggc cgc ggc cag gat acg gac tgc agg gag tgt gag agc 144
Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser
35 40 45

ggc tcc ttc acc gct tca gaa aac cac ctc aga cac tgc ctc agc tgc 192
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys
50 55 60

tcc aaa tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg gag atc tct tct tgc aca 240
Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr
65 70 75

gtg gac cgg gac acc gtg tgt ggc tgc agg aag aac cag tac cgg cat 288
Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His
80 85 90 95

tat tgg agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc tgc tga taggatcc. 332
Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Cys
100 105

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Rekombinantný ľudský

<400> 4
 Met Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn
 1 5 10 15
 Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp
 20 25 30
 Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly
 35 40 45
 Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser
 50 55 60
 Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val
 65 70 75 80
 Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr
 85 90 95
 Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Cys
 100 105

<210> 5
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Rekombinantná ľudská

<220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(333)

<400> 5
 cat atg gac agc gtt tgc ccc caa gga aaa tat atc cac cct caa aat 48
 Met Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn
 1 5 10 15
 aat tcg att tgc tgt acc aag tgc cac aaa gga acc tac ttg tac aat 96
 Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn
 20 25 30
 gac tgt cca ggc ccg ggg cag gat acg gac tgc agg gag tgt gag agc 144
 Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser
 35 40 45
 ggc tcc ttc acc gct tca gaa aac cac ctc aga cac tgc ctc agc tgc 192
 Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys
 50 55 60
 tcc aaa tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg gag atc tct tct tgc aca 240
 Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr
 65 70 75
 gtg gac cgg gac acc gtg tgt ggc tgc agg aag aac cag tac cgg cat 288
 Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His
 80 85 90 95

tat tgg agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc aat tgc tct ctg taa	333
Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu	
100 105 110	

aagctt 339

<210> 6
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Rekombinantný ľudský

<400> 6	
Met Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn	
1 5 10 15	
Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp	
20 25 30	
Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly	
35 40 45	
Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser	
50 55 60	
Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val	
65 70 75 80	
Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr	
85 90 95	
Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu	
100 105	

<210> 7
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Rekombinantná ľudská

<220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(324)

<400> 7	
cat atg gac agc gtt tgc ccc caa gga aaa tat atc cac cct caa aat	48
Met Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn	
1 5 10 15	
aat tgc att tgc tgt acc aag tgc cac aaa gga acc tac ttg tac aat	96
Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn	
20 25 30	
gac tgt cca ggc ccg ggg cag gat acg gac tgc agg gag tgt gag agc	144
Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser	
35 40 45	
ggc tcc ttc acc gct tca gaa aac cac ctc aga cac tgc ctc agc tgc	192
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys	
50 55 60	

tcc aaa tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg gag atc tct tct tgc aca 240
Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr
65 70 75

gtg gac cgg gac acc gtg tgt ggt tgc agg aag aac cag tac cgg cat 288
Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His
80 85 90 95

tat tgg agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc aat taa tagggatcc 333
Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn
100 105

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Rekombinantná ľudská

<400> 8

Met Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn
1 5 10 15
Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp
20 25 30
Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly
35 40 45
Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser
50 55 60
Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val
65 70 75 80
Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr
85 90 95
Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn
100 105

<210> 9

<211> 285

<212> DNA

<213> Rekombinantná ľudská

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(279)

<400> 9

cat atg tgt acc aag tgc cac aaa gga acc tac ttg tac aat gac tgt 48
Met Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
1 5 10 15
cca ggc cgg ggg cag gat acg gac tgc agg gag tgt gag agc ggc tcc 96
Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
20 25 30

ttc acc gct tca gaa aac cac ctc aga cac tgc ctc agc tgc tcc aaa	144
Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys	
35 40 45	
tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg gag atc tct tct tgc aca gtg gac	192
Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp	
50 55 60	
cgg gac acc gtg tgt ggc tgc agg aag aac cag tac cgg cat tat tgg	240
Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp	
65 70 75	
agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc aat tgc tct ctg taa aagctt	285
Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu	
80 85 90	

<210> 10
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Rekombinantný ľudský

<400> 10	
Met Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro	
1 5 10 15	
Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe	
20 25 30	
Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys	
35 40 45	
Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg	
50 55 60	
Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser	
65 70 75 80	
Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu	
85 90	

<210> 11
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> Rekombinantná ľudská

<220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(309)

<400> 11	
cat atg tat atc cac cct caa aat aat tcg att tgc tgt acc aag tgc	48
Met Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys	
1 5 10 15	
cac aaa gga acc tac ttg tac aat gac tgt cca ggc ccg ggg cag gat	96
His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp	
20 25 30	

acg gac tgc agg gag tgt gag agc ggc tcc ttc acc gct tca gaa aac	144
Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn	
35 40 45	
cac ctc aga cac tgc ctc agc tgc tcc aaa tgc cga aag gaa atg ggt	192
His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly	
50 55 60	
cag gtg gag atc tct tct tgc aca gtg gac cgg gac acc gtg tgt ggc	240
Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly	
65 70 75	
tgc agg aag aac cag tac cgg cat tat tgg agt gaa aac ctt ttc cag	288
Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln	
80 85 90 95	
tgc ttc aat tgc tct ctg taa aagctt	315
Cys Phe Asn Cys Ser Leu	
100	

<210> 12
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Rekombinantný ľudský

<400> 12
Met Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His
1 5 10 15
Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr
20 25 30
Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His
35 40 45
Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln
50 55 60
Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys
65 70 75 80
Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys
85 90 95
Phe Asn Cys Ser Leu
100

<210> 13
 <211> 294
 <212> DNA
 <213> Rekombinantná ľudská

<220>
 <221> CDS
 <222> (4)..(288)

<400> 13
cat atg tcg att agc tgt acc aag tgc cac aaa gga acc tac ttg tac 48
Met Ser Ile Ser Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15
aat gac tgt cca ggc ccg ggg cag gat acg gac tgc agg gag tgt gag 96
Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu
20 25 30
agc ggc tcc ttc acc gct tca gaa aac cac ctc aga cac tgc ctc agc 144
Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser
35 40 45
tgc tcc aaa tgc cga aag gaa atg ggt cag gtg gag atc tct tct tgc 192
Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys
50 55 60
aca gtg gac cgg gac acc gtg tgt ggc tgc agg aag aac cag tac cgg 240
Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg
65 70 75
cat tat tgg agt gaa aac ctt ttc cag tgc ttc aat tgc tct ctg taa 288
His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu
80 85 90 95
aagctt 294

<210> 14
<211> 94
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 14
Met Ser Ile Ser Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn
1 5 10 15
Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser
20 25 30
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys
35 40 45
Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr
50 55 60
Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His
65 70 75 80
Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu
85 90

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 15
Asn Ser Ile Cys
1

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 16
Asn Asn Ser Ile Cys
1 5

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 17
Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 18
Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 19
His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 20
Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 21

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 22

Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5 10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 23

Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5 10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 24

Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5 10

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 25

Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5 10

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 26

Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5 10 15

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 27

Val	Cys	Pro	Gln	Gly	Lys	Tyr	Ile	His	Pro	Gln	Asn	Asn	Ser	Ile	Cys
1				5					10					15	

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 28

Ser	Val	Cys	Pro	Gln	Gly	Lys	Tyr	Ile	His	Pro	Gln	Asn	Asn	Ser	Ile
1					5				10					15	

Cys

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 29

Asp	Ser	Val	Cys	Pro	Gln	Gly	Lys	Tyr	Ile	His	Pro	Gln	Asn	Asn	Ser
1					5				10					15	

Ile Cys

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 30

Phe	Asn	Cys	Ser
1			

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 31

Phe	Asn	Cys	Ser	Leu
1				5

<210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Rekombinantný ľudský

<400> 32
 Phe Asn Cys Ser Leu Cys
 1 5

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Rekombinantný ľudský

<400> 33
 Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu
 1 5

<210> 34
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> Rekombinantná ľudská

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(705)

<400> 34
 ttg ccc gcc cag gtg gca ttt aca ccc tac gcc ccg gag ccc ggg agc 48
 Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 aca tgc cgg ctc aga gaa tac tat gac cag aca gct cag atg tgc tgc 96
 Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
 20 25 30
 agc aag tgc tcg ccg ggc caa cat gca aaa gtc ttc tgt acc aag acc 144
 Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
 35 40 45
 tcg gac acc gtg tgt gac tcc tgt gag gac agc aca tac acc cag ctc 192
 Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
 50 55 60
 tgg aac tgg gtt ccc gag tgc ttg agc tgt ggc tcc cgc tgt agc tct 240
 Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
 65 70 75 80
 gac cag gtg gaa act caa gcc tgc act cgg gaa cag aac cgc atc tgc 288
 Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
 85 90 95

acc tgc agg ccc ggc tgg tac tgc gcg ctg agc aag cag gag ggg tgc	336
Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys	
100 105 110	
cgg ctg tgc gcg ccg ctg cgc aag tgc cgc ccg ggc ttc ggc gtg gcc	384
Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala	
115 120 125	
aga cca gga act gaa aca tca gac gtg gtg tgc aag ccc tgt gcc ccg	432
Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro	
130 135 140	
ggg acg ttc tcc aac acg act tca tcc acg gat att tgc agg ccc cac	480
Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His	
145 150 155 160	
cag atc tgt aac gtg gtg gcc atc cct ggg aat gca agc agg gat gca	528
Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Arg Asp Ala	
165 170 175	
gtc tgc acg tcc acg tcc ccc acc cgg agt atg gcc cca ggg gca gta	576
Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val	
180 185 190	
cac tta ccc cag cca gtg tcc aca cga tcc caa cac acg cag cca act	624
His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr	
195 200 205	
cca gaa ccc agc act gct cca agc acc tcc ttc ctg ctc cca atg ggc	672
Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly	
210 215 220	
ccc agc ccc cca gct gaa ggg agc act ggc gac	705
Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp	
225 230 235	

<210> 35

<211> 235

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 35

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp	Asn	Trp	Val	Pro	Glu	Cys	Leu	Ser	Cys	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser
65					70					75					80
Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Cys	Thr	Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys
				85					90					95	
Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys
			100					105					110		
Arg	Leu	Cys	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala
		115					120					125			
Arg	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Ala	Pro
	130					135					140				
Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Asp	Ile	Cys	Arg	Pro	His
145					150					155					160
Gln	Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Gly	Asn	Ala	Ser	Arg	Asp	Ala
			165						170					175	
Val	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Val
			180					185					190		
His	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Ser	Gln	His	Thr	Gln	Pro	Thr
		195					200					205			
Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Gly
	210					215					220				
Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp					
225					230					235					

<210> 36
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Rekombinantný ľudský

<400> 36
 Ala Gln Met Cys
 1

<210> 37
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Rekombinantný ľudský

<400> 37
 Thr Ala Gln Met Cys
 1 5

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 38
Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 39
Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 40
Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 41
Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 42
Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5 10

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 43

Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5 10

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 44

Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 45

Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 46

Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5 10

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 47

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5 10 15

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 48

Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5 10 15

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 49

Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met
1 5 10 15

Cys

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 50

Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln
1 5 10 15

Met Cys

<210> 51

<211> 19

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 51

Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala
1 5 10 15

Gln Met Cys

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 52

Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr
1 5 10 15

Ala Gln Met Cys
20

<210> 53

<211> 21

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 53

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
1 5 10 15

Thr Ala Gln Met Cys
20

<210> 54

<211> 22

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 54

Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp
1 5 10 15

Gln Thr Ala Gln Met Cys
20

<210> 55

<211> 23

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 55

Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr
1 5 10 15

Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
20

<210> 56

<211> 24

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 56

Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr
1 5 10 15

Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
20

<210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 57

Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu
1 5 10 15

Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
20 25

<210> 58

<211> 26

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 58

Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg
1 5 10 15

Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
20 25

<210> 59

<211> 27

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 59

Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu
1 5 10 15

Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
20 25

<210> 60

<211> 28

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 60

Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg
1 5 10 15

Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
20 25

<210> 61

<211> 29

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 61

Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys
1 5 10 15

Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
20 25

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 62

Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr
1 5 10 15

Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
20 25 30

<210> 63

<211> 31

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 63

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
20 25 30

<210> 64

<211> 4

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 64

Ala Pro Leu Arg
1

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 65

Ala Pro Leu Arg Lys
1 5

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> Rekombinantný ľudský

<400> 66

Ala Pro Leu Arg Lys Cys
1 5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Rekombinantný ľudský

<400> 67
Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
1 5

<210> 68
<211> 31
<212> DNA
<213> Rekombinantná ľudská

<400> 68
ggttagccat atggacagcg tttgccccca a 31

<210> 69
<211> 33
<212> DNA
<213> Rekombinantná ľudská

<400> 69
cccaagcttt tacagagagc aattgaagca ctg 33

<210> 70
<211> 40
<212> DNA
<213> Rekombinantná ľudská

<400> 70
actcgaggat ccgcggataa ataagtaacg atccgggtcca 40

<210> 71
<211> 41
<212> DNA
<213> Rekombinantná ľudská

<400> 71
caggtcggat cctatcagca gaagcactgg aaaagggtttt c 41

<210> 72
<211> 31
<212> DNA
<213> Rekombinantná ľudská

<400> 72
ggttagccat atggacagcg tttgccccca a 31

<210> 73

<211> 34

<212> DNA

<213> Rekombinantná ľudská

<400> 73

cgcggtatccc tattaattga agcactggaa aagg

34

<210> 74

<211> 30

<212> DNA

<213> Rekombinantná ľudská

<400> 74

ccccatatgt atatccaccc tcaaaataat

30

<210> 75

<211> 33

<212> DNA

<213> Rekombinantná ľudská

<400> 75

cccaagcttt tacagagagc aattgaagca ctg

33

<210> 76

<211> 38

<212> DNA

<213> Rekombinantná ľudská

<400> 76

ccccatatgt cgattagctg taccaagtgc cacaaagg

38

<210> 77

<211> 33

<212> DNA

<213> Rekombinantná ľudská

<400> 77

cccaagcttt tacagagagc aattgaagca ctg

33

<210> 78

<211> 30

<212> DNA

<213> Rekombinantná ľudská

<400> 78

ccccatatgt gtaccaagtg ccacaaagga

30

<210> 79

<211> 33

<212> DNA

<213> Rekombinantná Iudská

<400> 79

cccaagcttt tacagagagc aattgaagca ctg

33

<210> 80

<211> 31

<212> DNA

<213> Rekombinantná Iudská

<400> 80

ggttagccat atggacagcg ttgccccca a

31

<210> 81

<211> 33

<212> DNA

<213> Rekombinantná Iudská.

<400> 81

cccaagcttt taggtgcaca cggtgttctg ttt

33

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Skrátené receptory faktora nekrotizujúceho tumory (skrátene sTNFR) majúce nasledovný vzorec: R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 , kde [Cys¹⁹-Cys¹⁰³] predstavuje zvyšky 19 až 103 sTNFR-I (schéma číslovania aminokyselinových zvyškov je uvedená na obr. 1 (SEQ ID NO:2) na uľahčenie porovnania a kde ďalej R_1 predstavuje metiononylovanú alebo nemetiononylovanú aminoskupinu Cys¹⁹ alebo aminokyselinového zvyšku (alebo zvyškov) aminokyselinového konca vybraných zo skupiny:

C	
IC	
SIC	
NSIC	(SEQ ID NO:15)
NNSIC	(SEQ ID NO:16)
QNNSIC	(SEQ ID NO:17)
PQNNSIC	(SEQ ID NO:18)
HPQNNSIC	(SEQ ID NO:19)
IHPQNNSIC	(SEQ ID NO:20)
YIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:21)
KYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:22)
GKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:23)
QGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:24)
PQGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:25)
CPQGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:26)
VCPQGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:27)
SVCPQGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:28)
DSVCPQGKYIHPQNNSIC	(SEQ ID NO:29)

a kde R_2 predstavuje karboxyskupinu Cys¹⁰³ alebo karboxyskupinu karboxykoncového aminokyselinového zvyšku vybraného zo skupiny:

F	
FN	
FNC	
FNCS	(SEQ ID NO:30)
FNCSL	(SEQ ID NO:31)
FNCSLC	(SEQ ID NO:32)
FNCSLCL	(SEQ ID NO:33);

a od nich odvodených obmien alebo derivátov, ale za predpokladu, že keď R_1 predstavuje metionylovanú alebo nemetionylovanú aminoskupinu aminokyselinovej sekvencie VCPQGKYIHPQNNNSIC alebo odtiaľ odvodené N-terminálne skrátenie 1 až 15 zvyškov, potom R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 nie je pridaný variant majúci vzorec R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSLCL- R_3 , kde R_3 predstavuje karboxyskupinu aminokyselinových zvyškov Asn¹¹¹-Asn¹⁶¹ z obr. 1 alebo skrátenie na karboxylovom konci Asn¹¹¹-Asn¹⁶¹ z obr. 1.

2. Skrátený sTNFR podľa nároku 1, vybraný zo skupiny skladajúcej sa z sTNFR-I 2,6D/C105, sTNFR-I 2,6D/C106, sTNFR-I 2,6D/N105, sTNFR-I 2,3D/d8, sTNFR-I 2,3D/d15 alebo sTNFR-I 2,3D/d18.

3. Skrátený sTNFR podľa nároku 1 alebo 2, ktorý je na karboxylovom konci fuzio^{no}vaný s celou konštantnou doménou alebo jej časťou ťažkého alebo ľahkého reťazca ľudského imunoglobulínu.

4. Skrátený sTNFR podľa niektorého z nárokov 1 až 3, ktorý je neglykozylovaný.

5. Skrátený sTNFR podľa niektorého z nárokov 1 až 3, ktorý je glykozylovaný.

6. Skrátený sTNFR podľa niektorého z nárokov 1 až 5, ktorý je konjugovaný k polyméru rozpustnému vo vode.

7. Skrátený sTNFR podľa nároku 6, v ktorom je vo vode rozpustným polymérom polyetylén glykol.

8. Polyvalentný väzbový proteín faktora nekrotizujúceho tumory (TNFbp) obsahujúci najmenej jeden skrátený sTNFR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7.

9. TNFbp podľa nároku 8 obsahujúci dimér skráteného sTNFR podľa nároku 3.

10. TNFbp podľa nároku 8 všeobecného vzorca R_1-X-R_2 , kde X obsahuje linker, ktorým je vo vode rozpustný polymér a R_1 a R_2 sú biologicky aktívne molekuly kovalentne viazané na uvedený vo vode rozpustný polymér, pričom aspoň jeden z R_1 a R_2 je skrátený sTNFR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5.

11. TNFbp podľa nároku 10, v ktorom vo vode rozpustným polymérom je polyetylén glykol.

12. TNFbp podľa nároku 11, v ktorom je sTNFR vybraný zo skupiny skladajúcej sa z sTNFR-I 2,6D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C106db.

13. Polynukleotid majúci sekvenciu kódujúcu skrátený sTNFR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3 alebo sekvenciu k nej komplementárnu.

14. Polynukleotid podľa nároku 13, ktorý má sekvenciu nukleovej kyseliny zvolenú zo sekvencií uvedených na obr. 2, 3, 4, 5, 6 alebo 7 alebo sekvenciu, ktorá je v kódujúcich oblastiach degenerovaná.

15. Vektor obsahujúci polynukleotid podľa nároku 13 alebo 14 operatívne pripojený k sekvencii riadiacej expresiu.

16. Prokaryotická alebo eukaryotická hostiteľská bunka obsahujúca polynukleotid podľa nároku 13 alebo 14 alebo vektor podľa nároku 15.

17. Spôsob prípravy skráteného sTNFR, v y z n a č u j ú - c i s a t ý m , že sa kultivuje hostiteľská bunka podľa nároku 16 za podmienok vhodných na umožnenie expresie skráteného sTNFR hostiteľskou bunkou a poprípade sa skrátený sTNFR izoluje.

18. Spôsob podľa nároku 17, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že hostiteľskou bunkou je bunka E. coli.

19. Spôsob podľa nároku 17, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že hostiteľskou bunkou je bunka vaječníka čínskeho chrčka (CHO).

20. Skrátený sTNFR, ktorý je rekombinantným expresným produktom prokaryotickej alebo eukaryotickej hostiteľskej bunky podľa nároku 16.

21. Spôsob prípravy farmaceutickej kompozície, v y z n a - č u j ú c i s a t ý m , že sa terapeuticky účinné množstvo skráteného sTNFR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7 alebo nároku 20 alebo TNFbp podľa ktoréhokoľvek z nárokov 8 až 12 zmieša s jedným alebo viacerými farmaceuticky vhodnými nosičmi.

22. Farmaceutická kompozícia, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že obsahuje skrátený sTNFR podľa ktoréhokoľvek

z nárokov 1 až 7 alebo 20 v spojení s farmaceuticky vhodným nosičom.

23. Farmaceutická kompozícia, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že obsahuje TNFbp podľa ktoréhokoľvek z nárokov 8 až 12 v spojení s farmaceuticky vhodným nosičom.

24. Farmaceutická kompozícia podľa ktoréhokoľvek z nárokov 22 až 23, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že obsahuje zmes s predĺženým uvoľňovaním.

25. Farmaceutická kompozícia podľa ktoréhokoľvek z nárokov 22 až 24, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že je lyofilizovaná.

26. Použitie skráteného sTNFR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7 alebo nároku 20 alebo TNFbp podľa ktoréhokoľvek z nárokov 8 až 12 na výrobu liečiva na liečenie pacientov postihnutých chorobou sprostredkovanou TNF.

27. Použitie skráteného sTNFR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7 alebo nároku 20 alebo TNFbp podľa ktoréhokoľvek z nárokov 8 až 12 na výrobu liečiva na liečenie pacientov postihnutých diabetes, hyperalgéziou, zápalovou chorobou čriev, ischemickým poškodením, reperfúznym poškodením alebo reumatickou chorobou.

28. Použitie podľa nároku 27, kde reumatická choroba je zvolená zo súboru pozostávajúceho z reumatoidnej artritídy, osteoartritídy, juvenilnej (reumatoidnej) artritídy, ankylóznej spondylitídy, dermatomyozitídy, psoriatickej artritídy, sklerodermie, Sjögrenovho syndrómu a vaskulitídy.

29. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 26 až 28, kde liečivo sa podáva intravenózne, intramuskulárne, intradermálne, subkutánne, intraartikulárne alebo infúziou.

30. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 26 až 29, kde liečivo sa podáva pred podaním protizápalového liečiva, súčasne s ním alebo po ňom.

31. Použitie podľa nároku 30, kde protizápalové liečivo je zvolené zo súboru pozostávajúceho z nesteroidných protizápalových liečiv (NSAID), kortikosteroidov, pomaly pôsobiacich antireumatických liečiv (SAARD) alebo liečiv modifikujúcich chorobu (DM).

31. Použitie podľa nároku 30, kde protizápalovým liečivom je inhibítor interleukínu (IL-1) zvolený z antagonistu receptora IL-1 (IL-1ra) alebo rozpustného receptora IL-1.

32. Kit, v y z n a č u j ú c i s a t ý m , že obsahuje skrátený sTNFR podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7 alebo nároku 20 alebo TNFbp podľa ktoréhokoľvek z nárokov 8 až 12.

01-2924-98-Če