

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1999-4**
(22) Přihlášeno: **09.07.1997**
(30) Právo přednosti: **09.07.1996** US 1996/021443
06.12.1996 US 1996/032534
23.01.1997 US 1997/037737
07.02.1997 US 1997/039314
04.03.1997 US 1997/39792
(40) Zveřejněno: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)
(47) Uděleno: **17.05.2006**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **14.06.2006**
(Věstník č. 6/2006)
(86) PCT číslo: **PCT/US1997/012244**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/001555**

(11) Číslo dokumentu:

296 835

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 92/07076; EP 0433900; WO 96/16221; EP 0398327; EP 0422339; EP 0393438.

(73) Majitel patentu:

AMGEN INC., Thousand Oaks, CA, US

(72) Původce:

Fisher Eric F., New Braunfels, TX, US
Edwards III Carl K., Superior, CO, US
Kieft Gary L., Boulder, CO, US

(74) Zástupce:

Dr. Karel Čermák, Národní 32, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

Zkrácený rozpustný receptor faktoru nekrotizujícího tumory, způsob jeho přípravy a použití, vazebný protein, polynukleotid, vektor, buňka, farmaceutická kompozice a způsob její přípravy a kit

(57) Anotace:

Zkrácený rozpustný receptor faktoru nekrotizujícího tumory (sTNFR) obecného vzorce R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂, kde [Cys¹⁹-Cys¹⁰³] představuje zbytky 19 až 103 sTNFR-I z obrázku 1 (SEQ ID NO:2); R₁ představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu Cys¹⁹ nebo aminoterminálního aminokyselinového zbytku a R₂ představuje karboxyskupinu Cys¹⁰³ nebo karboxyskupinu karboxyterminálního aminokyselinového zbytku, kde uvedené sTNFRs mají sníženou antigenicitu ve srovnání s rozpustným TNFR-I obsahujícím první tři domény, a jeho deleční a/nebo substituční mutein schopný inhibovat TNF, jakož i konjugát tohoto zkráceného sTNFR s vodorozpustným polymerem a způsob jeho přípravy a použití, vazebný protein, polynukleotid, vektor, buňka, farmaceutická kompozice a způsob její přípravy a kit.

CZ 296835 B6

Zkrácený rozpustný receptor faktoru nekrotizujícího tumory, způsob jeho přípravy a použití, vazebný protein, polynukleotid, vektor, buňka, farmaceutická kompozice a způsob její přípravy a kit

5

Oblast techniky

Vynález se týká zkráceného rozpustného receptoru faktoru nekrotizujícího tumory (soluble truncated tumor necrosis factor receptor, sTNFR), způsobu jeho přípravy a použití při léčení
10 zánětlivých chorob, polyvalentního vazebného proteinu faktoru nekrotizujícího tumory, polynukleotidu kódujícího tento protein, vektoru a prokaryotní nebo eukaryotní hostitelské buňky obsahující tento polynukleotid, farmaceutické kompozice obsahující uvedený sTNFR a způsobu její přípravy a příslušného kitu.

15

Dosavadní stav techniky

Zánět je obranná reakce těla na poranění způsobené například mechanickým poškozením, infekcí
20 nebo působením antigenů. Zánětlivá reakce se může projevit patologicky, jestliže je zánět indukovan nevhodnými stimuly, jako např. autoantigenem, projevuje se výrazným způsobem nebo přetrvává i po odstranění škodlivého agens. Takováto zánětlivá reakce může zahrnovat produkci určitých cytokinů.

Zatímco etiologie zánětů není doposud zcela objasněna, znalost molekulárních aspektů zánětů
25 byla v poslední době zlepšena. Tento výzkum vedl k identifikaci určitých cytokinů, o kterých se předpokládá, že hrají výraznou roli ve zprostředkování zánětu. Cytokiny jsou extracelulární proteiny, které modifikují chování buněk, zejména těch buněk, které jsou v nejbližším okolí místa syntézy a uvolňování cytokinů. Faktory nekrotizující tumory (TNFs) tvoří třídu cytokinů produkovaných řadou typů buněk, včetně monocytů a makrofágů.

30

Již dříve byly popsány nejméně dva typy TNF, konkrétně TNF alfa (TNF- α) a TNF beta (TNF- β nebo lymfotoxin), oba jsou aktivní jako trimerní molekula a předpokládá se, že iniciují přenos
buněčných signálů propojením receptorů (Engelmann et al. (1990), J. Biol. Chem., 265:14497-14504).

35

Řada důkazů naznačuje, že TNF- α a TNF- β jsou hlavními cytokiny zánětu. Tyto známé TNFs mají důležité fyziologické účinky na řadu rozdílných cílových buněk, které se účastní v zánětlivé
40 odpovědi na různé podněty, například při infekci nebo poranění. Proteiny podněcují sekreci latentní kolagenázy a prostaglandinu E₂ jak u fibroblastů, tak u synoviálních buněk, a dále způsobují, že buňky osteocytů stimulují resorpci kosti. Tyto proteiny zvyšují povrchové adhezivní vlastnosti endotelových buněk vůči neutrofilům. Také způsobují, že endotelové buňky sekretují koagulační aktivitu a redukují jejich schopnost lyzovat sraženiny. Navíc inhibicí exprese enzymu lipoprotein
45 lypázy přesměrovávají aktivitu adipocytů od ukládání lipidů. TNFs také podněcují u hepatocytů syntézu jedné třídy proteinů známých jako „reaktanty akutní fáze“, které působí na hypotalamus jako pyrogeny (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 Waage et al. (1987); Lancet, 1 (8529):355). Kromě toho preklinické výsledky na různých zvířecích modelech zánětů (včetně revmatoidní
50 artritidy) naznačují, že inhibice TNF může mít významný dopad na vývoj onemocnění a jeho závažnost (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). Navíc i nedávné předběžné klinické zkoušky u lidí s revmatoidní artritidou s inhibitory TNF ukázaly slibné
55 výsledky (Rankin et al. (1995), British Journal Of Rheumatology, 3(4):4334-4342; Elliott 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.

Proteinové inhibitory TNF jsou ze stavu techniky známy. EP 0 308 378 uvádí, že protein izolovaný z moči pacientů s horečkou vykazuje aktivitu inhibující TNF. Účinek tohoto proteinu je pravděpodobně dán kompetitivním mechanismem na úrovni receptorů. EP 0 308 378 popisuje protein dostatečně čistý pro to, aby mohl být charakterizován svým N-koncem. Nicméně, odkaz
5 ale nic neříká o jakékoliv sekvenci DNA nebo o rekombinantně produkovaném inhibitoru TNF.

V dosavadním stavu techniky existují údaje o rekombinantně připravených inhibitech TNF. Například EP 0 393 438 a EP 0 422 339 uvádějí aminokyselinové a nukleotidové sekvence zralého rekombinantního lidského „30kDa inhibitoru TNF“ (známého také jako p55 receptor a jako sTNFR-I) a zralého rekombinantního lidského „40kDa inhibitoru“ (známého také jako p75 receptor a jako sTNFR-II), stejně jako jejich modifikované formy, jako např. fragmenty, funkční deriváty a varianty. EP 0 393 438 a EP 0 422 339 také uvádějí metody izolace genů kódujících tyto inhibitory, klonování příslušných genů ve vhodných vektorech a buněčných typech a expresi genů vedoucí k produkci inhibitorů. Bylo prokázáno, že zralý rekombinantní lidský 30kDa inhibitor TNF a zralý rekombinantní lidský 40kDa inhibitor TNF jsou schopné inhibovat TNF (EP 0 393 4378, EP 0 422 339, WO 92/16221 a WO 95/34326).
10
15

sTNFR-I a sTNFR-II jsou členy receptorové superrodiny nervového růstového faktoru/receptoru TNF, které zahrnuje receptor nervového růstového faktoru (nerve growth factor receptor, NGF), antigen CD40 B buněk, antigen Fas a antigeny CD27 a CD30 (Smith et al. (1990), Science, 248:1019-1023).
20

Nejkonzervativnějším znakem v této skupině buněčných povrchových receptorů je na cystain bohatá, extracelulární doména vázající ligand, která může být rozdělena do čtyř opakujících se motivů o asi 40 aminokyselinách a která obsahuje 4-6 cysteinových zbytků na značně konzervovaných pozicích (Smith et al. (1990), viz výše).
25

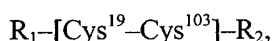
EP 393 438 dále pojednává o 40 kDa inhibitoru TNF označeném Δ51 a 40kDa inhibitoru TNF označeném Δ53, které jsou zkrácenými verzemi rekombinantního 40kDa proteinu inhibitoru TNF o úplné délce, a v nichž jsou odstraněny aminokyselinové zbytky 51 nebo 53 na karboxykonci zralého proteinu. Odborník si uvědomuje, že čtvrtá doména jak 30kDa inhibitoru TNF, tak 40kDa inhibitoru není nutná pro inhibici TNF. Tento fakt byl potvrzen různými výzkumnými skupinami. Byly připraveny varianty 30kDa a 40kDa inhibitoru TNF s odstraněnými doménami se zjištěním, že varianty bez čtvrté domény si zachovávají plnou vazebnou aktivitu pro THF; naproti tomu varianty bez první, druhé nebo třetí domény si TNF vazebnou aktivitu nezachovávají (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 Scallan et al., (1995), Cytokine, 7(8)-759-770).
30
35

Vzhledem k relativně nízké inhibici cytotoxicity, kterou vykazuje 30kDa inhibitor TNF a 40kDa inhibitor TNF (Butler et al. (1994), Cytokine, 6(6):616-623), připravily různé skupiny diméry proteinů inhibitorů TNF (Butler et al. 1994, viz výše a Martin et al. (1995), Exp. Neurol., 131:221-228). Diméry mohou ale vyvolat protilátkovou odpověď (Martin et al. (1995), viz výše a Fisher et al. (1996), The New England Journal of Medicine, 334(26):1697-1702).
40

Cílem předkládaného vynálezu je poskytnout funkčně aktivní zkrácené sTNFRs. Tento a další cíle předkládaného vynálezu budou zřejmé z následujícího popisu.
45

Podstata vynálezu

Podle prvního aspektu se předmětem vynálezu A) zkrácený rozpustný receptor faktoru nekrotizujícího tumory (sTNFR) obecného vzorce
50



kde

[Cys¹⁹-Cys¹⁰³] představuje zbytky 19 až 103 sTNFR-I z obrázku 1 (SEQ ID NO:2); a

- 5 kde R₁ představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu Cys¹⁹ nebo aminoskupinu aminoterminálního aminokyselinového zbytku ze 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),

10

a kde R₂ představuje karboxyskupinu Cys¹⁰³ nebo karboxyskupinu karboxyterminálního aminokyselinového zbytku vybraného ze skupiny:

F

FN

FNC

FNCS (SEQ ID NO:30)

FNCSL (SEQ ID NO:31)

FNCSLC (SEQ ID NO:32)

FNCSLCL (SEQ ID NO:33),

15

kde uvedené sTNFRs mají sníženou antigenicitu ve srovnání s rozpustným TNFR-I obsahujícím první tři domény, a jeho deleční a/nebo substituční mutein schopný inhibovat TNF, jakož i konjugát tohoto zkráceného s TNFR s vodorozpustným polymerem, s výhodou polyethylenglykolem.

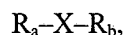
- 5 Ve výhodném provedení B) je zkrácený sTNFR definovaný výše vybraný ze skupiny skládající se z sTNFR 2.6D/C105 [NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH], sTNFR-I 2.6D/N105 [NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FN-COOH], sTNFR-I 2.3D/d8 [NH₂-MYIHPQNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH], sTNFR-I 2.3D/d15 [NH₂MSIS-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH) a sTNFR-I 2.3D/d18 [NH₂-M-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH].

V jiném výhodném provedení C) je zkrácený sTNFR nebo karboxylovém konci fúzován s celou konstantní doménou nebo její částí těžkého nebo lehkého řetězce lidského imunoglobulinu.

- 15 Zkrácený sTNFR podle vynálezu může být neglykosylovaný nebo glykosylovaný.

Předmětem vynálezu je dále také polyvalentní vazebný protein faktoru nekrotizujícího tumory (TNFbp) obsahující nejméně jeden zkrácený sTNFR definovaný výše. TNFbp podle vynálezu obsahuje v jednom z výhodných provedení dimér zkráceného sTNFR podle provedení C).

- 20 V jiném výhodném provedení má TNFbp obecný vzorec



- 25 kde X obsahuje linker, který je ve vodě rozpustný polymer a R_a a R_b jsou biologicky aktivní molekuly kovalentně vázané na uvedený ve vodě rozpustný polymer, přičemž alespoň jeden z R_a a R_b je zkrácený sTNFR definovaný výše.

- 30 Předmětem vynálezu je dále také polynukleotid mající sekvenci kódující zkrácený sTNFR podle vynálezu nebo sekvenci k ní komplementární.

Předmětem vynálezu je dále také vektor obsahující výše uvedený polynukleotid operativně připojený k sekvenci řídící expresi.

- 35 Předmětem vynálezu je dále také prokaryontní nebo eukaryontní hostitelská buňka obsahující tento polynukleotid nebo vektor.

- 40 Předmětem vynálezu je dále také způsob přípravy zkráceného sTNFR, při kterém se kultivuje uvedená hostitelská buňka za podmínek vhodných pro umožnění exprese zkráceného sTNFR hostitelskou buňkou a popřípadě se zkrácený sTNFR izoluje. Hostitelskou buňkou je s výhodou buňka *E. coli* nebo buňka vaječníku čínského křečka (CHO).

Předmětem vynálezu je také farmaceutická kompozice, obsahující zkrácený sTNFR nebo TNFbp definovaný výše ve spojení s farmaceuticky vhodným nosičem.

- 45 Předmětem vynálezu je také použití zkráceného sTNFR podle vynálezu pro výrobu léčiva pro léčení pacientů postižených chorobou zprostředkovanou TNF, jako je diabetes, hyperalgesie, zánětlivá choroba střev, ischemické poškození, reperfúzní poškození nebo revmatická choroba. Revmatická choroba může být zvolena ze souboru sestávajícího z revmatoidní artritidy, osteoartritidy, juvenilní (revmatoidní) artritidy, ankylozující spondylitidy, dermatomyozitidy, lupénkové artritidy, sklerodermie, Sjögrenova syndromu a vaskulitidy.

Předmětem vynálezu je také kit, který obsahuje zkrácený sTNFR nebo TNFbp podle vynálezu.

- 55 Další aplikace, které rovněž spadají do rozsahu vynálezu, jsou uvedeny dále.

Vynález se tedy týká funkčně aktivních zkrácených forem sTNFR-I a sTNFR-II, které jsou dále zmiňované jako „zkrácený (zkrácené) sTNRF(s)“. Zkrácené sTNRFs jsou modifikované formy sTNFR-I a sTNFR-II, které neobsahují čtvrtou doménu (aminokyselinová rezidua Thr¹²⁷-Asp¹⁶¹ u sTNFR-I a aminokyselinová rezidua Pro¹⁴¹-Thr¹⁷⁹ u sTNFR-II); části třetí domény (aminokyselinová rezidua Asn¹¹¹-Cys¹²⁶ u sTNFR-I a Pro¹²³-Lys¹⁴⁰ u sTNFR-II); a které případně neobsahují část první domény (aminokyselinová rezidua Asp¹-Cys¹⁹ u sTNFR-I a Leu¹-Cys³² u sTNFR-II). Tyto nové inhibitory TNF (např. TNF- α a/nebo TNF- β) mají obecné uplatnění.

10 Zkrácené sTNFRs podle předkládaného vynálezu zahrnují proteiny, které odpovídají vzorci R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂ a R₄-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₅. Tyto proteiny jsou zkrácené formy sTNFR-I a sTNFR-II.

15 Vzorcem „R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂“ se rozumí jeden nebo více proteinů, kde [Cys¹⁹-Cys¹⁰³] odpovídají sTNFR-I reziduům 19 až 103 při číslování aminokyselinových zbytků podle schématu na obrázku 1 (SEQ ID NO:2); kde R₁ představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu Cys¹⁹ nebo aminokonec některého aminokyselinového zbytku(ů) následující 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:29)

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),

20

a kde R₂ představuje karboxyskupinu Cys¹⁰³ nebo karboxykonec aminokyselinového zbytku vybraného ze skupiny:

F

FN

FNC

FNCS (SEQ ID NO:30)

FNCSL (SEQ ID NO:31)

FNCSLC (SEQ ID NO:32)

FNCSLCL (SEQ ID NO:33),

- 5 a jejich varianty, avšak za předpokladu, že jestliže R_1 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminokyselinovou sekvenci VCPQGKYIHPQNNSIC nebo zkrácení N-konce o 1–15 reziduí, pak protein R_1 –[Cys¹⁹–Cys¹⁰³] R_2 není variantou R_1 –[Cys¹⁹–Cys¹⁰³] R_2 –FNCSLCL– R_3 , kde R_3 představuje karboxy skupinu aminokyselinové sekvence Asn¹¹¹–Asn¹⁶¹ z obrázku 1 nebo jejího zkrácení na karboxykonci.

- 10 Příklady zkráceného sTNFR–I podle předkládaného vynálezu zahrnují následující molekuly: NH₂–MDSVCPQGKYIHPQNNSIC–[Cys¹⁹–Cys¹⁰³] R_2 –COOH (také zmiňovaná jako sTNFR–I 2.6D/C105); NH₂–MDSVPQGKYIHPQNNSIC–[Cys¹⁹–Cys¹⁰³] R_2 –FNCSL–COOH (také zmiňovaná jako sTNFR–I 2.6D/C106); NH₂–MDSVCPQGKYIHPQNNSIC–[Cys¹⁹–Cys¹⁰³] R_2 –FN–COOH (také zmiňovaná jako sTNFR–I 2.6D/N105); NH₂–MYIHPQNNSIC–[Cys¹⁹–Cys¹⁰³] R_2 –FNCSL–COOH (také zmiňovaná jako sTNFR–I 2.3D/d8); NH₂–M–[Cys¹⁹–Cys¹⁰³] R_2 –FNCSL–COOH (také zmiňovaná jako sTNFR–I 2.3D/d18) a NH₂–MSIS–[Cys¹⁹–Cys¹⁰³] R_2 –FNCSL–COOH (také zmiňovaná jako sTNFR–I 2.3–D/d15) buďto methionylované nebo nemethionylované, a jejich varianty a deriváty.
- 15
- 20 Vzorcem „ R_4 –[Cys³²–Cys¹¹⁵] R_5 “ se rozumí jeden nebo více proteinů, kde [Cys³²–Cys¹¹⁵] představuje rezidua Cys³² až Cys¹¹⁵ sTNFR–I při číslování aminokyselinových zbytků podle schématu na obrázku 8 (SEQ ID NO:35) a kde R_4 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminokyselinovou sekvenci Cys³² nebo aminokyselinového zbytku(ů) aminokonce vybraných ze skupiny:

C

MC

QMC

AQMC (SEQ ID NO:36)

TAQMC (SEQ ID NO:37)

25 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 R_5 představuje karboxyskupinu Cys¹¹⁵ nebo karboxyskupinu karboxykonce aminokyselinových zbytků vybraných ze skupiny:

5

A

AP

APL

APLR (SEQ ID NO:64)

APLRK (SEQ ID NO:65)

APLRKC (SEQ ID NO:66)

APLRKCR (SEQ ID NO:67)

10

a jejich varianty, avšak ze předpokladu, že jestliže R_4 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu aminokyselinové sekvence TCRLREYYDQTAQMC nebo zkrácení N-konce o 1 až 15 zbytků, pak R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 není variantou se vzorcem R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]-APLRKDCR- R_6 , kde R_6 představuje karboxyskupinu aminokyselinové sekvence Pro¹²³-Thr¹⁷⁹ z obrázku 8 nebo jejího zkrácení na karboxykonci.

Podle jednoho aspektu předkládaného vynálezu mohou být zkrácené sTNFRs připraveny v glykosylované nebo neglykosylované formě. Zkrácené sTNFRs jsou připravovány technikami rekombinantního genového inženýrství. Kromě toho se zkrácené sTNFRs mohou syntetizovat chemickými technikami nebo kombinací rekombinantních a chemických metod.

V jiném aspektu předkládaného vynálezu mohou zkrácené sTNFRs být modifikovány připojením zkrácených sTNFRs k ve vodě rozpustnému polymeru. Tak například, zkrácené sTNFRs mohou být konjugovány k jedné nebo více molekulám polyethylenglykolu s cílem zlepšit farmakokinetickou účinnost zvětšením zdánlivé molekulové hmotnosti molekuly.

Další aspekt předkládaného vynálezu zahrnuje různé polynukleotidy kódující zkrácené sTNFRs. Vhodné nukleotidové sekvence zahrnují například ty, které jsou konkrétně uvedené na obrázcích, stejně jako degenerované sekvence a jejich přirozeně se vyskytující alelické varianty. Takovéto sekvence nukleových kyselin mohou být použity při expresi zkrácených sTNFRs v eukaryontních nebo prokaryontních hostitelských buňkách, kde jsou produkty exprese nebo jejich deriváty charakterizovány schopností ovlivňovat aktivitu TNF.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu jsou vektory obsahující polynukleotidy kódující zkrácené sTNFRs funkčně spojené s amplifikačními sekvencemi a/nebo sekvencemi řídicími expresi. Jako prokaryontní, tak eukaryotní hostitelské buňky mohou být stabilně transformovány nebo transfekovány takovýmito vektory pro expresi zkrácených sTNFRs. Předkládaný vynález dále zahrnuje rekombinantní produkci zkrácených sTNFRs. Hostitelské buňky obsahující takovéto polynukleotidy jsou pěstovány ve vhodném živném médiu a buňkami exprimované zkrácené sTNFRs jsou případně izolovány z hostitelských buněk a/nebo ze živného média.

Podle dalšího aspektu zahrnuje předkládaný vynález farmaceutické kompozice obsahující zkrácené sTNFRs nebo jejich deriváty. Typicky mohou být zkrácené sTNFRs nebo jejich deriváty připravené ve spojení s farmaceuticky vhodnými nosiči. Pro usnadnění výroby, uskladnění, manipulaci, vpravení a/nebo účinnosti zkrácených sTNFRs a jejich variant se může použít řada pomocných látek.

Další aspekt předkládaného vynálezu se vztahuje k metodám ovlivnění aktivity TNF. Konkrétně nemoci zprostředkované TNF (např. nemoci zprostředkované TNF- α a/nebo TNF- β) mohou být léčeny podáváním terapeuticky účinných množství zkrácených sTNFRs nebo jejich derivátů.

Polynukleotidy kódující zkrácené sTNFRs se také mohou využít pro aplikaci v buněčné terapii nebo v genové terapii.

Zkrácené sTNFRs podle předkládaného vynálezu jsou vhodné zejména pro produkci proteinu ve velkých množstvích. Například, sTNFR-I má deaminované místo uvnitř aminokyselinové sekvence, 111 až 126 (aminokyseliny Asn¹¹¹-Gly¹²⁶). Předpokládá se, že absence tohoto místa zvyšuje biochemickou stabilitu purifikovaného proteinu a snižuje možnou degradaci produktu, což se projeví zvýšením stability proteinu při jeho skladování. Zkrácené sTNFRs mají méně disulfidových můstků než ostatní dříve popsané proteiny inhibitorů TNF. Například, sTNFR-I má dva disulfidové můstky uvnitř sekvence aminokyselin 111 až 126 a tři disulfidové můstky uvnitř sekvence aminokyselin 127 až 161; sTNFR-II má pak disulfidový můstek mezi Cys¹²¹ a Cys¹²⁹, Cys¹⁴² a Cys¹⁵⁷, a Cys¹⁶³ a Cys¹⁷⁸. Snižovaný počet disulfidových můstků je důležitý proto, že vyšší počet těchto vazeb může komplikovat proces opětovného skládání proteinu. Je překvapivé, že zkrácené sTNFRs mají méně míst pro antigenní epitopy, což mají ostatní dříve popsané proteiny inhibitorů TNF (např. zkrácená forma sTNFR-I mající první tři domény má nové epitopy (neo-epitopy) vzniklé odhalením určitých zbytků, viz. příklad III), což značně snižuje antigenicitu a dále dochází k významnému snížení rychlosti odbourávání (clearance) při opakovaném podávání. Předpokládá se, že snížená imunogenita zkrácených sTNFRs je vhodná pro léčení onemocnění zprostředkovaných TNF, zahrnujících zejména chronická zánětlivá onemocnění.

Další aspekty a výhody vynálezu budou odborníkům v oboru zřejmé z následujícího popisu, kde je podrobně popsána provedení předkládaného vynálezu.

5

Detailní popis vynálezu

Předkládaný vynález je založen na neočekávaném zjištění, že jak u sTNFR-I, tak i sTNFR-II může být zmenšena jejich velikost nejenom odstraněním čtvrté domény, ale také části třetí domény a případně i části první domény při zachování biologické aktivity a snížení antigenicity. Produkce těchto biologicky aktivních zkrácených sTNFRs nebo jejich derivátů se pokládá za výhodnou minimálně z následujících důvodů. Za prvé tyto molekuly mohou být o jedno potenciálně destabilizující deaminované místo méně. Za druhé tyto molekuly mají méně disulfidových můstků což usnadňuje případnou purifikaci a opětovné skládání. Za třetí tyto molekuly mají menší počet míst pro možné antigenní epitopy.

Zde používaný termín „zkrácený(é) sTNFR(s)“ zahrnuje jeden nebo více biologicky aktivních syntetických nebo rekombinantních molekul vzorce R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂ nebo R₄-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₅ a jejich varianty (včetně inserčních, substitučních a delečních), které jsou popsány níže.

Zde používaný termín „biologicky aktivní“ znamená, že zkrácený sTNFR vykazuje podobné TNF inhibiční vlastnosti jako sTNFR-I a/nebo sTNFR-II, i když ne nutně všechny a ne nutně v plném rozsahu. Obecně, zkrácené sTNFRs a jejich deriváty mají schopnost inhibovat TNF. Biotesty zkrácených sTNFRs jsou popsány níže v příkladu II. Výběr konkrétních TNF inhibičních vlastností závisí na požadovaném použití zkráceného sTNFR.

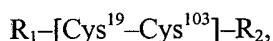
Podle jednoho aspektu předloženého vynálezu zkrácené sTNFRs mohou být výhodně produkovány rekombinantními technikami v bakteriálních, savčích nebo hmyzích buněčných systémech a mohou být buď v glykosylované nebo neglykosylované formě proteinu. Alternativně mohou být syntetizovány chemicky. Produkční metody preferované v současnosti jsou popsány detailně níže.

Všechny zkrácené sTNFRs mohou být typicky izolovány a purifikovány do značné čistoty a zbavené tak ostatních proteinových materiálů (např. nezkrácených sTNFRs). Výhodně je zkrácený sTNFR z asi 80 % zbaven ostatních proteinů, které mohou být přítomné vzhledem k produkční technice použité při přípravě zkrácených sTNFRs. Výhodněji je sTNFR z si 90 % zbaven ostatních proteinů, zejména když je asi z 95 % zbaven ostatních proteinů a nejvýhodněji pak, když je přibližně z > 98 % zbaven ostatních proteinů. Je však cenné, že požadovaný protein může být před podáváním kombinován s dalšími aktivními složkami, chemickými kompozicemi a/nebo s vhodnými farmaceutickými materiály, jak je podrobněji popsáno níže.

Zkrácené sTNFRs

45

Zkrácené sTNFRs podle předkládaného vynálezu mohou být jedním nebo více proteiny reprezentovanými následujícím vzorcem:



50

kde [Cys¹⁹-Cys¹⁰³] představuje rezidua 19 až 103 s TNFR-I (při označení aminokyselinových zbytků použitým na obrázku 1 (SEQ ID NO:2)), kde R₁ představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu Cys¹⁹ nebo aminokonce aminokyselinového zbytku(ů) vybraných z následující skupiny:

55

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),

- 5 a kde R_2 představuje karboxyskupinu Cys¹⁰³ nebo aminokyselinové zbytky karboxykonce vybrané z následující skupiny:

F

FN

FNC

FNCS (SEQ ID NO:30)

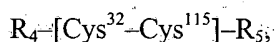
FNCSL (SEQ ID NO:31)

FNCSLC (SEQ ID NO:32)

FNCSLCL (SEQ ID NO:33),

- 10 a jejich varianty, avšak za předpokladu, že jestliže R_1 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu aminokyselinové sekvence VCPQGKYIHPQNNSIC nebo zkrácení N-konce a 1–15 reziduí, pak protein R_1 –[Cys¹⁹–Cys¹⁰³] R_2 není variantou R_1 –[Cys¹⁹–Cys¹⁰³] R_2 –FNCSLCL– R_3 , kde R_3 představuje karboxyskupinu aminokyselinové sekvence Asn¹¹¹–Asn¹⁶¹ z obrázku 1 nebo jejího zkrácení na karboxykonci.

- 15 V dalším základním provedení zkrácené sTNFRs podle předkládaného vynálezu mohou být jedním nebo více proteiny reprezentované následujícím vzorcem:



- 5 kde $[Cys^{32}-Cys^{115}]$ reprezentuje rezidua Cys^{32} až Cys^{115} sTNFR-II podle schématu číslování aminokyselinových zbytků na obrázku 8 (SEQ ID NO:35), kde R_4 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu Cys^{32} nebo aminokyselinového zbytku(ů) aminokonce vybraných ze skupiny:

C		
MC		
QMC		
AQMC	I	(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)
CRLREYYTQTAQMC		(SEQ ID NO:46)
TCRLREYÜDQTAQMC		(SEQ ID NO:47)
STCRLRUYDQTAQMC		(SEQ ID NO:48)
GSTCRLREYYDQTAQMC		(SEQ ID NO:49)
PGSTCRLREYYDQTAQMC		(SEQ ID NO:50)
EPGSTCRLREYYDQTAQMC		(SEQ ID NO:51)
PEPGSTCRLREYYDQTAQMC		(SEQ ID NO:52)
AQEPGSTCRLREYYDQTAQMC		(SEQ ID NO:53)
YAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC		(SEQ ID NO:54)
PYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC		(SEQ ID NO:55)
TPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC		(SEQ ID NO:56)
FTPYAPEPGSTCSLREYYDQTAQMC		(SEQ ID NO:57)
AFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC		(SEQ ID NO:58)
VAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC		(SEQ ID NO:59)

QVAFTPYAQEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO: 60)
 AQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO: 61)
 PAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO: 62)
 LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO: 63),

a kde R_5 představuje karboxyskupinu Cys¹¹⁵ anebo karboxyskupinu karboxykonce aminokyselinových zbytků vybraných ze 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 jejich varianty, avšak za předpokladu, že jestliže R_4 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu aminokyselinové sekvence TCRLREYYDQTAQMC nebo zkrácení N-konce o 1 až 15 zbytků, pak R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 není variantou se vzorce R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]-APLRKCR- R_6 , kde R_6 představuje karboxyskupinu aminokyselinové sekvence Pro¹²³-Thr¹⁷⁹ z obrázku 8 nebo jejího zkrácení karboxykonce.

Další aspekt předkládaného vynálezu zahrnuje jednu nebo více variant R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 buď methionylovaných nebo nemethionylovaných. Termín „zkrácený (zkrácené) sTHFR(s)“ tedy zahrnuje jednu nebo více přirozeně se vyskytujících alelických variant R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 a jednu nebo více dalších variant proteinů, ve kterých byly aminokyselinové zbytky v aminokyselinových sekvencích R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 odstraněny („deleční varianty“), včleněny („inzerční varianty“) nebo substituovány („substituční varianty“).

Delece aminokyselinových sekvencí jsou typicky v rozsahu od asi 20 aminokyselinových zbytků; zpravidla se ale jedná o asi 1–10 zbytků a nejčastěji o 1–5 zbytků, takže nedojde k narušení konformace proteinu. Jsou zamýšleny delece na N-konci, C-konci a vnitřních intrasekvencí. Počet celkových delecí a/nebo následných delecí je zvolen tak, aby se zachovala terciární struktura proteinu v ovlivněné doméně, např. křížová vazba mezi cysteiny.

Delece uvnitř aminokyselinové sekvence R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a uvnitř aminokyselinové sekvence R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 se mohou provádět v oblasti nízké homologie se sekvencemi ostatních členů receptorové rodiny NGF/TNF ve skupině buněčných povrchových membránových proteinů. Delece uvnitř aminokyselinové sekvence R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a uvnitř aminokyselinové sekvence R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 se mohou také provádět v oblasti významné homologie se sekvencemi ostatních členů receptorové rodiny NGF/TNF, a pak je větší pravděpodobnost významné modifikace biologické aktivity. Sekvenční podobnost mezi členy receptorové rodiny NGF/TNF je konkrétně zvláště vysoká v oblastech odpovídajících prvním dvěma disulfidovým smyčkám domény 1, celé doméně 2, a první disulfidové smyčce domény 3 (Banner et al. (1993). Cell, 73:431–445). Příkladem dvou delečních variant odvozených od R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 jsou R_1 -[Cys¹⁹-(Δ Thr²⁰-Cys¹⁰³)]- R_2 a R_1 -[Cys¹⁹-(Δ Cys¹⁹-Lys²¹)-Cys¹⁰³]- R_2 , kde R_1 a R_2 odpovídají výše uvedené definici. Příkladem tří delečních variant odvozených do R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 jsou

R_4 -[Cys³²-(Δ Cys¹¹⁵)Cys¹¹⁵]-R₅; R_1 -[Cys¹⁹-(Δ Cys¹¹⁵-Lys¹¹⁵)Cys¹¹⁵]-R₂ a R_4 -[Cys³²-(Δ Cys¹¹⁵-Arg¹¹³)Cys¹¹⁵]-R₅; kde R₁ a R₂ odpovídá výše uvedené definici.

Adice aminokyselinových sekvencí může zahrnovat fúze na amino- a/nebo karboxykonci v rozsahu délek od jednoho rezidua do jednoho sta nebo více reziduí, stejně jako interní intrasekvenční inserce jednoho nebo více aminokyselinových reziduí. Interní adice se mohou pohybovat zpravidla v rozsahu 1 až 10 aminokyselinových zbytků, častěji pak v rozsahu 1 až 5 aminokyselinových zbytků a nejčastěji pak v rozsahu 1 až 3 aminokyselinových zbytků.

Adiční varianty aminokonce zahrnují přidání methioninu (například jako výsledek přímé exprese proteinu v bakteriálních rekombinantních buněčných kulturách), nebo dalších aminokyselinových reziduí či sekvencí. Další příklad inserce na aminokonce zahrnuje fúzi signální sekvence, stejně jako nebo s ostatními pre- a prosekvencemi pro usnadnění sekrece proteinu z rekombinantních hostitelských buněk. U prokaryotních hostitelských buněk, které nerozeznávají a nezpracovávají přirozené signální sekvence sTNFR-I nebo sTNFR-II, mohou být signální sekvence nahrazeny prokaryotními signálními sekvencemi vybranými například ze skupiny zahrnující alkalickou fosfatázu, penicilinázu nebo vedoucí sekvenci tepelně odolného enterotoxinu II. U buněk kvasinek mohou být signální sekvence vybrány například ze skupiny zahrnující kvasinkovou invertázu, alfa faktor nebo vedoucí sekvenci kyselé fosfatázy. V savčích buňkách je exprese přirozených signálních sekvencí sTNFR-I nebo sTNFR-II (EP393 438 a EP 422 339) dostatečná, i když i jiné savčí signální sekvence mohou být vhodné (například sekvence odvozené od ostatních členů rodiny NGF/TNF).

Adiční varianty na karboxykonci nezahrnují přidání jednoho nebo více aminokyselinových reziduí, které by vedlo k rekonstrukci, sTNFR-I nebo sTNFR-II v uvedeném pořadí. Je žádoucí, aby adiční varianty na karboxykonci nezahrnovaly přidání jednoho nebo více karboxykoncových kyselinových reziduí, které by vedly k rekonstrukci třetí nebo čtvrté domény sTNFR-I nebo sTNFR-II. Příkladem adiční varianty na karboxykonci mohou být chimérické proteiny zahrnující fúzi R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂ nebo R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₅ s celou nebo s částí konstantní domény těžkého nebo lehkého řetězce lidského imunoglobulinu. Jsou preferovány takové chimérické proteiny, ve kterých každá imunoglobulinová část zahrnuje všechny domény kromě první domény konstantní oblasti těžkého řetězce lidského imunoglobulinu, jako jsou IgG, IgA, IgM anebo IgE, zejména pak IgG, např. IgG1 nebo IgG3). Pro odborníka v oboru je zřejmé, že jakákoliv aminokyselina každé z imunoglobulinových částí může být deletována nebo substituována s jednou nebo více aminokyselinami, nebo jedna či více aminokyselin může být přidáno potud, pokud se TNF vazebná část stále váže k TNF a imunoglobulinová část vykazuje jednu nebo více svých charakteristických vlastností.

Další skupinou jsou varianty se substitucí aminokyselin. Všechny tyto varianty mají nejméně jeden aminokyselinový zbytek v R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂ nebo R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₅ odstraněn a nahrazen odlišným zbytkem na jeho místě. Substituční varianty zahrnují alelické varianty, které jsou charakterizovány změnami v přirozeně se vyskytujících nukleotidových sekvencích v druhé populaci, které mohou nebo nemusí mít za následek změny aminokyselin. Při výběru možných míst pro mutace mohou odborníci v oboru použít jakoukoliv známou informaci o vazebném nebo aktivním místě polypeptidu.

Jedna metoda pro identifikaci aminokyselinových zbytků nebo oblastí pro mutagenезi proteinu se nazývá „mutagenезe alaninovým vyhlazením“, (alanine scanning mutagenesis) (Cunningham a Wells (1989), Science, 244:1081-1084, jehož popis je zde zahrnut odkazem). V této metodě je identifikován aminokyselinový zbytek nebo skupina cílových zbytků proteinu (např. nabitý zbytek, jako např. Arg, Asp, His, Lys a Glu) a nahrazen neutrální nebo negativní nabitou aminokyselinou (nejlépe alaninem nebo polyalaninem) s cílem ovlivnit interakci aminokyselin s okolním vodným prostředím uvnitř nebo vně buňky. Ty zbytky, které vykazují funkční citlivost k substitucím, jsou dále analyzovány včleněním dalších nebo jiných zbytků na místo substituce. Tak je předem určeno místo pro zavedení modifikace aminokyselinové sekvence a pro další optimalizaci

provedení mutace v daném místě se může provést alaninové vyhledávání nebo náhodná metagenese a výsledné variantní polypeptidy jsou podrobeny screeningu na zjištění optimální kombinace požadované aktivity a stupně aktivity.

- 5 Místa, která jsou předmětem zájmu pro substituční mutagenezi zahrnují ta místa, kde jsou aminokyseliny vyskytující se v R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 nebo R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 významně odlišné (co se týče podstatné části postranního řetězce, náboje a/nebo hydrofobicity) od sTNFR podobným proteinům, jako jsou např. sTNFRs z různých jiných druhů nebo jiných členů receptorové rodiny NGF/TNF.

10

- Další zájmová místa zahrnují ta, ve kterých jsou určitá rezidua podobná nebo identická s odpovídajícími místy v sTNFR-I podobným proteinům a sTNFR-II podobným proteinům. Taková místa jsou obecně důležitá pro biologickou aktivitu proteinu. Například zkušený odborník chápe, že před tímto vynálezem nebyl vliv zkrácení sTNFR-I a sTNFR-II na jejich příslušnou trojrozměrnou strukturu předvídatelný. Ale na základě zde uvedených výsledků odborník zajisté pochopí, že první principy vývoje strategie pro tvorbu variantních proteinů se mohly částečně zakládat na dříve vysvětlených údajích pro sTNFR-I a sTNFR-II o plné délce. V souvislosti s tím byly objasněny následující informace týkající se sTNFR-I (Banner et al. (1993), viz výše a Fu et al. (1995), Protein Engineering, 8(12): 1233-1241). Jako potenciálně důležitá pro stabilizaci odpovídající strukturu domény 1, 2 a 3 byla identifikována rezidua Tyr⁹, Thr³⁹, His⁵⁵ v doméně 1, rezidua Phe⁴⁹, Ser⁶³, Asp⁸² v doméně 2 a rezidua Tyr⁹² a Ser¹⁰⁷ v doméně 3. Rezidua Pro¹² a His⁵⁵ byla identifikována jako potenciálně vzájemně se ovlivňující se Ser⁸⁶-Tyr⁸⁷ na podjednotce C TNF- α . Rezidua Glu⁴⁵-Phe⁴⁹ byla identifikována jako podstata smyčky, která potenciálně interaguje s rezidui Leu²⁹-Arg³² podjednotky A TNF- α . Reziduum Gly⁴⁸ bylo identifikováno jako vzájemně se ovlivňující s Asn¹⁹-Pro²⁰ na podjednotce A TNF- α . Rezidua His⁵⁸-Leu⁶⁰ byla identifikována jako důležitý prvek v konformaci prodlouženého řetězce a interakce postranního řetězce se zbytky Arg³¹-Ala³³ na podjednotce A TNF- α byla potenciálně identifikována s reziduem His⁵⁸ sTNFR-I, které se specificky vzájemně ovlivňuje s reziduem Arg³¹. Rezidua Lys⁶⁴-Arg⁶⁶ byla identifikována jako důležitý prvek v konformaci prodlouženého řetězce a bylo zjištěno, že vykazují interakce postranního řetězce a hlavního řetězce s rezidui Ala¹⁴⁵-Glu¹⁴⁶ a reziduem Glu⁴⁶ na podjednotce A TNF- α . U rezidua Met⁶⁹ byla identifikována možná interakce s reziduem Tyr¹¹⁵ na podjednotce A TNF- α . Zjistilo se, že rezidua His⁹⁴-Phe¹⁰¹ tvoří smyčku, která se vzájemně ovlivňuje s rezidui Thr⁷²-Leu⁷⁵ a Asn¹³⁷ podjednotky C TNF- α a s reziduem Trp⁹⁶ s TNFR-I, specificky se ovlivňujícím s rezidui Ser⁷¹-Thr⁷² a podjednotce C TNF- α , Leu¹⁰⁰ sTNFR-I, které je v těsné blízkosti s reziduem Asn¹³⁷ na podjednotce C TNF- α a reziduem Gln¹⁰² sTNFR-I, které se vzájemně specificky ovlivňuje s reziduem Pro¹¹³ na podjednotce A TNF- α . Pro odborníka v oboru je zřejmé, že nejprve by měla být substitucí modifikována tato místa, a to relativně konzervativním způsobem.

- 40 Takovéto konzervativní substituce jsou uvedeny v tabulce 1 pod záhlavím „Preferované substituce“. Jestliže takovéto substituce vyvolají změny biologické aktivity, pak mohou být zavedeny podstatnější substituční změny (Příkladné substituce) a/nebo se mohou provést další adice/delece a poté analýza výsledných produktů.

TABULKA 1: Substituce aminokyselin

Původní zbytek	Preferované substituce	Příkladné substituce
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; norleucin
Leu (L)	Ile	norleucin; 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; norleucin

Při změnách obdobné povahy se může brát v úvahu hydropatický index aminokyselin. Každé aminokyselině byl přiřazen hydropatický index na základě jejich hydrofobicity a charakteristik náboje. Hodnoty jsou následující: izoleucin (+4,5); valin (+4,2); leucin (+3,8); fenylalanin (+2,8); cystain/cystein (+2,5); methionin (+1,9); alanin (+1,8); glycin (-0,4); ethreonin (-0,7); serin (-0,8); tryptofan (-0,9); tyrosin (-1,3); prolin (-1,6); histidin (-3,2); glutamát (-3,5); glutamin (-3,5); aspartát (-3,5); asparagin (-3,5); lysin (-3,9) a arginin (-4,5).

Význam hydropatického indexu aminokyselin při porovnávání interaktivních biologických funkcí proteinů je odborníkům obecně znám (Kyte a Doolittle (1982), J. Mol. Biol., 157:105-131, jehož popis je zde zahrnut odkazem). Je známo, že určité aminokyseliny mohou být substituovány za jiné s podobným hydropatickým indexem nebo skóre a stále je zachována podobná biologická aktivita. Dělalji-li se změny založené na hydropatickém indexu, preferují se substituce aminokyselin, jejichž hydropatický index je v rozsahu ± 2 , nebo lépe v rozsahu ± 1 , nebo nejlépe $\pm 0,5$.

Odborníkům je také známo, že substituce podobných aminokyselin může být efektivně provedena na základě hydrofilicity, zejména tehdy, když biologicky funkční ekvivalentní protein nebo peptid takto vytvořený je zamýšlen pro použití k imunologickým účelům tak, jak je tomu v tomto případě.

Patent US 4 554 101 (jehož popis je zde zahrnut odkazem) uvádí, že největší místní průměrná hydrofilicita proteinu (určovaná hydrofilicitou svých přilehlých aminokyselin) koreluje s jeho imunogenicitou a antigenicitou, tj. s biologickými vlastnostmi proteinu.

Jak je detailně uvedené v patentu US 4 554 101, byly jednotlivým aminokyselinovým zbytkům přiřazeny následující hodnoty hydrofilicity: arginin (+3,0); lysin (+3,0); aspartát (+3,0 ± 1); glutamát (+3,0 ± 1); serin (+0,3); asparagin (+0,2); glutamin (+0,2); glycin (0); threonin (-0,4); prolin (-0,5 ± 1); alanin (-0,5); histidin (-0,5); cystein (-1,0); methionin (-1,3); valin (-1,5); leucin (-1,8); izoleucin (-1,8); tyrosin (-2,3); fenylalanin (-2,5) a tryptofan (-3,4).

Dělají-li se změny založené na podobné hodnotě hydrofilicity, preferují se substituce aminokyselin, jejichž hodnoty hydrofilicity jsou v rozsahu ±2, nebo lépe v rozsahu ±1, nebo nejlépe ±0,5.

Patent US 4 554 101 také popisuje identifikaci a přípravu epitopů z primární aminokyselinové sekvence na základě hydrofilicity. Metodou uvedenou v patentu US 4 554 101 by byl odborník schopen identifikovat epitopy uvnitř sekvence aminokyselin, jako jsou zde popsány sTNFR sekvence. Tyto oblasti jsou zde uváděny jako „epitopové vnitřní oblasti“ (epitopic core regions).

Řada vědeckých publikací byla zaměřena na předpověď sekundární struktury a identifikaci epitopů analýzou sekvence aminokyselin (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 (jejichž popisy jsou zde zahrnuty odkazem). Kromě toho jsou v současnosti k dispozici počítačové programy pro pomoc s předpovědí antigenních částí a epitopové vnitřní oblasti proteinů. Příkladem jsou programy založené na Jameson–Wolfově analýze (Jameson a Wolf (1998); *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):181–186 a Wolf et al. (1988), *Comput. Appl. Biosci.*, 4(1):187–191, jejichž popisy jsou zde zahrnuty odkazem), program pepPlot^(R) (Brutlag et al. (1990), *CABS*, 6:237–245 a Weinbergen et al. (1985), *Science*, 228:740–742, jejichž popis je zde zahrnut odkazem) a ostatní nové programy pro předpověď terciární struktury proteinů (Fetrow a Bryant (1993), *Biotechnology*, 11:479–483, jehož popis je zde zahrnut odkazem).

Očekává se, že konzervativní modifikace aminokyselinových sekvencí (a odpovídající modifikace kódujících sekvencí nukleových kyselin) v R₁–[Cys¹⁹–Cys¹⁰³]-R₂ nebo R₄–[Cys³²–Cys¹¹⁵]-R₅ poskytnou modifikovanému proteinu podobné funkční a chemické charakteristiky.

Naproti tomu se může dosáhnout významné modifikace ve funkci a/nebo chemické charakteristice R₁–[Cys¹⁹–Cys¹⁰³]-R₂ nebo R₄–[Cys³²–Cys¹¹⁵]-R₅ výběrem substitucí, které se výrazně liší svým vlivem na zachování: (a) struktury polypeptidové kostry v oblasti substituce (například šroubovicové konformace nebo konformace listu), (b) náboje nebo hydrofobicity proteinu v cílovém místě, (c) převážně části postranního řetězce. Přirozeně se vyskytující rezidua jsou rozdělena do skupin založených na vlastnostech postranního řetězce:

- 1) hydrofóbní: norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) neutrální hydrofilní: Cys, Ser, Thr;
- 3) kyselé: Asp, Glu;
- 4) zásadité: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

5) rezidua, která ovlivňují orientaci řetězce: Gly, Pro; a

6) aromatické: Trp, Tyr, Phe.

Nekonzervativní substituce mohou zahrnovat výměnu člena jedné z těchto skupin za jiného. Takovéto záměny reziduí mohou být vneseny do oblastí R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 a R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 , které jsou homologní nebo nehomologní s jinými členy rodiny receptorů NGF/TNF.

Specifické mutace sekvencí R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 nebo R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 mohou zahrnovat substituci nepřírozené(non-native) aminokyseliny na N-konci, C-konci nebo na jakémkoliv místě proteinu, které je modifikováno přidáním N-vázaného nebo O-vázaného karbohydrátu. Takovéto modifikace mohou být zvláště užitečné, například při přidání aminokyseliny (např. cysteinu), což je výhodné pro připojení ve vodě rozpustného polymeru při tvorbě derivátů, jak je popsáno dále. Příklad je vidět na obrázku 5, kde přirozeně se vyskytující Asn¹⁰⁵ v sTNFR-I je zaměněn za Cys pro usnadnění připojení molekuly polyethylenglykolu (příklad I).

Sekvence R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 nebo R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 může být dále modifikována s cílem přidat glykosylační místo nebo odstranit N-vázané nebo O-vázané glykosylační místo. Asparaginové rozpoznávací místo pro glykosylační připojení zahrnuje tripeptidovou sekvenci, která je specificky rozpoznána příslušným buněčným glykosylačním enzymem. Tyto tripeptidové sekvence jsou Asn-Xaa-Thr nebo Asn-Xaa-Ser, kde Xaa může být jakákoliv aminokyselina jiná než Pro. Prokázaná nebo předpovězená asparaginová rezidua sTNFR-I existují na pozicích 14, 105 a 111. Prokázaná nebo předpovězená asparaginová rezidua sTNFR-II existují na pozicích 149 a 171. Pro modifikaci nebo přidání N-vázaných nebo O-vázaných glykosylačních míst se může provést řada aminokyselinových substitucí nebo delecí a výsledkem je protein s pozměněnou glykosylací.

Ve specifickém provedení jsou varianty v podstatě homologní s aminokyselinovou R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 nebo R_4 -[Cys³²-Cys¹¹⁵]- R_5 . Termín „v podstatě homologní“, jak je zde použit, znamená stupeň homologie, který přednostně přesahuje 70 %, nebo lépe je vyšší než 80 %, vyšší než 90 % a nejlépe je dokonce vyšší než 95 %. Procento homologie zde popsané se vypočítá jako procento aminokyselinových zbytků nalezených v menší ze dvou sekvencí, které se shodují s identickými aminokyselinovými rezidui v porovnávané sekvenci, přičemž se v délce 100 aminokyselin mohou zavést čtyři mezery (gaps) pro usnadnění tohoto porovnání tak, jak je uvedeno v Dayhoff (1972), v Atlas of Protein Sequences and Structure, 5:124, National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C., jehož popis je zde zahrnut odkazem. Jako v podstatě homologní jsou také zahrnuty zkrácené sTNFRs, které mohou být izolovány díky křížové reakci protilátek se sekvencí aminokyselin v SEQ ID NO:2 a SEQ ID NO: 35, v u vedeném pořadí, nebo jejichž geny mohou být izolovány pomocí hybridizace s DNA SEQ ID NO:1 nebo SEQ ID NO:34, nebo s jejich segmenty.

Příklady sTNFRs podle předkládaného vynálezu zahrnují následující molekuly: NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FC-COOH (také uváděná jako sTNFR-I 2.6D/C105); NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (také uváděná jako sTNFR-I 2.6D/C106); NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FN-COOH (také uváděná jako sTNFR-I 2.6D/N105); NH₂-MYIHPQNNSIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (také uváděná jako sTNFR-I 2.3D/d8); NH₂-M-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COH (také uváděná jako sTNFR-I 2.3D/d15), buďto methionylované nebo nemethionylované, a jejich varianty a deriváty.

Příprava variant zkrácených sTNFRs je popsána podrobněji níže. Takovéto varianty se mohou připravit zavedením odpovídajících nukleotidových změn do DNA kódující zkrácené sTNFRs nebo *in vitro* chemickou syntézou požadovaných zkrácených sTNFRs. Odborníci dále zajisté pochopí, že se může provést mnoho kombinací delecí, inzercí a substitucí za předpokladu, že výsledné sTNFRs jsou biologicky aktivní.

Techniky mutagenese pro záměnu, inzerci nebo delecí jednoho nebo více vybraných aminokyselinových reziduí jsou odborníkům známy (např. patent US 4 518 584, jehož popisu je zde zahrnut odkazem). Při konstrukci každé varianty sekvence aminokyselin se uplatní dvě základní proměnné, a to umístění mutačního místa a povaha mutace. Při návrhu každé varianty bude umístění každé mutace a její povaha záviset na modifikované biochemické charakteristice (či modifikovaných biochemických charakteristikách). Každé mutační místo může být modifikováno individuálně nebo v sérii, např. (1) nejprve substitucí s výběry konzervativních aminokyselin a poté s radikálnějším výběrem v závislosti na dosaženém výsledku, (2) odstraněním cílového aminokyselinového rezidua, nebo (3) včleněním aminokyselinových reziduí do sousedství vybraného místa.

Chemicky modifikované deriváty nebo zkrácené sTNFRs může odborník připravit zde popsáním postupem. Konjugáty se mohou připravit použitím glykosylovaných, neglykosylovaných nebo deglykosylovaných zkrácených sTNFRs. Typicky se použijí neglykosylované zkrácené sTNFRs. Mezi vhodné chemické sloučeniny pro úpravu zkrácených sTNFRs patří ve vodě rozpustné polymery.

Ve vodě rozpustné polymery jsou žádoucí, protože protein, ke kterému jsou připojeny, nebude precipitovat ve vodném prostředí, jako například ve fyziologickém prostředí. Je žádoucí, aby polymer byl farmaceuticky přijatelný pro přípravu terapeutických produktů nebo směsí. Odborník bude schopen vybrat příslušný polymer v závislosti na úvaze, zda konjugát polymer/protein bude použit terapeuticky, a v kladném případě je volba zvažována vzhledem k žádoucí dávce, cirkulační době a odolnosti k proteolýze.

Mezi vhodné, klinicky akceptovatelné, ve vodě rozpustné polymery patří, bez omezení, polyethylenglykol (PEG), polyethylenglykolpropionaldehyd, kopolymery ethylenglykolu/propylen glykolu, monomethoxypolyethylenglykol, karboxymethylcelulóza, dextran, polyvinylalkohol (PVA), polyvinylpyrrolidon, poly-1,3-dioxalan, poly-1,3,6-trioxan, kopolymer ethylenu/anhydridu kyseliny maleinové, poly(β -aminokyselin) (buď homopolymer nebo náhodné kopolymery), poly-(n-vinylpyrrolidon) polyethylenglykol, homopolymery polypropylen glykolu (PPG) a další polyalkylenové oxidy, kopolymery polypropylenoxid/ethylenoxidu, polyoxyetylované polyoly (POG) (např. glycerol), polyoxyetylovaný sorbitol nebo polyoxyetylovaná glukóza, kolonové kyseliny (colonic acids, produkt *E. coli*) nebo jiné karbohydrátové polymery, Ficoll nebo dextran a jejich směsi.

Polyethylenglykolem se zde rozumí jakákoliv z forem, která byla použita k přípravě derivátů jiných proteinů, jako např. mono-(C₁-C₁₀)alkyloxy- nebo aryloxypolyethylenglykol. Vzhledem ke své stabilitě ve vodě může při výrobě být vhodný polyethylenglykolpropionaldehyd.

Každý z ve vodě rozpustných polymerů může mít jakoukoliv molekulovou hmotnost a může být rozvětvený nebo nerozvětvený. Tyto ve vodě rozpustné polymery mají obvykle průměrnou molekulovou hmotnost v intervalu přibližně 2 kDa až přibližně 100 kDa (termín „přibližně“ naznačuje, že v preparátech ve vodě rozpustných polymerů se vyskytují některé molekuly s vyšší nebo naopak nižší molekulovou hmotností, než je uvedená molekulová hmotnost). Preferovaná průměrná molekulová hmotnost ve vodě rozpustných polymerů se pohybuje mezi přibližně 5 kDa až přibližně 50 kDa, lépe mezi přibližně 12 kDa až přibližně 40 kDa a nejlépe mezi přibližně 20 kDa až přibližně 35 kDa.

Obecně platí, že čím vyšší je molekulová hmotnost nebo čím více je daný polymer rozvětvený, tím vyšší je poměr polymer:protein. V závislosti na požadovaném terapeutickém profilu (např. délka postupného uvolňování; vlivy, existují-li, na biologickou aktivitu; snadno manipulace; stupeň nebo absence antigenicity a jiné známé účinky ve vodě rozpustných polymerů na terapeutické proteiny) se mohou použít polymery o jiných velikostech.

Každý z ve vodě rozpustných polymerů by měl být k proteinu připojen s ohledem na ovlivnění funkčních nebo antigenních domén proteinu. Obecně lze říci, že derivatizace může být provedena

za podmínek vhodných pro reakci proteinu s aktivovanou molekulou polymeru. Mezi aktivovatelné skupiny polymeru, které mohou být použity pro připojení polymeru k aktivním zbytkům na proteinu, patří skupina: sulfonová, maleinimidová, sulfhydrylová, thiolová, triflátová, tresylátová, azidirinová, oxiranová a 5-pyridylová.

5 Obvykle jsou ve vodě rozpustné polymery připojeny k proteinu na α - nebo ϵ -aminoskupinách aminokyselin nebo k reaktivní thiolové skupině, avšak je rovněž zamýšleno připojení skupiny ve vodě rozpustného polymeru k jakékoliv reaktivní skupině proteinu, která je za vhodných reakčních podmínek dostatečně reaktivní pro připojení ke skupině polymeru rozpustnému ve vodě.
10 Polymer rozpustný ve vodě může tudíž být kovalentně navázán k proteinu prostřednictvím reaktivních skupin, jako například volné aminoskupiny nebo karboxylové skupiny. Aminokyselinové zbytky s volnou aminoskupinou mohou zahrnovat lysinová rezidua a N-koncové aminokyselinové zbytky. Aminokyseliny s volnou karboxylovou skupinou mohou zahrnovat zbytky kyseliny asparagové, zbytky kyseliny glutamové a zbytky aminokyselin na C-konci. Aminokyselinami s reaktivní thiolovou skupinou mohou být cysteinová rezidua.

Postupy pro přípravu proteinů konjugovaných s polymery rozpustnými ve vodě budou obecně zahrnovat následující kroky: (a) reakci proteinu s polymerem rozpustným ve vodě za podmínek, kdy se protein připojí k jednomu nebo více ve vodě rozpustných polymerům, (b) získání reakčního produktu. Reakční podmínky pro každou konjugaci mohou být zvoleny z podmínek v současnosti známých nebo z podmínek v budoucnu vyvinutých, nicméně tyto podmínky by měly být zvoleny tak, aby se vyloučilo nebo omezilo působení reakčních podmínek, jako je teplota, rozpouštědla nebo hodnota pH, které by mohly inaktivovat modifikovaný protein. Obecně lze říci, že se optimální reakční podmínky pro reakce určí případ od případu na základě známých parametrů a požadovaného výsledku. Například, čímž větší bude poměr ve vodě rozpustný polymer/protein v konjugátu, tím větší bude procento konjugovaného produktu. Optimální poměr (ve smyslu účinnosti reakce, takže nedochází k přebytku nezreagovaného proteinu nebo polymeru) může být určen takovými faktory, jako je stupeň derivatizace (např. mono-, di-, tri- atd.), molekulová hmotnost vybraného polymeru, to, zda je polymer rozvětvený nebo nerozvětvený, a použité reakční podmínky. Poměr ve vodě rozpustného proteinu (např. PEGu) ku proteinu bude obecně v rozsahu 1:1 až 1:100. Z každé směsi se může získat standardními purifikačními technikami, jakými jsou například mimo jiné dialýza, vysolování, ultrafiltrace, iontová výměnná chromatografie, gelová filtrační chromatografie a elektroforéza, jeden nebo více purifikovaných konjugátů.

35 Může se vyskytnout požadavek na protein chemicky modifikovaný na N-konci. Ve vodě rozpustný polymer může být zvolen na základě molekulové hmotnosti, větvení atd., podílu ve vodě rozpustného polymeru k proteinovým (nebo peptidovým) molekulám v reakční směsi, typu prováděné reakce a způsobu získání zvoleného proteinu na N-koncově chemicky modifikovaném proteinu. Způsobem k získání proteinu chemicky modifikovaného na N-konci (tj. oddělením takového produktu od ostatních monoderivatizovaných složek, je-li to nezbytné) může být purifikace proteinu chemicky modifikovaného na N-konci z populace chemicky modifikovaných proteinových molekul. Selektivní chemická modifikace na N-konci se může provést redukční alkylací, která využije rozdíl reaktivity odlišných typů primárních aminoskupin (lysin oproti N-konci) dostupných v určitém proteinu pro deprivatizaci daného proteinu. Za vhodných reakčních podmínek se dosáhne v podstatě selektivní derivatizace proteinu na N-konci s polymerem obsahujícím karbonylovou skupinu. Například je možné selektivně připojit ve vodě rozpustný polymer k N-konci proteinu provedením reakce při pH, které umožní využít výhodu rozdílů v hodnotách pK_a mezi ϵ -aminoskupinou lysinových zbytků a

50 α -aminoskupinou N-koncové aminokyseliny daného proteinu. Takovouto selektivní derivatizací se řídí připojení ve vodě rozpustného polymeru k proteinu: konjugace s polymerem se uskuteční přednostně na N-konci proteinu a nedochází k významné modifikaci ostatních reakčních skupin, jako třeba aminoskupin na lysinovém postranním řetězci. Při redukční alkylaci může být ve vodě rozpustný polymer stejného typu, jak je popsáno výše, a měl by mít jednu reaktivní aldehy-

dovou skupinu použitelnou k vazbě na proteinu. Může se použít polyethylenglykolpropionaldehyd obsahující jednu reaktivní aldehydovou skupinu.

Předkládaný vynález se konkrétně zabývá chemicky upravenými proteiny, které obsahují mono- nebo poly- (např. 2–4) PEG složky. Pegylace může být provedena jakoukoliv reakcí v současnosti za tímto účelem používanou. Postupy sloužící k přípravě pegylovaného proteinového produktu zpravidla zahrnují tyto kroky: (a) reakci proteinového produktu s polyethylenglykolem (například s reaktivním esterem nebo aldehydovým derivátem PEGu) za podmínek, které umožní připojení proteinu k jedné nebo více molekulám polyethylenglykolu; a (b) získání reakčního produktu (reakčních produktů). Obecně lze říci, že optimální reakční podmínky těchto reakcí se stanoví případ od případu na základě známých parametrů a požadovaném výsledku.

Odborníkům je známo množství způsobů pro připojení polymeru rozpustného ve vodě k proteinu. Například přihláška EP 0 401 384, jejíž popis je zde zahrnut odkazem; viz také Malik et al. (1992), Exp. Hematol., 20:1028–1035; Francis (1992); Focus on growth Factors, 3(2):4–10 (publikováno Mediscript, Mountain Court, Friern Barnet Lane, London N20 OLD, UK); přihlášky EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; WO 95/34326; a ostatní zde citované publikace, které se vztahují k pegylacím, jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

Pegylace se může konkrétně provést acylační reakcí nebo alkylační reakcí s reaktivní molekulou polyethylenglykolu. Mezi proteinové produkty podle předkládaného vynálezu patří pegylované proteiny s navázanou (navázanými) molekulou (molekulami) polyethylenglykolu, kde je (jsou) tato (tyto) molekula (molekuly) připojena (připojeny) prostřednictvím acylových nebo alkyl-ových skupin. Takovéto produkty mohou být monopegylované nebo poly-pegylované (např. obsahují 2–6 a výhodně 2–5 PEG skupin). PEG skupiny jsou obecně připojené k proteinu na α - nebo ϵ -aminoskupinách aminokyselin, nicméně do rozsahu vynálezu rovněž spadá připojení těchto PEG skupin k jakékoliv aminoskupině připojené k proteinu, která je dostatečně reaktivní na to, aby mohlo být za vhodných reakčních podmínek připojena k PEG skupině.

Pegylace acylací obecně zahrnuje reakci aktivního esterového derivátu polyethylenglykolu (PEG) s proteinem. Polymer (polymery) vybraný pro acylační reakci by měl mít jednu reaktivní esterovou skupinu. Pro pegylaci se může použít jakákoliv známá nebo následně objevená reaktivní PEG molekula. Preferovaným aktivovaným PEG esterem je PEG esterifikovaný s N-hydroxysukcinimidem (NHS). „Acylací“ se zde bez jakýchkoliv omezení rozumí následující typy vazeb mezi terapeutickým proteinem a polymerem rozpustným ve vodě, jakým je např. PEG: amidová, karbamátová, uretanová a podobné (viz Chamow (1994), Bioconjugate Chem., 5 (2):133–140; jehož popis je zde zahrnut odkazem). Jako reakční podmínky mohou být zvoleny jakékoliv podmínky v současnosti používané nebo v budoucnosti objevené, nicméně je třeba se vyhnout podmínkám, jako například teplotě, rozpouštědlu a hodnotě pH, které by vedly k inaktivaci modifikovaných proteinů.

Výsledkem pegylace acylací bude zpravidla polypegylovaný protein. Ve výhodném provedení je spojující vazbou vazba amidová. Rovněž je výhodné, aby výsledný produkt byl v podstatě pouze (např. z více než 95 %) mono-, di- nebo tri-pegylován. Nicméně, může také dojít ke vzniku některých produktů s vyšším stupněm pegylace v množstvích závislých na použitých specifických reakčních podmínkách. Je-li to žádoucí, mohou se ze směsi oddělit čistší pegylované produkty (zejména od nezreagovaných reaktantů) standardními purifikačními postupy, mezi které patří například: dialýza, vysolování, ultrafiltrace, iontová výměnná chromatografie, gelová filtrační chromatografie a elektroforéza.

Pegylace alkylací obecně zahrnuje reakci koncového aldehydového derivátu PEGu s proteinem za přítomnosti redukčního činidla. Pro reakci redukční alkylací by vybraný protein (proteiny) měl(y) mít jednu reaktivní aldehydovou skupinu. Příkladem reaktivního PEG aldehydu je polyethylenglykolpropionaldehyd, který je ve vodě stabilní, nebo jeho mono C1 až C10 alkyloxy nebo aryloxy deriváty (viz patent US 5 252 714, jehož popis je zde zahrnut odkazem).

Výsledkem pegylace alkylací může také být protein s více PEG molekulami (poly-pegylovaný). Kromě toho je možné ovlivnit reakční podmínky s cílem podstatně upřednostnit pegylaci jenom na α -aminoskupině na N-konci proteinu (tj. proteinu s jednou PEG molekulovou, mono-pegylovaný protein). V obou případech (monopegylace nebo polypegylace) jsou PEG skupiny výhodně připojeny k proteinu přes $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ skupinu. Pokud jde o $-\text{CH}_2-$ skupinu, tento typ vazby je zde zmiňován jako „alkylová“ vazba.

Redukční alkylace sloužící k přípravě v podstatě homogenní populace produktu monopolymer/protein bude obvykle zahrnovat následující kroky: (a) reakci proteinu s reaktivní molekulovou PEG za podmínek pro redukční alkylaci a při pH umožňujícím selektivní modifikaci α -aminoskupiny na aminokonci daného proteinu, a (b) získání reakčního produktu (produktů). Příprava derivátů redukční alkylací pro produkci produktů s jednou molekulovou PEG využívá rozdílů v hodnotách pak mezi aminoskupinami lysinu a α -aminoskupinou na N-konci (hodnota pak odpovídá hodnotě pH, při kterém je 50 % aminoskupin protonizováno a 50 % protonizováno není).

Tato reakce je prováděna při hodnotě pH, která umožní využít rozdílů v hodnotách pKa mezi ϵ -aminoskupinami lysinových reziduí a α -aminoskupinou rezidua na N-konci proteinu. Obecně lze říci, že při nižších pH bude žádoucí použít větší nadbytek polymeru vzhledem k proteinu (tj. čím méně reaktivní je N-koncová α -aminoskupina, tím větší množství polymeru je nutno použít k dosažení optimálních podmínek). Jestliže je hodnota pH vyšší, nemusí být poměr polymeru ku proteinu tak vysoký (tj. jsou dostupné reaktivnější skupiny, takže je zapotřebí méně molekul polymeru). Pro účely předkládaného vynálezu bude hodnota pH zpravidla v rozsahu 3–9, a ve výhodném provedení 3–6. Pro redukční alkylaci by redukční činidlo mělo být stabilní ve vodných roztocích a ve výhodném provedení by redukční činidlo také mělo být schopné redukovat pouze Schiffovu bázi vytvořenou v počátku procesu redukční alkylace. Vhodná redukční činidla mohou být vybrána z borohydridu sodného (tetrahydroboritan sodný), kyanoborohydridu sodného, dimethylaminboranu, trimethylaminboranu a pyridinboranu. Zvláště vhodným redukčním činidlem je kyanoborohydrid sodný. Ostatní reakční parametry, jako je například rozpouštědlo, reakční čas, teplota a způsob purifikace produktu, mohou být určeny případ od případu na základě publikovaných informací týkajících se přípravy derivátů proteinů s polymery rozpustnými ve vodě.

Při takovéto selektivní přípravě derivátů probíhá připojení ve vodě rozpustného polymeru (který obsahuje reaktivní skupinu, jako například aldehyd) k proteinu. Konjugace s polymerem proběhne přednostně na N-konci proteinu a nedojde k významné modifikaci ostatních reaktivních skupin, jako jsou aminoskupiny lysinového postranního řetězce. Preparát bude typicky tvořen z více než 90 % konjugátem homopolymer/protein (zpravidla z více než 95 % konjugátem monopolymer/protein), přičemž ostatní pozorovatelné molekuly budou nezreagované (tj. protein postrádající molekulu polymeru).

Specifickým provedením podle předkládaného vynálezu je použití nevětvené monomethoxy-polyethylenglykolaldehydové molekuly s průměrnou molekulovou hmotností buď přibližně 20 kDa, nebo přibližně 33 kDa (např. v rozmezí 30 kDa až 35 kDa), nebo terciárního butyl polyethylenglykolaldehydu s průměrnou molekulovou hmotností přibližně 33 kDa (např. v rozmezí 30 kDa až 35 kDa) konjugovaných redukčních alkylací k sTNFR-I 2.6D/N105.

Pegylace také může být specificky provedena s použitím ve vodě rozpustných polymerů obsahujících alespoň jednu reaktivní hydroxyskupinu (např. polyethylenglykol), které mohou reagovat s činidlem nesoucím reaktivní karbonylovou, nitrilovou nebo sulfonovou skupinu pro přeměnu hydroxylové skupiny na reaktivní Michaelův akceptor. Tím se vytvoří „aktivovaná spojka“ (linker) použitelná k modifikaci nejrozličnějších proteinů za účelem poskytnutí zlepšených biologických aktivních konjugátů. Termín „reaktivní karbonyl, nitril nebo sulfon“ znamená karbonylo-

vou, nitrilovou nebo sulfonovou skupinu, ke které je připojena dvouhlíková skupina nesoucí na druhém uhlíku reaktivní místo pro specifickou reakci s triolovou skupinou (WO 92/16221).

- 5 Aktivované spojky mohou být monofunkční, bifunkční nebo multifunkční. Užitečnými činidly nesoucími reaktivní sulfonovou skupinu, které mohou být použité v těchto postupech jsou, bez omezení, chlorsulfon, vinylsulfon a divinylsulfon.

10 V jednom provedení je ve vodě rozpustný polymer aktivován Michaelovým akceptorem. WO 95/13312 popisuje (kromě jiného) ve vodě rozpustné, sulfonem aktivované polyethylenglykoly, které jsou vysoce selektivní pro vazbu ke triolovým skupinám namísto aminoskupin na moleku-
lách nebo na površích. Tyto deriváty PEGu jsou v delším časovém intervalu odolné vůči hydro-
lyze ve vodném prostředí při hodnotách pH přibližně 11 nebo méně, a mohou vytvářet vazby
s molekulami za tvorby konjugátů, které jsou rovněž stabilní vůči hydrolyze. Vazba, kterou jsou
konjugovány PEGy a biologicky aktivní molekula, zahrnuje sulfonovou skupinu připojenou ke
15 thiolové skupině a má strukturu $\text{PEG-SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-W}$, kde symbol W představuje biolo-
gicky aktivní molekulu a kde činidlem nesoucím sulfonovou skupinu je vinylsulfon nebo aktivní
ethylsulfon. Dvěma zvláště užitečnými homobifunkčními deriváty jsou PEG-bis-chlorsulfon
a PEG-bis-vinylsulfon.

- 20 PCT Mezinárodní přihláška č. US 96/19459 (WO 97/32607), jejíž popis je zde zahrnut odkazem, uvádí postup přípravy sulfonem aktivovaných linkerů získáním sloučeniny s reaktivní hydroxy-
lovou skupinou a přeměnou také hydroxylové skupiny na reaktivní Michaelův akceptor, čímž je
vytvořena aktivovaná spojka, přičemž jako rozpouštědlo se při konverzi použije tetrahydrofuran
(THF). PCT Mezinárodní přihláška č. US 96/19459 (WO 97/32607), jejíž popis je zde zahrnut
25 odkazem, uvádí postup pro purifikaci aktivovaných spojen, který využívá chromatografii
s hydrofobními interakcemi k separaci linkerů podle velikosti a funkčnosti koncové skupiny.

Předkládaný vynález se konkrétně zabývá následujícími prokaryontně exprimovanými moleku-
lami, chemicky pozměněnými tak, aby obsahovaly poly- (např. 2 až 4) PEG složky, kterými
30 jsou: 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, buďto methionylované, nebo nemethionylované
a jejich varianty.

35 Polyvalentní forma (formy)

Může se také připravit polyvalentní forma (formy), tj. molekuly obsahující více než jednu aktivní
složku. V jednom provedení může mít molekula TNF ligandu více vazebných míst pro faktor
nekrotizující tumory (např. kombinace zkráceného sTNFR produktu). Molekula má dále nejméně
40 jedno vazebné místo pro faktor nekrotizující tumory a (v závislosti na požadovaných vlastnostech
polyvalentní formy) nejméně jedno vazebné místo pro jinou molekulu (např. kombinace nejméně
jednoho zkráceného sTNFR produktu a nejméně jednoho antagonisty receptoru interleukinu-1
(„IL-1ra“), jak je popsáno dále.

45 V dalším provedení se také mohou vytvořit polyvalentní formy, např. chemickým spojením nej-
méně jednoho zkráceného sTNFR produktu s jinou sloučeninou, výhodně jiného zkráceného
produktu sTNFR, s jakoukoliv klinicky akceptovatelnou spojkou (linkerem) (např. ve vodě roz-
pustným polymerem, jak je popsáno dále). V zásadě by spojka neměla dodávat novou imunoge-
nicitu (vzhledem k novým aminokyselinovým reziduíům nebo pozměňovat hydrofobicitu a nábo-
50 jovou rovnováhu struktury tak, aby došlo ke škodlivému ovlivnění její biodistribuce a odbourá-
vání.

Jestliže jsou takovéto polymery použity jako spojky, mohou jimi být homopolymery, náhodné
nebo blokové kopolymery a terpolymery založené na výše uvedených monomerech, nerozvětve-
né nebo rozvětvené, substituované nebo nesubstituované. Polymer může mít jakoukoliv délku
55

nebo molekulovou hmotnost, avšak tyto charakteristiky mohou ovlivnit biologické vlastnosti. Průměrná molekulová hmotnost polymerů zvláště vhodná ke snížení rychlosti odbourávání ve farmaceutických aplikacích se pohybuje v rozmezí 2000 až 35 000 daltonů. Pro optimalizaci nebo vytvoření požadovaných biologických aktivit může být délka polymeru navíc rozmanitá.

5

Mezi aktivované skupiny, které se mohou požit pro připojení ve vodě rozpustného polymeru ke dvěma nebo více proteinům, patří následující: skupina sulfonová, maleinová, sulphydrylová, thiolová, triflátová, tresylátová, azidirinová, oxiranová a 5-pyridylová.

10

Ve specifickém případě se mohou bifunkční nebo multifunkční aktivované spojky s alespoň jedním Michaelovým akceptorem připravit podle patentové přihlášky US 08/473 809 a purifikovat podle patentové přihlášky US 08/611 918.

15

Aktivní složky mohou být připojeny použitím konvenčních připojovacích technik (viz PCT publikovaná přihláška WO 92/1622 a viz PCT publikovaná přihláška WO 95/34326, jejichž popis je zde zahrnut odkazem). Kromě toho PCT publikovaná přihláška WO 92/16221 popisuje přípravu různých dimerizovaných sTNFR-I inhibitorových molekul, např. dimerizovaný c105 sTNFR-I. Příkladný polyvalentní vazebný protein k faktoru nekrotizujícím tumory, který má vzorec (sTNFR-I 2.6D/C106)₂-(20kDa PEG), je uveden v příkladu I.

20

25

V jiném provedení může bivalentní molekula sestávat ze dvou tandemových opakování zkrácených sTNFR produktů oddělených oblastí polypeptidového linkeru. Volba polypeptidových spojek je podobná návrhu vložení krátké smyčky sekvencí mezi domény u *De novo* navrhovaných proteinů (Mutter (1998), TIBS, 13:260–265 a Regan a DeGrado (1988), Science, 241:976–978, jejichž popis je zde zahrnut odkazem). Ukázalo se, že spojka vhodná pro jednořetězcové protilátky je účinná pro vytvoření dimérické formy rekombinantního lidského sTNFR-II (Neve et al. (1996), Cytokine, 8(5):365–370, jehož popis je zde zahrnut odkazem). Několikrát odlišných konstruktů spojen bylo připraveno (a úspěšně použito u protilátek); nejuspěšnější funkční spojky mají velikost mezi 12 až 25 aminokyselinami (aminokyseliny mající nereaktivní postranní skupiny, např. alanin, serin a glycin), které společně vytváří hydrofilní sekvenci s několika opačně nabitými zbytky pro zvýšení rozpustnosti a jsou flexibilní (Whitlow a Filpula (1991), Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:97–105 a Brigido et al. (1993), J. Immunol., 150:469–479, jejichž popis je zde zahrnut odkazem).

30

35

V jiném provedení mohou být zkrácené sTNFRs chemicky připojené k biotinu a konjugáty biotin/zkrácené sTNFRs se dále mohou vázat na avidin, čímž vznikne tetravalentní molekula avidin/biotin/zkrácený sTNFR. Zkrácené sTNFR mohou být také kovalentně připojené k dinitrofenolu (DNP) nebo k tetranitrofenolu (TNP) a výsledný konjugát je precipitován s anti-DNP nebo s anti-TNP IgM za tvorby dekamérních konjugátů s hodnotou valence 10 pro TNF vazebná

40

45

50

Ještě v dalším provedení se mohou připravit rekombinantní fúzní proteiny se zkráceným sTNFR, kde každá rekombinantní chimérická molekula má sekvenci sTNFR takovou, jak je popsáno výše, kterou jsou substituovány buďto jedna, nebo obě imunoglobulinové molekuly těžkých a lehkých řetězců, a mající celé nebo části konstantních domén, avšak nejméně jednu konstantní doménu, těžkého nebo lehkého řetězce lidského imunoglobulinu. Tak například, každý takovýto chimérický zkrácený sTNFR/IgG1 fúzní protein může být připraven ze dvou chimérických genů: chiméry zkrácený sTNFR/lidský kapa lehký řetězec (zkrácený sTNFR/Cκ) a chiméry zkrácený sTNFR/lidský gama-1 těžký řetězec (zkrácený sTNFR/Cγ-1). Po transkripci a translaci dvou chimérických genů, jak je popsáno dále, mohou genové produkty být uspořádány do jedné chimérické molekuly, ve které se zkrácený sTNFR chová jako bivalentní. Další podrobnosti vztahující se ke konstrukci takovýchto chimérických molekul jsou uvedeny v patentu US 5 116 964, PCT publikované přihlášce WO 89/09622, PCT publikované přihlášce WO 91/16437 a EP 0 315 062, jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

55

Ještě v dalším provedení mohou být připraveny rekombinantní fúzní proteiny se zkráceným sTNFR, kde každá rekombinantní chimérická molekula má sTNFR sekvenci popsanou výše a alespoň část regionu 186–401 osteoprotegrinu (OPG), jak je popsáno v Evropské patentové přihlášce č. 96309363.8, zveřejněné jako EP 870023.

Polynukleotidy

Předkládaný vynález také poskytuje polynukleotidy, které kódují zkrácené sTNFRs. Na základě uvedeného popisu a s použitím tabulky univerzálních kodonů, může průměrný odborník snadno určit všechny nukleotidové sekvence, které kódují aminokyselinové sekvence zkrácených sTNFRs. V současnosti preferované sekvence nukleových kyselin zahrnují ty polynukleotidové sekvence, které kódují 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 a 2.3D/d15. Příklady různých polynukleotidů jsou uvedeny na obrázcích 2, 3, 4, 5, 6 a 7.

Pro přípravu těchto polynukleotidů a pro expresi kódovaných proteinů se mohou použít techniky rekombinantní exprese, provedené ve shodě s popisy vysvětlenými dále. Tak například, vložení sekvence nukleové kyseliny, která kóduje zkrácený sTNFR, do vhodného vektoru, může odborník v oboru snadno vytvořit velké množství požadované nukleotidové sekvence. Tyto sekvence mohou být dále použity pro přípravu detekční sond nebo amplifikačních primerů. Alternativně může být polynukleotid kódující zkrácený sTNFR včleněn do expresních vektorů. Zavedením expresních vektorů do vhodného hostitele se může produkovat požadovaný zkrácený sTNFR ve velkých množstvích.

Jak je popsáno v dalším textu, existuje množství dostupných systémů hostitel/vektor použitelných ke zmnožení požadovaných nukleotidových sekvencí a/nebo k produkci zkrácených sTNFRs. Tyto systémy zahrnují, bez omezení, plastidové, virové a inzerční vektory a prokaryontní a eukaryontní hostitele. Odborník může přizpůsobit systém hostitel/vektor, který je schopný propagace nebo exprese heterologní DNA, pro produkci nebo expresi sekvencí podle předkládaného vynálezu.

Kromě toho odborníci dále zajisté pochopí na základě předkládaného popisu, že nové sekvence nukleových kyselin zahrnují degenerované sekvence nukleových kyselin kódující zkrácené sTNFRs, které mají sekvence uvedené v sekci Obrázky, a ty sekvence nukleových kyselin, které hybridizují (přednostně za stringentních hybridizačních podmínek) s komplementárními sekvencemi zmíněných sekvencí nukleových kyselin (Maniatis et al. (1982), Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, strany 387–389). Příkladnými stringentními hybridizačními podmínkami jsou podmínky hybridizace vpufru 4x SSC při 62–67 °C následovaná promýváním po dobu asi jedné hodiny v 0,1 x SSC při 62–67 °C. Jiným příkladem stringentních hybridizačních podmínek je provedení hybridizace v 45–55% formamidu, 4x SSC při 40–45 °C. Do rozsahu vynálezu rovněž spadají sekvence DNA, které hybridizují k sekvencím nukleových kyselin vyznačených na obrázcích 1 a 9 za mírnějších hybridizačních podmínek a které kódují zkrácené sTNFRs. Příklady takovýchto méně stringentních hybridizačních podmínek jsou 4 x SSC při 45–55 °C nebo hybridizace s 30–40% formamidem při 40–45 °C.

Předkládaný vynález také poskytuje rekombinantní konstrukty DNA obsahující DNA vektoru spolu se sekvencemi DNA kódujícími zkrácené sTNFRs. V každém takovémto DNA konstruktu je sekvence nukleové kyseliny kódující zkrácený sTNFR (s nebo bez signálních peptidů) operativně spojena s vhodnou řídicí nebo regulační sekvencí schopnou řídit replikaci a/nebo expresi zkráceného sTNFR ve vybraném hostiteli.

Rekombinantní exprese

5 Příprava polynukleotidů

Sekvence nukleových kyselin kódující zkrácené sTNFRs mohou být snadno získány různými postupy zahrnujícími, bez omezení, chemickou syntézu, screening knihovny cDNA nebo genomové knihovny, screening expresní knihovny a/nebo PCR amplifikaci cDNA. Tyto a jiné metody, použitelné pro izolaci takových sekvencí nukleových kyselin, jsou uvedeny v Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989); Ausubel et al., eds *Current Protocols in Molecular biology*, Current Protocols Press, (1994); a Berger and Kimme, *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques*, Vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA, (1987), jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

Chemická syntéza sekvencí nukleových kyselin, které kódují zkrácené sTNFRs, může být provedena s použitím v oboru dobře známých postupů, které uvádí například Engels et al., (1989) *Algew. Chem. Intl. Ed.*, 28:716–734 a Wells et al., (1985), *Gene*, 34:315, jejichž popis je zde zahrnut odkazem. Zmíněné postupy zahrnují, mimo jiné, syntézy nukleových kyselin s použitím fosfotriesterové, fosforamiditové a H-fosfonátové metody. Dlouhé sekvence nukleových kyselin, například sekvence delší než přibližně 100 nukleotidů, mohou být syntetizovány ve formě několika fragmentů. Fragmenty mohou potom být spojeny ligací dohromady tak, že vytvářejí sekvence nukleových kyselin kódující zkrácené sTNFRs. Výhodným provedením je syntéza na polymerním nosiči s použitím standardní fosforamiditové chemie.

Jinou možností získání příslušné sekvence nukleových kyselin je screening vhodné knihovny cDNA (tj. knihoven připravených z jedné nebo více tkáňového zdroje, o kterých se předpokládá, že exprimují daný protein), nebo genomové knihovny (tj. knihovny připravené z celkové genomové DNA). Zdrojem pro cDNA knihovnu je obvykle tkáň z jakéhokoliv druhu, ve které se předpokládá exprese požadovaného proteinu, ve které se předpokládá exprese požadovaného proteinu v dostatečných množstvích. Zdrojem pro genomovou knihovnu může být jakákoliv tkáň nebo tkáň z jakéhokoliv savce nebo jiného druhu, ve které se předpokládá, že nese gen kódující zkrácený sTNFR.

Hybridizační média mohou být testována na přítomnost DNA kódující zkrácený sTNFR s použitím jedné nebo více nukleotidových sond (oligonukleotidy, cDNA nebo fragmenty genomové DNA, které mají přijatelný stupeň homologie s cDNA nebo klonovaným genem), které budou selektivně hybridizovat s cDNA nebo s genem (geny) přítomnými v knihovně. Typické sondy použité pro screening kódují malou oblast sekvence DNA ze stejného nebo podobného druhu, kterým je druh, ze kterého byla připravena knihovna. Sondy mohou být také degenerované, jak je popsáno dále.

Hybridizace se obvykle provádí hybridizací (annealing) oligonukleotidové sondy nebo cDNA ke klonům za takových podmínek stringence, které brání nespecifickým vazbám, ale které umožňují navázání těch klonů, jež vykazují značný stupeň homologie se sondou nebo primerem. Typické stringentní hybridizační a promývací podmínky závisí částečně na velikosti cDNA nebo oligonukleotidové sondy (tj. počtu nukleotidů) a na tom, zda je sonda degenerovaná. Při volbě hybridizačního média je také zvažována pravděpodobnost identifikace daného klonu (tj., zda je testována cDNA nebo genomová knihovna).

Jestliže je jako hybridizační sonda použit fragment DNA (jako například cDNA), jsou typickými hybridizačními podmínkami podmínky popsané v Ausubel et al. (1994), eds., viz výše. Po hybridizaci je hybridizační médium odmyto za vhodných stringentních podmínek, které závisí na řadě faktorů, jako jsou velikost sondy, očekávaná homologie sondy a klonu, testované hybridizační

médium, počet testovaných klonů a podobně. Příklady stringentních promývacích roztoků, které mají zpravidla nízkou iontovou sílu a jsou používány při relativně vysokých teplotách, jsou následující: 0,015 M NaCl, 0,05 M citronan sodný a 0,1 % SDS při 55–65 °C; jiný promývací roztok má složení 1 mM Na₂EDTA, 40 mM NaHPO₄, pH 7,2 a 1 % SDS při teplotě přibližně 40–50 °C; další promývací roztok má složení 0,2 x SSC a 0,1 % SDS při teplotě přibližně 50–65 °C.

Existují rovněž ukázkové protokoly pro stringentní promývací podmínky, jestliže jsou to screening hybridizačních médií použity oligonukleotidové sondy. První protokol například využívá 6 x SSC s 0,05 % pyrofosfátu sodného při teplotě přibližně mezi 35–63 °C v závislosti na délce sondy. Například sondy o 14 bázích jsou promývány při 35–40 °C, sondy o 17 bázích při 45–50 °C, sondy o 20 bázích při 52–57 °C a sondy o délce 23 bází při 57–63 °C. Jestliže je pozorována vysoká intenzita nespecifických vazeb pozadí, může být teplota zvýšena o 2–3 °C. Druhý protokol využívá k promývání tetramethylamonium chlorid (TMAC). Jeden takový promývací roztok má složení 3 M TMAC, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 a 0,2 % SDS.

Jinou vhodnou metodou pro získání vhodných sekvencí nukleových kyselin je polymerázová řetězová reakce (PCR). Při této metodě je za použití enzymu reverzní transkriptázy připravena cDNA z poly(A)+RNA nebo celkové RNA. Následně jsou přidány k této cDNA dva primery, typicky komplementární ke dvěma odděleným oblastem cDNA (oligonukleotidy), kódující zkrácený sTNFR, spolu s polymerázou, jako je např. Taq polymeráza, která amplifikuje oblast cDNA mezi dvěma primery.

Oligonukleotidové sekvence zvolené jako sondy nebo primery by měly být přiměřeně dlouhé a dostatečně specifické tak, aby se minimalizovala tvorba nespecifických vazeb, ke kterým může docházet během screeningu nebo PCR amplifikace. Konkrétní sekvence sond nebo primerů je zpravidla založená na konzervovaných nebo vysoce homologních sekvencích oblastí. Sondy nebo primery mohou být případně zcela nebo částečně degenerované, tj. mohou například obsahovat směs sond/primerů, kde všechny kódují stejnou aminokyselinovou sekvenci, avšak s využitím různých kodonů. Alternativou k přípravě degenerovaných sond je umístění inosinu do některých nebo do všech pozic kodonů, které jsou mezidruhově odlišné. Oligonukleotidové sondy nebo primery mohou být připraveny postupy chemické syntézy DNA, jak bylo popsáno výše.

Jak je popsáno výše, variantní sekvence je přírodní (např. alelická varianta) nebo syntetická sekvence, která obsahuje jednu nebo více nukleotidových substitucí, delecí a/nebo inzercí při srovnání se sekvencí uvedenou na obrázcích 2, 3, 4, 5, 6 a 7, a jež vede k expresi aminokyselinové sekvence variant při porovnání s původní (wild type) aminokyselinovou sekvencí. Příprava syntetických variantních sekvencí je odborníkům dobře známá a je popsána například v Sambrook et al. (1989), viz výše a Wells et al. (1985), Gene, 34:315, jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

Vektory

DNA kódující zkrácené sTNFRs může být za účelem dalšího klonování (amplifikace DNA) nebo za účelem exprese vložena do vektorů. Vhodné vektory jsou komerčně dostupné nebo se mohou speciálně připravit. Výběr nebo konstrukce vhodného vektoru bude záviset (1) na tom, zda bude vektor použit k amplifikaci DNA nebo k expresi DNA; (2) na velikost DNA vkládané do vektoru; (3) na zamýšlené hostitelské buňce, která bude tímto vektorem transformována.

Každý z vektorů obsahuje sekvenci nukleových kyselin, která kóduje požadovaný protein, funkčně spojenou s jednou nebo více sekvencemi řídícími expresi nebo regulačními, schopnými řídit nebo jinak ovlivňovat expresi požadovaného proteinu vybranou hostitelskou buňkou. Každý vektor obsahuje různé komponenty v závislosti na jeho funkci (amplifikace DNA nebo exprese DNA) a jeho kompatibilitě se zamýšlenou hostitelskou buňkou. Komponenty vektoru zpravidla zahrnují, bez omezení, jednu nebo více z následujících sekvencí: signální sekvence, počátek replikace, jeden nebo více selekčních a markerových genů, promotory, zesilovací prvky, sekven-

ce pro ukončení transkripce a podobně. Tyto komponenty mohou být získány z přirozených zdrojů, nebo mohou být syntetizovány známými postupy.

Příkladem vhodných prokaryotních klonovacích vektorů mohou být bakteriofágy, jako např. bakteriofágy odvozené od lambdy, nebo plastidy z *E. coli*. (např. bpR322, colE1, pUC, F-faktor, a plastidy odvozené od plastidů Bluescript® (Stratagene, LaJolla, CA)). Pro uvedené účely může být použita řada dalších vhodných typů expresních vektorů známých v oboru, používaných pro hostitelské buňky popsané v dalším textu., které jsou odborníkům známa.

10 Signální sekvence

Nukleová kyselina kódující signální sekvenci může být vložena na 5' konci sekvence kódující krácený sTNFR, například může být součástí vektoru, nebo může být částí nukleové kyseliny kódující zkrácený sTNFR. Nukleové kyseliny kódující přirozené signální sekvence sTNFR-I a sTNFR-II jsou známy (EP 393 438 a EP 422 338).

Počátek replikace

Každý z expresních a klonovacích vektorů obvykle obsahuje sekvenci nukleové kyseliny, která umožňuje replikaci vektoru v jedné nebo více vybraných hostitelských buňkách. V klonovacím vektoru tato sekvence obvykle umožňuje replikaci tohoto vektoru nezávisle na replikaci chromozomální DNA hostitele a zahrnuje počátky replikace nebo autonomně se replikující sekvence. Takovéto sekvence jsou dobře známa. Počátek replikace z plazmidu bpR322 je vhodný pro většinu gram-negativních bakterií a různé počátky replikace (např. SV40, polyoma, adenovirus, VSV nebo BVP) jsou vhodné pro klonování vektorů v savčích buňkách. U savčích expresních vektorů není obvykle počátek replikace potřebný (např. počátek replikace SV40 se často používá pouze proto, že obsahuje časný promotor).

Selekční gen

Jak expresní, tak klonovací vektory typicky obsahují nějaký selekční gen. Tento gen kóduje protein „selekčního markeru“ (značky), nezbytný pro použití nebo růst transformovaných hostitelských buněk, jestliže jsou pěstovány v selekčním kultivačním médiu. Hostitelské buňky, které nejsou daným vektorem transformované, nebudou obsahovat selekční gen a proto nebudou přežívat v kultivačním médiu. Typické selekční geny kódují proteiny které: (a) propůjčují rezistenci vůči antibiotikům nebo jiným toxinům, např. vůči ampicilinu, neomycinu, methotrexátu nebo tetracyklinu; (b) komplementují autotrofní deficiencie buněk; nebo dávají životně důležité živiny, které nejsou z kultivačních médií dostupné.

Jiné selekční geny mohou být použity pro amplifikaci exprimovaných genů. Amplifikace je proces, při kterém jsou geny nutné k produkci proteinu nezbytného pro růst opětovně tandemově opakovány v chromozómech následujících generací rekombinantních buněk. Příklady vhodných selekčních markerů pro savčí buňky zahrnují dihydrofolát reduktázu (DHFR) a thymidin kinázu. Transformované buňky jsou vystaveny selekčnímu tlaku, kterému jsou schopny přizpůsobit se a přežít pouze transformované buňky, a to díky markerům přítomným ve vektorech. Selekčního tlaku je dosaženo kultivací transformovaných buněk za podmínek, při kterých je koncentrace selekčního agens v médiu postupně měněna, což vede k amplifikaci jak selekčních genů, tak DNA kódující zkrácené sTNFRs. Výsledkem je syntéza zvýšeného množství zkrácených sTNFRs z amplifikované DNA.

Například, buňky transformované selekčním genem pro DHFR jsou nejprve identifikovány kultivací všech transformantů v kultivačním médiu obsahujícím methotrexát, kompetitivní antagonistu DHFR. Při použití divokého typu DHFR jsou vhodnými hostitelskými buňkami linie buněk z vaječnicku křečka, deficientní v aktivitě DHFR (Urlaub a Chasin (1980), Proc natl. Acad. Sci., USA, 77(7):4216-4220, jehož popis je zde zahrnut odkazem). Transformované buňky jsou následně

vystaveny zvýšeným hladinám methotrexátu. To vede k syntéze mnohočetných kopií genu pro DHFR a současně s tím k syntéze mnohočetných kopií jiných DNA obsažených v expresním vektoru, jako například DNA kódující zkrácený sTNFR.

5 Promotory

Jak expresní, tak klonovací vektory typicky obsahují promotor, který je rozpoznáván hostitelským organismem a je funkčně připojen k sekvenci nukleové kyseliny kódující zkrácený sTNFR. Promotor je netranslatovaná sekvence umístěná proti směru transkripce (5') od start kodonu strukturního genu (zpravidla v rozsahu 100 až 1000 bp), která řídí transkripci a translaci dané sekvence nukleové kyseliny, jako například sekvence kódující zkrácený sTNFR. Promotor může být běžně zařazen do jedné ze dvou tříd, tj. do třídy indukibilních promotorů, nebo konstitutivních promotorů. Inducibilní promotor spouští zvýšenou transkripci DNA pod svým řízením jako odpověď na určité změny kultivačních podmínek, jako je například přítomnost nebo absence nějaké nutriční složky, nebo změna teploty. Je známá celá řada promotorů rozpoznávaných řadou potenciálních hostitelských buněk. Promotor může být funkčně připojen k DNA kódující zkrácený sTNFR tak, že je restriční enzymy odstraněn promotor ze zdrojové DNA a je včleněna požadovaná promotorová sekvence. Přirozená promotorová sekvence sTNFR-I nebo promotorová sekvence sTNFR-II může být použita k řízení amplifikace a/nebo exprese DNA kódující zkrácený sTNFR. Ve výhodném provedení se ale upřednostňuje heterologní promotor, a to za předpokladu, že umožňuje ve srovnání s nativním promotorem dosažení silnější transkripce a větších výtěžků exprimovaného proteinu a že je tento promotor kompatibilní se zvoleným hostitelským buněčným systémem, který byl vybrán k použití. K řízení amplifikace a/nebo exprese DNA kódující zkrácené sTNFRs může být například použita jakákoliv z nativních promotorových sekvencí ostatních členů rodiny NGF/TNF.

Promotory vhodné pro použití u prokaryontních v hostitelů zahrnují beta-laktamázový a laktózo-
vý promotorový systém; promotor alkalické fosfatázy; tryptofanový (trp) promotorový systém;
systém genu bakteriální luminescence (luxR) a hybridní promotory, jako například promotor tac.
Jiné známé bakteriální promotory jsou rovněž použitelné. Jejich nukleotidové sekvence byly
publikovány a odborník v oboru bude tudíž schopen s použitím linkerů nebo adaptorů, jestliže je
nutné doplnit požadovaná restriční místa, připojit tyto promotory k dané sekvenci (sekvencím).

Vhodné promotorové sekvence pro použití v hostitelských buňkách kvasinek jsou v současnosti
také dobře známé. Promotory vhodné pro použití v savčích buňkách jsou v současnosti rovněž
známé a zahrnují sekvence získané z genomu virů, jakými jsou například polyoma virus, virus
drůbežích neštovic (fowlpox virus), adenovirus (jako např. adenovirus 2), bovinní papilloma
virus, ptačí sarkomový virus), cytomegalovirus, retrovirus, virus žloutenky typu B a ve výhod-
ném provedení opičí virus 40 (SV40). Další vhodnými savčími promotory jsou heterologní savčí
promotory, například promotory proteinů tepelného šoku („heat-shock promoters“) a promotor
aktinu.

Zesilovače

Expresní a klonovací vektory obvykle obsahují zesilující sekvenci, která u vyšších eukaryot vede
k zvýšení intenzity transkripce sekvence DNA kódující zkrácený sTNFR. Zesilovače transkripce
jsou elementy DNA fungující v pozici cis, které jsou obvykle dlouhé 10 až 300 bp, a které ovliv-
ňují promotor tak, aby docházelo ke zvýšení intenzity transkripce. Zesilovače jsou relativně
orientačně a pozičně nezávislé. Mohou se nalézat jak v pozici jak ve směru 5', tak v pozici ve
směru 3' transkripční jednotky. Kvasinkové zesilovače jsou výhodně využívány s kvasinkovým
promotory. Je známo několik sekvencí zesilovačů dostupných ze savčích genů (např. genů kódu-
jících globin, elastázu, albumin, alfa fetoprotein, a inzulin). Dalšími příklady zesilujících prvků
pro aktivaci eukaryontních promotorů jsou virové zesilovače, jako například zesilovač SV40,
zesilovač časného promotoru cytomegaloviru, zesilovač polyoma viru a zesilovače adenovirů.

I když zesilovač může být jak na 3', tak na 5' konci DNA kódující zkrácený sTNFR, typicky je umístěn na 5' pozici od promotoru.

Ukončení transkripce

5 Každý z expresních vektorů použitých v eukaryotních hostitelských buňkách zpravidla obsahuje sekvenci nezbytnou pro ukončení transkripce a ke stabilizaci mRNA. Takovéto sekvence jsou běžně dostupné z 5' a někdy z 3' netranslatovaných oblastí eukaryotních DNA nebo cDNA. Tyto oblasti obsahují nukleotidové segmenty transkribované jako polyadenolované fragmenty
10 v netranslatované části mRNA kódující zkrácený sTNFR.

Konstrukce vektoru

15 Konstrukce vhodného vektoru, obsahujícího jednu nebo více z dříve zmíněných složek (společně se sekvencí kódující zkrácený sTNFR), se dosáhne standardní ligační technikou. Izolované plazmidy nebo fragmenty DNA jsou rozštěpeny, upraveny a v požadovaném pořadí ligovány ta, aby se vytvořil požadovaný vektor. Za účelem ověření správnosti vytvořené sekvence konstruktu může být ligační směs použita k transformaci *E. coli* a úspěšné transformanty mohou být selektovány pomocí známých postupů popsaných výše. Následně jsou z transformovaných buněk
20 připravena větší množství příslušného vektoru a štěpením restrikními endonukleázami a/nebo sekvencí je potvrzena přítomnost požadované konstruktu.

Také se může v savčích buňkách použít vektor sloužící k transientní expresi DNA kódující zkrácený sTNFR. Obecně lze říci, že transientní exprese zahrnuje použití expresního vektoru, který je
25 schopen účinně se replikovat v hostitelské buňce a tím dochází k akumulaci mnoha kopií tohoto expresního vektoru v dané hostitelské buňce, a následně se syntetizují vysoké hladiny požadovaného proteinu kódovaného expresním vektorem. Každý transientní expresní systém, skládající se z expresního vektoru a hostitelské buňky, umožňuje snadnou pozitivní identifikaci proteinů kódovaných klonovanými cDNA, jakož i rychlý screening takovýchto proteinů z hlediska jejich požadovaných biologických nebo fyziologických vlastností, například identifikace biologicky aktivního zkráceného sTNFR.
30

Hostitelské buňky

35 Do rozsahu vynálezu rovněž spadá množství rekombinantních hostitelských buněk, které obsahují sekvence nukleových kyselin použitelných k expresi požadovaného proteinu. Příkladně prokaryontní a eukaryotní hostitelské buňky zahrnují buňky bakteriální, savčí, hmyzí, buňky hub a kvasinek a buňky rostlinné.

40 Prokaryontní hostitelské buňky zahrnují, bez omezení, eubakterie, jako například gram-pozitivní nebo gram-negativní organismy (např. *E. coli* (HB101), DH5 α , DH10 a MC1061); zástupce rodu *Bacillus*, jako je *B. subtilis*; zástupce rodu *Pseudomonas*, jako *P. aeruginosa*; poddruhy *Streptomyces*; *Salmonella typhimurium* nebo *Serratia marcescans*. V charakteristickém provedení může být požadovaný protein exprimován v *E. coli*.

45 Mimo prokaryotních hostitelských buněk mohou být jako hostitelské buňky vhodné pro expresi zkrácených sTNFRs použity eukaryotní mikroby, jako např. vláknité houby nebo kvasinky. Z nichž eukaryotních hostitelských mikroorganismů se nejčastěji používá *Saccharomyces cerevisiae* (pekařské kvasince), nicméně dobře popsané a snadno dostupné jsou i jiné rody, druhy
50 a kmeny.

Zkrácené sTNFRs mohou být exprimované v glykosylované formě jakoukoliv z velkého počtu vhodných hostitelských buněk odvozených z mnohobuněčných organismů. Takovéto hostitelské buňky jsou schopné komplexního zpracování a glykosylačních aktivit. Většinou může být použita
55 jakákoliv buněčná kultura z vyšších eukaryotních buněk, a to jak buněk obratlovců, tak bez-

obratlových, včetně buněk rostlinných a hmyzích. V charakteristickém provedení vynálezu může být požadovaný protein exprimován s využitím buněk baculovirů.

Mohou se použít buňky obratlovců, protože jejich množení v kultuře (tkáňové kultury) je dobře známé. Příklady vhodných linií savčích hostitelských buněk zahrnují, bez omezení, například linii odvozenou z opičích ledvin CV1 transformovanou SV40 (COS-7), linii z embryonálních lidských ledvin (buňky 293 nebo buňky 293 subklonované pro růst v suspenzní kultuře), buňky z ledvin křeččích mláďat a buňky z vaječníků křečků. Dalšími vhodnými savčími buněčnými liniemi jsou, bez omezení, buňky HeLa, myši buňky L-292 buňky, linie 3T3 odvozené z myši Swiss, Balb-c nebo NIH a křeččí buněčné linie BHK nebo HaK. V charakteristickém provedení vynálezu může být požadovaný protein exprimován v buňkách COS.

Hostitelská buňka může být transfekovaná a ve výhodném provedení transformována s požadovanou nukleovou kyselinou, a to za vhodných podmínek umožňujících expresi této nukleové kyseliny. Výběr vhodných hostitelských buněk a způsoby transformace, kultivace, amplifikace, testování (screeningu) a produkce a purifikace produktu jsou odborníkům v oboru dobře známé (Gething a Sambrook (1981), *Nature*, 293:620-625 nebo alternativně Kafman et al. (1985), *Mol. Cell. Biol.*, 5(7):1750-1759, nebo patent US 4 419 446, jejichž popisy jsou zde zahrnuty odkazem). Například pro savčí buňky bez buněčné stěny se může použít postup využívající precipitaci s fosforečnanem vápenatým. Může být rovněž použita elektroporace, mikroinjekce a jiné známé techniky.

Zkrácené sTNFRs mohou být rovněž produkovány homologii rekombinací nebo pomocí rekombinantních postupů využívajících zavedení řídicích prvků do buněk, které již obsahují DNA kódující zkrácené sTNFRs. Homologní kombinace je technika původně vyvinutá k cílené modifikaci genů (targeting) pro produkci nebo opravu mutací v transkripčně aktivních genech (Kuchelapati (1989), *Prog. in Nucl. Acid Res. And Mol. Biol.*, 36:301, jehož popis je zde zahrnut odkazem). Základní technika byla vyvinuta jako metoda pro zavedení specifických mutací do specifických oblastí savčího genomu (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, jejichž popis je zde zahrnut odkazem), nebo pro opravu specifických mutací uvnitř defektivního genu (Doetschman et al. (1987), *Nature*, 330:576-578, jehož popis je zde zahrnut odkazem). Příklady takových postupů jsou popsány v patentu US 5 272 071; WO 92/01069; WO 93/03183; WO 94/12650 a WO 94/1560, jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

Při homologní rekombinaci může být DNA sekvence určená k včlenění do genomu směřována do určité oblasti genu, který je předmětem zájmu, připojením k směřující (targeting) DNA. Směřující DNA je sekvence DNA, která je komplementární (homologní) k oblasti genomové DNA. V průběhu procesu replikace se malé úseky směřující DNA, které jsou komplementární ke specifické oblasti genomu, dostanou do kontaktu s rodičovským řetězcem genomové DNA. Obecnou vlastností DNA zavedené do buněk je její schopnost hybridizace a následné rekombinace s jinými částmi endogenní DNA, a to prostřednictvím sdílených homologních oblastí. Jestliže je takový komplementární řetězec připojen k oligonukleotidu obsahujícímu mutaci nebo odlišnou sekvenci DNA, je také začleněn do nově syntetizovaného řetězce, jako výsledek rekombinace. Důsledkem korekce při syntéze DNA („proofreading“) je, že tato nová sekvence může sloužit jako templát. Přenášená DNA je tak začleněna do genomu.

Jestliže je sekvence určitého genu známé (například sekvence nukleové kyseliny pro zkrácený sTNFR), může být sekvence řídicí expresi (úsek DNA komplementární ke zvolené oblasti genu) syntetizována nebo získána jiným způsobem, jako například vhodným restrikcí štěpením nativní DNA ve specifických místech ohraničujících oblast zájmu. Tento úsek slouží jako směřující sekvence po vložení do buňky a bude hybridizovat ke své homologní oblasti uvnitř genomu. Nastane-li tato hybridizace buněk replikace DNA, bude zmíněný úsek DNA a jakákoliv další sekvence k němu připojená fungovat jako Okazakiho fragment a bude přepsán (backstitched) do nově syntetizovaného dceřiného řetězce DNA.

K úsekům směřující DNA jsou připojeny oblasti DNA, které mohou interagovat s expresí zkráceného sTNFR. Tak například, do genomu příslušné hostitelské buňky je vložen prvek promotor/zesilovač, supresor nebo exogenní prvek modulující transkripci, a to v blízkosti a v orientaci vhodné k ovlivnění transkripce DNA kódující požadovaný zkrácený sTNFR. Tento řídicí prvek nekóduje zkrácený sTNFR, ale místo toho řídí transkripci části DNA přítomné v genomu hostitelské buňky. Exprese zkráceného sTNFR není tudíž dosaženo transfekcí DNA, která kóduje sTNFR, ale použitím zacilující DNA (obsahující úseky homologii k oblastem endogenního genu, který je předmětem zájmu) připojené k regulačním segmentům DNA, jež poskytují sekvenci endogenního genu potřebné rozpoznávané signály pro transkripci zkráceného sTNFR.

Kultivace hostitelských buněk

Způsoby kultivace jednotlivých typů rekombinantních hostitelských buněk používaných k produkci požadovaného proteinu se budou lišit v závislosti na mnoha faktorech a úvahách; optimální výrobní výstup pro danou situaci bude odborníkům zřejmý bez přílišného experimentování. Rekombinantní hostitelské buňky jsou kultivovány ve vhodném médiu a exprimovaný zkrácený sTNFR je případně získán, izolován a purifikován z kultivačního média (nebo z buněk, jestliže je exprimován intracelulárně) s využitím vhodných, odborníkům známých prostředků.

Konkrétně, každá z rekombinantních buněk použitých k produkci požadovaného zkráceného sTNFR může být pěstována v médiu vhodném k indukci promotorů, selekci vhodných rekombinantních hostitelských buněk, nebo k amplifikaci genu kódujícího požadovaný zkrácený sTNFR. Do kultivačních médií mohou být (je-li to nezbytné) přidány hormony a/nebo jiné růstové faktory (například inzulin, transferin nebo epidermální růstový faktor), soli (chlorid sodný, vápník, hořčík a fosfát), pufrý (například HEPES), nukleosidy (například adenosin a thymidin), antibiotika (například gentamicin), stopové prvky (definované jako anorganické sloučeniny zpravidla přítomné v konečných koncentracích v řádu mikromolů) a glukóza nebo jiný zdroj energie. Odborníkům je rovněž zřejmé, že do kultivačních médií mohou být ve vhodných koncentracích přidány rovněž další sloučeniny. Odborníci rovněž dobře znají vhodné podmínky kultivace, jako je například teplota, pH a podobně, zvolených hostitelských buněk.

Farmaceutické přípravky

Farmaceutické přípravky budou obecně obsahovat terapeuticky účinné množství zkrácených sTNFRs a chemicky modifikovaných derivátů zkrácených sTNFRs (společně v této přihlášce označované jako „zkrácený(é) sTNFR produkty(y)“) spolu s přísadou vehikula (nosiče). Vehikulum ve výhodném provedení zahrnuje jednu nebo více farmaceuticky a fyziologicky přijatelných látek pro formaci přípravků ve směsi se zkráceným(i) produktem(y) sTNFR(s) a látkou pro řízené uvolňování.

Primární rozpouštědlo ve vehikulu může být svým charakterem vodné nebo nevodné. Vehikulum může navíc obsahovat další farmaceuticky přijatelné látky pro úpravu nebo udržování hodnot pH v rozmezí 5 až 6,5, nebo ve výhodném provedení v rozmezí 5,5 až 6 (jedná se například o pufrý, jako citrátový, fosfátový, a aminokyseliny, jako je glycin); plniva pro lyofilizované přípravky (například mannitol a glycin); látky k modifikaci nebo udržování osmolarity (např. mannitol nebo chlorid sodný); povrchově aktivní látky (např. polysorbát 20, polysorbát 80, Triton a Pluronic); viskozity; čirosti; barvy; sterility; stability (např. sacharóza a sorbitol); antioxidanty (např. siřičitan sodný a hydrogensiřičitan sodný); konzervační látky (např. kyselina benzoová a kyselina salicylová); látky pro vůni přípravku; ochucovadla a ředící činidla; látky ovlivňující rychlost rozpouštění (například solubilizáty a solubilizující látky, jako například alkoholy, polyethylen-glykoly a chlorid sodný); látky ovlivňující rychlost uvolňování; emulzifikátory; suspenzní činidla; rozpouštědla; plniva; aplikační vehikula; zředňovadla; pomocné látky (excipienty) a/nebo farmaceutické adjuvans. Rovněž lze formulovat další účinné formy podání, jako například parenterální pomalu se uvolňující přípravek, inhalační mlhy, orálně aktivní přípravky, nebo čípky. Přípravky

mohou také zahrnovat zvláštní formy polymerních sloučenin, jako například polymery erodující (rozpadající se) v celém objemu (například kopolymery kyselina polymléčná/kyselina polyglykolová (PLGA), polymerní směsi PLGA, blokové kopolymery polyethylenglykolu (PEG) a kyseliny mléčné a glykolové, poly(kyanoakryláty); polymery erodující (rozpadající se) v povrchové vrstvě (například poly(anhydridy) a poly(orthoestery)); estery hydrogelů (například polyoly Pluronic, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, kopolymery anhydrid kyseliny maleinové/alkylvinylether, celulóza, deriváty kyseliny hyaluronové, alginát, kolagen, želatina, albumin a škroby a dextrany) a jejich kompozitní směsi; neb přípravky na bázi liposomů nebo mikrokuliček. Takovéto přípravky mohou ovlivňovat fyzikální stav, stabilitu, rychlost uvolňování *in vivo* a rychlost odbourávání (clearance) *in vivo* proteinů a derivátů podle vynálezu. Optimální složení farmaceutického přípravku pro požadovaný protein bude odborníkem stanoveno v závislosti na způsobu podávání a požadovaném dávkování. Příklady farmaceutických přípravků jsou uvedeny 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 94/21235, jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

Specifické směsi pro řízené uvolňování jsou dostupné od následujících výrobců: Depotech (DepofoamTM, multivesikulární liposomy); Alkermes (ProLeaseTM mikrokuličky PLGA). V předemětném popise výraz hyaluronam zahrnuje hyaluronan, kyselinu hyaluronovou, její soli (například hyluronát sodný), estery, ethery, enzymatické deriváty a zesíťované gely kyseliny hyaluronové (například hylan). Příklady forem hyaluronanu jsou uvedené v Peyron and Balazs (1974), Path. Bio., 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; Meywers 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; patenty US 4 582 865, US 4 605 691, US 4 636 524, US 4 713 448, US 4 716 154, US 4 716 224, US 4 772 419, US 4 851 521, US 4 957 774, US 4 863 907, US 5 128 326, US 5 202 431, US 5 336 767, US 5 356 883; Evropské patentové přihlášky EP 0 507 604 (A2) a EP 0 718 312 (A2); a WO 96/05845, jejichž popis je zde zahrnut odkazem. Specifické hyaluronanové směsi jsou dostupné od následujících dodavatelů: BioMatrix, Inc. Ridgefield, NJ (SynviscTM, směs hylanu ve formě kapaliny a hylanu ve formě gelu v poměru 90:10); Fidia S.p.A. Abano Terme, Italy (HyalganTM, sodná sůl kyseliny haluronové pocházející z hřebíčků kohoutů (molekulová hmotnost přibližně 500 000 až asi 700 000)); Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan (ArtzTM, 1% roztok kyseliny hyaluronové pocházející z hřebíčků kohoutů o molekulové hmotnosti přibližně 700 000); Pharmacia AB, Stockholm, Sweden (HealonTM, kyselina hyaluronová pocházející z hřebíčků kohoutů o molekulové hmotnosti přibližně 4 x 10⁶); Genzyme Corporation, Cambridge, MA (SurgicoatTM, rekombinantní kyselina hyaluronová); Pronova Biopolymer, Inc. Portsmouth, NH (kyselina hyaluronová FCH, vysokomolekulární (molekulová hmotnost přibližně 1,5 až 2,2 x 10⁶) připravená z kultur *Streptococcus zooepidemicus*; hyaluronát sodný MV (molekulová hmotnost přibližně 1,0 až 1,6 x 10⁶) a hyaluronát sodný LV (molekulová hmotnost přibližně 1,5 až 2,2 x 10⁶); Calbiochem-Novabiochem AB, Lautelfingen, Switzerland (kyselina hyaluronová, sodná sůl (katalogové číslo 385908 v katalogu z roku 1997) připravená ze *Streptococcus sp.*); Intergen Company, Purchase, NY (kyselina hyaluronová pocházející z hřebíků kohoutů o molekulové hmotnosti přibližně 1 x 10⁶); Diosynth Inc., Chicago, IL; Amerchol Corp., Edison, NJ and Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan.

Jakmile byl farmaceutický přípravek formulován, může být tento skladován ve sterilních ampulích ve formě roztoku, suspenze, gelu, emulze, pevné látky nebo ve formě dehydratovaného nebo lyofilizovaného prášku. Přípravky mohou být skladovány buď ve formě určené k přímému použití, nebo ve formě (například lyofilizované) vyžadující před vlastní aplikací rekombinaci.

Ve výhodném provedení je provedení vynálezu směřováno k používání souprav (kitů) sloužících k přípravě jednotlivých aplikačních dávek. Zmíněné soupravy mohou obsahovat dvě nádoby: první obsahující vysušený protein a druhou obsahující kapalný přípravek. Soupravami spadajícími do rozsahu tohoto vynálezu jsou jednokomorové nebo vícekomorové předplněné injekční stříkačky, například přeplněné injekční stříkačky (např. kapalně stříkačky (liquid syringes), lyostříkačky, jako např. Lyo-Ject®, dvoukomorové předplněné lyostříkačky) které jsou dostupné od Vetter GmbH, Ravensburg, Německo.

Použití

Zkrácené sTNFR produkty mohou být užitečné jako látky pro výzkum nebo jako teoretické a diagnostické látky. Zkrácené sTNFRs se mohou použít v *in vitro* a/nebo *in vivo* diagnostických testech pro kvantifikaci množství přirozeného sTNFR-I nebo sTNFR-II ve vzorcích tkání nebo orgánů, nebo ke stanovení a/nebo izolaci buněk, které exprimují TNF (Scallan et al., (1995) viz výše). V testech tkání nebo orgánů bude, ve srovnání se standardní vazebnou křivkou ¹²⁵I-zkrácených sTNFRs, méně ¹²⁵I radioaktivity ze zkrácených sTNFRs vázajících se na TNF díky neznačenému přirozenému sTNFR-I nebo sTNFR-II vázajícímu se na TNF. Podobně ¹²⁵I-zkrácené sTNFRs se mohou použít pro detekci přítomnosti TNF v různých typech buněk.

Tento vynález rovněž zahrnuje použití zkrácených sTNFR produktů pro tvorbu protilátek a výsledné protilátky (konkrétně včetně těch, které se budou vázat také na přirozený sTNFR-I nebo sTNFR-II). Je možné připravit protilátky, které se vážou ke zkráceným sTNFRs, jako například k epitopům uvnitř aminokyselinové sekvence R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂, nebo uvnitř aminokyselinové sekvence R₄-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₅. Odborník v oboru může použít dobře známé publikované postupy k získání monoklonálních a polyklonálních protilátek nebo rekombinantních protilátek, které specificky rozpoznávají a vážou se na různé proteiny, kódované aminokyselinovými sekvencemi podle předkládaného vynálezu. Takovéto protilátky se potom mohou použít k purifikaci a charakterizaci zralého, 30kDa TNF inhibitoru o plné délce a zralého 40kDa TNF inhibitoru o plné délce.

Předkládaný vynález se také vztahuje ke způsobům léčby určitých nemocí a léčebných stavů (z nichž mnohé mohou být charakterizovány jako zánětlivé onemocnění), jež jsou zprostředkovány TNF. Onemocnění nebo léčebný stav se pokládá za „onemocnění zprostředkované TNF“, jestliže je spontánní nebo experimentální onemocnění spojeno se zvýšenými hladinami TNF v tělních tekutinách nebo tkáních přiléhajících k místu onemocnění nebo s jejich indikací uvnitř těla. Onemocnění zprostředkovaná TNF mohou být také rozpoznána za následujících podmínek: (1) patologické nálezy spojené s chorobou mohou být napodobeny experimentálně na zvířatech podáváním TNF a (2) patologický stav indukovaný na experimentálních zvířecích modelech onemocnění může být inhibován nebo odstraněn použitím látek, které inhibují působení TNF. Mnoho onemocnění zprostředkovaných TNF splňuje dvě z těchto tří podmínek, jiné pak splňují všechny tři podmínky. Neúplný seznam onemocnění zprostředkovaných TNF spolu s odpovídajícími následnými stavy a symptomy, které všechny mohou být léčeny metodami podle předkládaného vynálezu, zahrnuje: syndrom respiračních potíží u dospělých; kachexie/anorexie; rakovina (např. leukemie); syndrom chronické únavy; odmítnutí štěpu hostitelem; hyperalgesie; zánětlivé onemocnění střev; zánětlivá neurální onemocnění; ischemické/reperfúzní poškození, včetně mozkové ischemie (poškození mozku jako výsledku traumatu, epilepsie, krvácení nebo mrtvice, což ve všech případech může vést k neurodegeneracím); diabetes (např. juvenilní diabetes mellitus typu 1); roztroušená skleróza; oční onemocnění; bolest; pankreatitida; plicní fibróza; revmatoidní onemocnění (např. revmatoidní artritida, osteoartritida, juvenilní (revmatoidní) artritida, séronegativní polyartritida, ankylozující spondylitida, Reiterův syndrom a reaktivní artritida,

lupénková artritida, enteropatická artritida, polymyozitida, dermatomyozitida, sklerodermie, systematická skleróza, vaskulitida, mozková varikulitida, Sjörgenův syndrom, revmatická horečka, polychondritida a revmatická polymyalgie a arteritida velkých buněk; septický šok, vedlejší účinky radiační terapie; systémový lupus erythematoses; temporální onemocnění kloubu mandibuly; tyroiditida a transplantace tkání.

Zkrácené sTNFR produkty mohou být podávány pacientům v terapeuticky účinných množstvích pro léčbu onemocnění zprostředkovaných TNF (jako jsou definovány výše), včetně například revmatických onemocnění (jako je Lymeská nemoc, juvenilní (revmatoidní) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatoidní artritida a stafylokoky vyvolaná („septická“) artritida. Termínem „pacient“ jsou myšlena jako zvířata (např. kočky, psi, koně), tak lidé.

Zkrácený sTNFR produkt může být podáván lokálně, enterálně a parenterálně včetně (a nikoliv pouze) podání intravenózní, intramuskulární, intraarteriální, intrathekální, intrakapsulární, intraorbitální, intrakardiální, intradermální, intraperitoneální, transtracheální, subkutánní, subkutikulární, intraartikulární, subkapsulární, subarachnoidální, intraspinální, intraventrikulární a intrasternální injekcí a infuzí. Zkrácený sTNFR produkt může být také podáván perorálně nebo přes mykózní membrány, tj. intranasálně, sublinguálně, bukálně nebo rektálně; vždy se jedná o systémovou aplikaci.

Preferuje se, když jsou zkrácené sTNFR produkty aplikovány intraartikulárně, subkutánní, intramuskulární nebo intravenózní injekcí. Zkrácené sTNFR produkty mohou být také podávány kontinuální infuzí (například implantované nebo externí infuzní zařízení s regulací nebo stálý nebo přerušovaný průtok) tak, aby bylo zajištěno kontinuální dosažení požadované hladiny zkráceného sTNFR produktu v krvi po dobu podávání. Přednostně se toho dosahuje prostředky kontinuální infuze, např. minipumpou, jak oje osmotická minipumpa. Při těchto způsobech je zajištěno, že množství léčiva je udržováno na požadované úrovni a je možné odebírat vzorky krve a sledovat množství léčiva v krevním oběhu. Komerčně jsou dostupné různé typy pump od dodavatelů, jako je MiniMed Inc., Sylmar, CA (např. MT507) a AlzaCorp., Palo Alto, CA (např. osmotická pumpa Alzet, model 2MLI).

Rovněž jsou uvažovány jiné způsoby kontinuálního nebo téměř kontinuálního dávkování. Např. chemické úpravy mohou vést k formám s postupným uvolňováním proteinu, což vede k jeho stálé přítomnosti v krevním oběhu v předvídaném množství založeném na určeném dávkovém režimu.

Způsoby použití zkrácených sTNFR produktů pro léčbu onemocnění zprostředkovaných TNF zahrnujících zánětlivé stavy kloubů (např. osteoartritidu, lupénkovou, artritidu a revmatoidní artritidu) jsou popsány v Evropské patentové přihlášce EP 567 566, jejíž obsah je zde uveden odkazem. V konkrétním případě mohou být zkrácené sTNFR produkty (například při léčení revmatoidní artritidy a osteoartritidy) podávány intraartikulárně. V jiném specifickém případě (při léčení revmatoidní artritidy, zánětlivého onemocnění střev, kachexie/anorexie nebo roztroušené sklerózy) mohou být zkrácené sTNFR produkty aplikovány subkutánně nebo intramuskulárně. V dalším specifickém případě, který však neomezuje rozsah vynálezu, mohou být zkrácené sTNFR produkty podávány intravenózně pro léčbu poškození mozku jako následku traumatu, epilepsie, krvácení nebo mrtvice. Mezi preferované způsoby léčby artritidy patří: (1) jednotlivé intraartikulární injekce zkráceného sTNFR produktu podávané opakovaně podle potřeby pro prevenci nebo pro léčení propuknuvší artritidy a (2) opakované subkutánní injekce zkráceného sTNFR produktu. Zahájení léčby při septickém šoku by mělo začít co možná nejdříve po sepsi, nebo když je nebezpečí sepse diagnostikováno. Léčba může být, například, zahájena bezprostředně po chirurgickém zákroku, nebo po nehodě, nebo po jakémkoliv jiné události, se kterou je spojeno riziko septického šoku. Mezi preferované způsoby léčby při syndromu dýchacích potíží u dospělých: (1) jednotlivá nebo vícenásobná intratracheální aplikace zkrácených sTNFR produktů a (2) jednorázová dávka (bolus) nebo nepřetržitá intravenózní infuze zkrácených sTNFR produktů.

Dalším provedením vynálezu je buněčná terapie, například implantace buněk produkujících zkrácené sTNFR. Podle tohoto provedení podle předkládaného vynálezu jsou pacientovi implantovány buňky, které jsou schopné syntetizovat a vylučovat biologicky aktivní formu zkráceného sTNFr. Takovými buňkami produkujícími zkrácené sTNFRs mohou být buňky, které normálně sTNFR neprodukuje, ale které byly modifikovány pro produkci zkráceného sTNFR, nebo to mohou být buňky, jejichž schopnost produkovat zkrácený sTNFR byla získána transformací polynukleotidem vhodným pro expresi a sekreci zkráceného sTNFR. Aby se minimalizovala potenciální imunologická reakce pacientů po podání zkráceného sTNFR odlišných druhů, preferuje se, když jsou buňky ze stejného druhu jako pacient (například člověk), nebo když jsou buňky opouzdřeny materiálem, který poskytne zábrana proti jejich rozpoznávání imunitním systémem, nebo když jsou buňky umístěny do imunologicky zvláštní anatomické polohy, jako například do varlat, oka nebo centrálního nervového systému.

Lidské nebo jiné buňky mohou být implantovány pacientům v biokompatibilních, semipermeabilních polymerních obalech nebo membránách, které umožní uvolňování zkráceného sTNFR, avšak zabrání destrukci těchto produkčních buněk pacientovým imunitním systémem nebo jinými škodlivými faktory z okolních tkání. Nebo se mohou vlastní buňky pacienta, transformované mimo organismus (*ex vivo*) tak, aby produkovaly zkrácený sTNFr, implantovat pacientovi přímo bez takovýchto obalů. Metodologie zapouzdření živých buněk membránou je odborníkům v oboru známá, takže se může provést příprava opouzdřených buněk a jejich implantace pacientům.

V jiném případě je možné provádět genovou terapii *in vivo*, kdy se sekvence nukleové kyseliny kódující zkrácený sTNFr vnese přímo do pacienta. Například sekvence nukleové kyseliny, kódující zkrácený sTNFR, je vnesena do cílových buněk místní injekcí konstruktů nukleové kyseliny (s nebo bez vhodného doporučujícího vektoru, například adenoasociovaného virového vektoru). Dalšími vektory mohou být bez omezení, vektory odvozené od retrovirů, adenovirů, viru herpes simplex a papilloma viru. Fyzického přenosu se může dosáhnout *in vivo* lokální injekcí konstruktů požadované nukleové kyseliny nebo jiného vhodného transportního vektoru obsahujícího požadovanou sekvenci nukleových kyselin, liposomy zprostředkovaným přenosem, přímou injekcí (obnažená DNA), receptorem zprostředkovaným přenosem komplexem ligand-DNA) nebo bombardováním mikročásticemi (gene gun).

Příklady technik buněčné a genové terapie jsou uvedeny v patentu US 4 892 538; patentu US 5 011 472; patentu US 5 106 627; DE 4219626, WO 94/20517 a WO 96/22793, jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

Bez ohledu na způsob podání vyžaduje léčba chorob zprostředkovaných TNF dávkový nebo celkový dávkový režim zkráceného sTNFR, který je účinný pro omezení či zmírnění symptomů onemocnění. Další faktory významné při stanovení vhodného dávkování mohou zahrnovat onemocnění nebo stav, který má být léčen, nebo kterému se dá předejít, závažnost onemocnění, způsob podávání, věk, pohlaví a léčebný stav pacienta. Další zpřesnění výpočtů nezbytných pro stanovení vhodné dávky pro léčení je odborníky v oboru prováděno rutinně, zejména ve světle informací o dávkování v testech zde obsažených. Dávka může být také stanovena s použitím známých zkoušek pro určení dávkování použitých ve spojení s vhodnými údaji o odpovědi na dávky. Specifická dávka je kalkulována podle přibližně tělesné váhy nebo tělesného povrchu pacienta.

Frekvence dávkování závisí na farmakokinetických parametrech zkráceného sTNFr v použitém přípravku. Zkrácený sTNFR může být podán jednou, nebo v případě vážných a dlouhotrvajících potíží může být podáván denně v méně frekventovaných dávkách, nebo může být podáván s počátečním bolusem následovaným kontinuálními dávkami nebo postupným uvolňováním. Při parenterálním podávání může mít každá dávka například až 10 mg, nebo spíše až 15 mg, nebo ještě výhodněji než 20 mg. Při podání do kloubní dutiny je farmaceutický přípravek přednostně aplikován jako jedna injekce (např. 3–10 ml injekční stříkačkou obsahující dávku mezi 5 mg/ml

až 10 mg/ml) zkráceného sTNFr rozpouštěného v roztoku izotonického, fosfátem pufovaného fyziologického roztoku. Přípravek může být aplikován do kloubní dutiny například jednou za 7 až 10 dní. Takovýmto způsobem se provádí aplikace například 4 až 5 x, přičemž se dávka se může, je-li to nezbytné, měnit.

V některých případech mohou být zkrácené sTNFr produkty podávány jako doplněk k jiné terapii a také s jinými farmaceutickými přípravky vhodnými pro léčenou indikaci. Zkrácený sTNFR produkt a jakákoliv z tradičních nebo nových protizánětlivých látek (nebo více těchto látek) mohou být podávány samostatně nebo v kombinaci.

Zkrácené sTNFR produkty (např. proteiny R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) a jakákoliv z doplňkových protizánětlivých látek (nebo více těchto látek) mohou být podávány samostatně nebo v kombinaci. Informaci o následujících sloučeninách je možné nalézt v The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Sixteenth Edition, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co, Rahway, NJ (1992), a v Pharmaprojects, PJB Publications Ltd.

Současná léčba chorob zprostředkovaných TNF, jako jsou definovány výše, včetně akutních a chronických zánětů, jako jsou revmatická onemocnění, (např. Lymská nemoc, juvenilní (revmatoidní) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatoidní artritida, a stafylokoky vyvolaná („septická“) artritida) zahrnuje v první linii použití léčiv pro kontrolu bolesti a zánětu, klasifikovaných jako nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAIDs – non-steroidal anti-inflammatory drugs). Druhotná léčba zahrnuje kortikosteroidy, pomalu působící antirevmatická léčiva (SAARDs – slow acting antirheumatic drugs), nebo léky modifikující onemocnění (DM – disease modifying).

V charakteristickém provedení je předkládán vynález zaměřen na použití zkráceného sTNFR produktu (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) a jakéhokoliv jednoho nebo více z NSAID pro léčbu onemocnění zprostředkovaných TNF, jak jsou definována výše, včetně akutních a chronických zánětů, jako jsou revmatické choroby (např. Lymská nemoc, Juvenilní (revmatoidní) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatoidní artritida a stafylokoky vyvolaná („septická“) artritida); odmítání štěpu příjemcem. Protizánětlivý účinek NSAIDs je alespoň částečně založen na inhibici syntézy prostaglandinů (Goodman and Gilman v „The Pharmacological Basis of Therapeutics“, MacMillan, 7th Edition (1985)). NSAIDs mohou být rozděleny do devíti skupin: (1) deriváty kyseliny salicylové; (2) deriváty kyseliny propionové; (3) deriváty kyseliny octové; (4) deriváty kyseliny fenamové (fenamic acid); (5) deriváty kyseliny karboxylové; (6) deriváty kyseliny máselné; (7) oxikamy; (8) pyrazoly a (9) pyrazolony.

Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkráceného sTNFR produktu (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více deriváty kyseliny salicylové, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelnými solemi. Zmíněné deriváty kyseliny salicylové, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelné soli zahrnují: acetaminosalol, aloxiprin, aspirin, benorylát, bromosaligenin, acetylsalicylát, vápenatý, cholin magnezium trisalicylát diflusinal, etersalat, fendosal, kyselinu geltisovou, glykol salicylát, imidazol salicylát, lysin acetylsalicylát, mesalamin, morfolin salicylát, 1-naftylsalicylát, olsalazin, parsalimid, fenylacetylsalicylát, fenylsalicylát, salasalazin, Do této kyseliny rovněž patří strukturně podobné deriváty kyseliny salicylové vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

Charakteristické provedení vynálezu je směřováno s použitím zkráceného TNF produktu (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více deriváty kyseliny propionové, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelnými solemi. Zmíněné deriváty kyseliny propionové, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelné soli zahrnují: alminoprofen, benoxaprofen, kyselinu bukloxovou, karprofen, dexindoprofen, fenoprofen, flunoxaprofen, fluprofen, flurbiprofen, furkloprofen, ibuprofen, ibuprofen aluminum, ibuprofen, indoprofen, isoprofen, ketoprofen,

loxoprofen, miroprofen, naproxen, oxaprozin, piketoprofen, pimeprofen, pirprofen, pranoprofen, kyselinu protizinovou, pyridoxiprofen, suprofen, kyselinu tiaprofenovou a tioxaprofen. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobné deriváty kyseliny propionové vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

5

Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkráceného TNF produktu (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více deriváty kyseliny octové, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelnými solemi. Zmíněné deriváty kyseliny octové, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelné soli zahrnují: acemetacin; alclofenak, amfenak, bufexamak, cinmetacin, klopírak, delmetacin, diklofenak sodný, etodolak, felbinak, fenklofenak, fenklorak, kyselinu fenklozovou, fentiazak, furofenak, glukametacin, ibufenak, indomethacin, isofezolak, isoxepak, lonazolak, kyselinu metiazinovou, oxametacin, oxpinak, pimetacin, proglumetacin, sulindak, talmetacin, tiaramid, tiapinak, tolmetin, zidometacin s zomepirak. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobné deriváty kyseliny octové vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

15

Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkráceného TNF produktu (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více deriváty kyseliny fenamové, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelnými solemi. Zmíněné deriváty kyseliny fenamové, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelné soli zahrnují: kyselinu enfenamovou, etofenamát, kyselinu flufenamovou, isonixin, kyselinu meklofenamovou, meklofenamát sodný, kyselinu medofenamovou, kyselinu mefanamovou, kyselinu niflumovou, talniflumát, terofenamát, kyselinu tolfenamovou a ufenamát. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobné deriváty kyseliny fenamové vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

20

25

Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkráceného TNF produktu (například proteinu R_1 -Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více deriváty kyseliny karboxylové, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelnými solemi. Zmíněné deriváty kyseliny karboxylové, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelné soli zahrnují: clidanak, diflunisal, flufenisal, inoridin, ketorolak a tinoridin. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobné deriváty kyseliny karboxylové vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

30

35

Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkráceného TNF produktu (například proteinu R_1 -Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více deriváty kyseliny máselné, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelnými solemi. Zmíněné deriváty kyseliny máselné, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelné soli zahrnují: bumadizon, butibufen, fenbufen a xenbucin. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobné deriváty kyseliny máselné vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

40

Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkráceného TNF produktu (například proteinu R_1 -Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více oxikamy, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelnými solemi. Zmíněné oxikamy, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelné soli zahrnují: droxikam, enolikam, isoxikam, piroxikam, sudoxikam, tenoxikam a 4-hydroxyl-1,2-benzothiazin 1,1-dioxid-4-(N-fenyl)-karboxamid. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobné oxikamy vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

45

50

Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkráceného TNF produktu (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více pyrazoly, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelnými solemi.

tělnými solemi. Zmíněné pyrazoly, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelné soli zahrnují: difenamizol a epirzol. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobné pyrazoly vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

- 5 Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkráceného TNF produktu (například proteinu R_1 -Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více pyrazolony, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelnými solemi. Zmíněné pyrazolony, jejich prekurzory ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelné soli zahrnují: apazon, azapropazon, benzpiperylon, feprazon, mofebutazon, morazon, oxyfenbutazon, fenylbutazon, pipebuzo, propylfenazon, ramifenazon, suxibuzon a thiazolinobutazon. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobné pyrazoly vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

- 15 Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkráceného TNF produktu (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více z následujících NSAIDs: kyselina ϵ -acetamidokapronová, S-adenosylmethionin, kyselina 3-amino-4-hydroxymáselná, amixettrin, anitrazafen, antrafenin, benzdazak, bendaza lysinát, benzydamin, beprozin, broperamol, bukolom, bufezolak, benzydamin, beprozin, broperamol, bukolom, bufezolak, ciproquazon, kloxadamin, dazidamin, deboxamet, detomidin, difenpiramid, difenpyramid, difisalamin, ditazol, emorfazon, fanetizol mesylát, fenflumizol, floktafenin, flumizol, flunixin, fluproquazon, fopirtolin, fosfosan, guaimesal, guaimesal, guaiazolen, isonixim, lefetamin, HCl, leflunomid, lofemizol, lotifazol, lysin klonixinát, meseklazon, nabumeton, niktindol, nimesulid, orgotein, orpanoxin, oxaceprolm, oxapadol, paranylin, perisoxal, perisoxal citrát, pifoxim, piproxen, pirazolak, pifrenidon, proquazon, proxazol, thielavin B, triflamizol, timegadin, tolektin, tolpedol, tryptamid a sloučeniny označené firemními kódovými čísly, jako 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EP508, 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 (kyselina 4-benzoyl-1-indankarboxylová), TVX2706, U60257, UR2301 a WY41770. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobné NSAIDs vykazující analgetické a protizánětlivé účinky obdobné, jako mají výše uvedené NSAIDs.

- 35 Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1 -Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více s jedním nebo více kortikosteroidy, prekurzory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi pro léčbu TNF zprostředkovaných onemocnění (jak jsou definována výše), včetně akutního a chronického zánětu, jako jsou revmatická onemocnění (např. Lymská nemoc, juvenilní (revmatoidní) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatoidní artritida a stafylokoky vyvolaná („septická“) artritida); a roztroušená skleróza. Kortikosteroidy, jejich prekurzory ve formě esterů nebo jejich farmaceuticky akceptovatelné soli zahrnují hydrokortison a sloučeniny, které jsou odvozené od hydrokortisonu, jako například 21-acetoxypregnenolon, alklomerason, ageston, amcinonid, beklomethason, betamethason, valerát betamethasonu, budenosid, chlorprednison, klobetasol, propionát, klobetasolu, klobetason, butyrát klobetasonu, klokortolon, kloprednol, kortikosteron, kortison, kortivazol, deflazakon, desonid, desoximerason, dexamethason, diflorason, diflukortolon, difluprednát, enoxolon, fluazakort, flukloronid, flumethason, pivalát, flumethasonu, flunisolid, flucinolon acetonid, flucinonid, fluorocinolon acetonid, butyl fluokortin, fluokortolon, fluorokortolon, hexanoát, diflukortolon valenát, fluorometholon, fluperolon acetát, flupredniden acetát, fluprednisolon, flurandenolid, formokortal, halcinonid, halometason, haloprednon acetát, hydrokortamát, hydrokortison, hydrokortison acetát, hydrokortison butyrát, hydrokortison fosfát, sodná sůl hydrokortison 21-sukcinátu, hydrokortison tebutát, mezipredon, medryson, meprednison, methylprednikolon, nometason furoát, paramethason, prednikarbát, prednisolon, prednisolon 21-diedryaminoacetát, sodná sůl prednisolon fosfátu, sodná sůl prednisolon sukcinátu, sodná sůl 21-m-sulfobenzoátu, sodná sůl prednisolon 21-stearoglykolátu, prednisolon tebulát, prednisolon 21-trimethylacetát,

prednison, prednival, prednyliden, prednyliden 21-diethylaminoacetát, tixokortol, tramcinolon, triamcinolon acetonid, triamcinolon benetonid a triamcinolon hexacetonid. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobné kortikosteroidy vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

5 Charakteristické provedení vynálezu je směřována k použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo současná léčba) s jedním nebo více pomalu účinkujícím antirevmatickým léčivem (slow-acting antirheumatic drug, SAAED) nebo antirevmatickým léčivem modifikujícím onemocnění (disease modifying antirheumatic drug, DMARDS), jejich prekursorů ve formě esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi pro léčbu TNF zprostředkovaných onemocnění (jak jsou definována výše), včetně akutního chronického zánětu, jako jsou revmatická onemocnění (např. Lymfská nemoc, juvenilní (revmatoidní) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatoidní artritida a stafylokoky vyvolaná („septická“) artritida); a roztroušená skleróza. SAADs nebo DMARDS, jejich prekursorů ve formě esterů nebo farmaceuticky přijatelné soli zahrnují: allokupreid sodný auranofin, aurothioglukózu, aurothioglykanid, azathioprin, brequinar sodný, bucillamin, 3-aurothio-2-propanol-1-sulfonát vápenatý, chlorambucil, chloroquin, klobuzarit, kuproxolin, cyklofosfamid, cyklosporin, dapson, 15-deoxyspergualin, diacerein, glukosamin, soli zlata (např. zlatá sůl cykloquinu, thiomalát sodnozlatý, thiosíran sodnozlatý), hydroxychloroquin, hydroxy-močovinu, kebumon, levamisol, lobenzarit, melittin, 6-merkaptopurin, methotrexát, mizoribin, mykofenolát mofetin, myoral, dusíkatý yperit (nitrogen, mustard), D-penicillamin, imidazoly pyridinolu, jako například SKN86002 a SB203580, rapamycin, thioly, thymopoietin vincristin. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobné SAARDs nebo DMARDS vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

25 Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více inhibitory COX2, jejich prekursorů ve formě esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi pro léčbu TNF zprostředkovaných onemocnění (jak jsou definovány výše), včetně akutního a chronického zánětu. Inhibitory COX2, jejich prekursorů ve formě esterů nebo jejich farmaceuticky akceptovatelné soli zahrnují podobně inhibitory COX vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

35 Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více bakteriostatiky (antimicrobials), prekursorů jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi pro léčbu TNF zprostředkovaných onemocnění (jak jsou definovány výše), včetně akutního a chronického zánětu. Bakteriostatika, jejich prekursorů ve formě esterů nebo jejich farmaceuticky akceptovatelné soli zahrnují například ampicilin, amoxycilin, aureomycin, bacitracin, ceftazimid, ceftriaxon, cefotaxim, cefachlor, cefalexin, cefradin, ciprofloxacin, kyselinu klavulanovou (clavulanic acid), kloxacilin, dikloxacilin, erythromycin, flukloxacilin, gentamicin, gramicidin, methicilin, neomycin, oxacilin, penicilin a vancomycin. Do této skupiny rovněž patří strukturně podobná bakteriostatika vykazující obdobné analgetické a protizánětlivé účinky.

45 Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jednou nebo více z následujících sloučenin pro léčbu onemocnění zprostředkovaných TNF (jak jsou definována výše), včetně akutních a chronických zánětů: faktor stimulující růst kolonií granulocytů, thalidomid, BN 50730, tenidap, E 5531, tiapafant PCA 4248, nimesulid, panavir, rolipram, RP 73401, peptid T, MDL 201, 449A, (1R,3S)-cis-1-[9-(2,6-diaminopurinyl)]-3-hydroxy-4-cyklopenten hydrochlorid, (1R,3R)-trans-1-[9-(2,6-diaminopurinyl)]-3-acetoxycyklopentan, (1R,3R)-trans-1-[9-adenyl]-3-azidocyklopentan hydrochlorid a (1R,3R)-trans-1-(6-hydroxy-purin-9-yl)-3-azidocyklopentan.

Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více dalšími inhibitory TNF pro léčbu onemocnění zprostředkovaných TNF (jak jsou definována výše), včetně akutních a chronických zánětů. Inhibitory TNF zahrnují sloučeniny a chronických zánětů. Inhibitory TNF zahrnují sloučeniny a proteiny, které blokují *in vivo* syntézu nebo extracelulární uvolňování TNF, včetně následujících sloučenin.

Další inhibitory TNF zahrnují protilátky proti TNF, např. Fab fragment protilátky MAK 195F Fab (Holler et al. (1993), 1st International Symposium on Cytokines in Bone Marrow Transplantation, 147; monoklonální protilátka CDP 571 proti TNF (Rankin et al. (1995), Britis Journal of Rheumatology, 34:334-342 (jejichž popis je zde zahrnut odkazem); myší monoklonální protilátka proti faktoru nekrotizujícímu tumor BAY X 1351 (Kieft et al. (1995), 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 9, jehož popis je zde zahrnut odkazem; monoklonální protilátka CenTNF cA2 proti TNF (Elliot et al. (1994), Lancet, 344:1125-1127 a Eliott et al. (1994), Lancet, 344:1105-1115-1110, jejichž popis je zde zahrnut odkazem).

Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2 v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s rozpustným rekombinantním lidským antigenem Fas nebo s rekombinantními verzemi tohoto antigenu (We 96/20206 a Mountz et al., J. Immunology, 155:4829-4837 a EP 0 510 691), jejichž popis je zde zahrnut odkazem. WO 96/20206 popisuje sekretovaný lidský antigen Fas (přírozený a rekombinantní, včetně Ig fúzního proteinu), způsoby izolace genů, zodpovědných za kódování rozpustného rekombinantního lidského antigenu Fas, způsoby klonování genu ve vhodných vektorech a vhodných typech buněk a způsoby exprese genu pro produkci inhibitorů. EP 0 510 691 popisuje DNA kódující lidský antigen Fas, včetně rozpustného antigenu Fas, vektory exprimující uvedené DNA a transformanty transfekované vektorem. Při parenterálním podávání se dávky fúzního proteinu s antigenem Fas pohybují v rozmezí od 1 mikrogramu/kg do 100 mikrogramů/kg.

Charakteristické provedení vynálezu je směřováno k použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]- R_2) v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jedním nebo více inhibitory interleukinu-1 pro léčbu onemocnění zprostředkovaných TNF (jak jsou definována výše) včetně akutního a chronického zánětu, jako jsou revmatická onemocnění (např. Lymeská nemoc, juvenilní (revmatoidní) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatoidní artritida a stafylokoky vyvolaná („septická“) artritida); poškození mozku jako následek traumatu, epilepsie, krvácení nebo mrtvice; a roztroušená skleróza. Třídy inhibitorů interleukinu-1 zahrnují antagonisty receptoru interleukinu-1 (jakákoliv sloučenina schopná specificky bránit aktivaci buněčných receptorů pro IL-1), jako je IL-1ra, jak je popsáno dále; monoklonální protilátky proti receptoru IL-1 (např. EP 623 674, jehož popis je zde zahrnut odkazem); IL-1 vazebné proteiny, jako např. rozpustné receptory IL-1 (např. patent US 5 492 888, patent US 5 488 032, patent US 5 464 937, patent US 5 319 071 a patent US 5 180 812, jejichž popis je zde zahrnut odkazem); monoklonální protilátky proti IL-1 (např. WO 95/01997, WO 94/02627, WO 90/06371, patent US 4 935 343, EP 0 364 778, EP 0 267 611 a EP 0 220 063, jejichž popis je zde zahrnut odkazem); doplňkové proteiny receptoru IL-1, např. WO 96/23067 (jehož popis je zde zahrnut odkazem) a ostatní sloučeniny a proteiny, které blokují *in vivo* syntézu nebo extracelulární uvolňování IL-1.

Antagonistou receptoru IL-1 (IL-1ra) je lidský protein, který působí jako přírozený inhibitor interleukinu-1. Preferovaní antagonisté receptoru spolu se způsobem jejich přípravy a použití jsou popsány v patentu US 5 075 222 (zde odkazovaný jako '222 patent); WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; WO 92/16221; WO 93/21946; PCT Mezinárodní přihláška č. US 97/02131 (publikovaná jako EP 0 904 112), která uvádí farmaceutické kompozice zahrnující (a) účinné množství polymeru pro řízené uvolňování (např. kyselina hyaluronová) a (b) účinné množství IL-1ra; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626, WO

94/20517; a WO 96/22793, jejichž popis je zde zahrnut odkazem. Proteiny zahrnují glykosylované stejně jako neglykosylované antagonisty IL-1 receptoru.

Patent US 5 075 222 (Hannum et al., o názvu „Interleukin-1 inhibitors“) popisuje konkrétně tři preferované formy IL-1ra (IL1ra α , IL-1ra β a IL-1rax), z nichž každá je odvozená ze stejné DNA kódující sekvence. Tento patent US (uváděný zde jako „222 patent“) je zde uveden záměnou za přenesení jeho celého obsahu do popisu tohoto vynálezu. Všechny tři inhibitory interleukinu-1 mají podobné funkční a imunologické aktivity. V '222 patentu jsou také uvedeny způsoby produkce inhibitorů IL-1, zejména IL-1ras. Jedna z popsaných metod zahrnuje izolaci inhibitorů z lidských monocytů (kde jsou přirozeně produkovány). Druhá z popsaných metod zahrnuje izolaci genu zodpovědného za kódování IL-1ras, klonování genu ve vhodných vektorech a typech buněk, expresi genu vedoucí k produkci IL-1ras a získání IL-1ras. Preferovanou metodou tohoto vynálezu je druhá z metod, která je obecným příkladem rekombinantních DNA postupů. V charakteristickém provedení obsahuje IL-1ra methionylovou skupinu na N-konci jako důsledek exprese v *E. coli*. Předkládaný vynález také zahrnuje modifikovaný IL-1ras. Modifikovaný IL-1ras zahrnuje, například, muteiny takovýchto inhibitorů, ve kterých je cysteinový zbytek nahrazen za aminokyselinu v jedné nebo více pozicích aminokyselinové sekvence přirozeně se vyskytujícího inhibitoru. Takovéto muteiny mohou potom místně selektivně reagovat s funkcionalizovanými jednotkami polyethylenglykolu (PEG) nebo s jinými polyethery obsahujícími sulfhydrylové skupiny za tvorby různých typů IL-1ra PEG. PCT přihláška WO 92/16221 uvádí řadu modifikovaných IL-1ra typů a způsoby přípravy těchto inhibitor modifikovaných s PEGem.

Další třída inhibitorů interleukinu-1 zahrnuje sloučeniny schopné specificky bránit aktivaci buněčných receptorů IL-1. Mezi takovéto sloučeniny patří IL-1 vazebné proteiny, jako jsou rozpustné receptory a monoklonální protilátky. Rovněž jsou zahrnuty monoklonální protilátky proti receptorům.

Další třída inhibitorů interleukinu-1 zahrnuje sloučeniny a proteiny, které blokují *in vivo* syntézu a/nebo extracelulární uvolňování IL-1. Jedná se o látky, které zahrnují agens ovlivňující transkripci IL-1 genů nebo úpravu pre-proteinu IL-1.

Výše uvedené příklady jsou jedním z příkladů využití vynálezu a nevylučují jiné způsoby využitelného léčebného postupu, který je prováděn souběžně s aplikací těchto protizánětlivých sloučenin a které je odborníkům v oboru znám, nebo který by mohl být odborníky v oboru vyvozen z popisu předmětného vynálezu.

Je zvláště výhodné formulovat přípravky obsahující doplňkové protizánětlivé sloučeniny ve formě jednotlivých dávek, a to za účelem snadné aplikace a rovnoměrného dávkování. Termín „forma jednotlivé dávky, jak je zde míně, označuje fyzicky oddělené jednotky vhodné jako jednotkové dávky aplikované léčenému savci, kdy každá jednotka obsahuje přesně stanovené množství doplňkových protizánětlivých sloučenin vypočítané tak, aby spolu s požadovaným farmaceutickým nosičem vyvolalo požadovaný terapeutický účinek. Termín „farmaceuticky přijatelný nosič“, jak je chápán v této přihlášce, zahrnuje jakékoliv z rozpouštědel, disperzní média, obalová agens, antimikrobiální a antifungální činidla, izotonická a absorpci zpomalující činidla a podobně, která jsou kompatibilní s aktivní složkou, se způsobem podání a s dalšími složkami přípravku a která nejsou pro příjemce škodlivá. Použití takovýchto agens a médií je odborníkům v oboru známo (viz, například, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA 18042, strany 1435-1712, jehož popis je zde zahrnut odkazem). Do farmaceutického přípravku mohou rovněž být začleněny další aktivní látky.

Za účelem orální terapeutické aplikace může být doplňková protizánětlivá sloučenina formulována s pomocnými látkami (excipienty) a použita ve formě tablet k polknutí, buklálních tablet, pastilek, tobolek, elixírů, suspenzí, sirupů, oplatek a podobně, nebo může být přímo začleněna do přijímané potravy. Tablety, pastilky, pilulky, tobolky a další formy mohou také obsahovat následující složky: pojivo, jako například tragant, arabská guma (accacia), kukuřičný škrob nebo žela-

tinu; pomocné látky, jako například fosforečnan vápenatý; rozvolňovala, jako je kukuřičný škrob, kyselina alginová a podobně; mazivo (lubrikant), jako stearan hořečnatý; sladidlo, jako je sacharóza, laktóza nebo sacharin; nebo ochucovadlo, jako pepermint, libavkový olej, višňovou nebo pomerančovou příchut'. Je-li jednotlivá dávka ve formě tobolek, může kromě výše zmíněných látek rovněž obsahovat kapalný nosič. K povrchové úpravě nebo za účelem jiných modifikací formy jednotlivých dávek mohou být použity nejrůznější další materiály. Tak například tablety, pilulky nebo tobolky mohou být potaženy šelakem, cukrem nebo oběma současně. Veškerý materiál používaný při přípravě jakékoliv formy jednotlivých dávek by samozřejmě měl být ve farmaceutické čistotě a v používaném množství v podstatě netoxický. Navíc může být doplňková protizánětlivá sloučenina začleněna do přípravku pro řízené uvolňování léčiva. Množství těchto doplňkových protizánětlivých sloučenin v dané terapeuticky užitečné směsi je volené tak, aby se dosáhlo vhodné dávky.

Za účelem parenterální terapeutické aplikace může být doplňková protizánětlivá sloučenina formulována spolu se sterilním roztokem vhodným pro injekční aplikaci. Sterilní roztok vhodný pro injekce může být připraven včleněním požadovaného množství doplňkové protizánětlivé látky, spolu s dalšími složkami vyjmenovanými dále v textu, do vhodného, farmaceuticky přijatelného nosiče a s následnou sterilizací provedenou za účelem přípravy disperzí může být doplňková protizánětlivá sloučenina včleněna do sterilního vehikula, které obsahuje základní disperzní médium a další požadované ingredience vybrané ze seznamu zvedaného výše. Sterilní roztoky vhodné pro injekční aplikaci mohou být připraveny začleněním doplňkové protizánětlivé sloučeniny ve formě prášku a (případně) jakékoliv další požadované ingredience z předchozí přípravy jejího sterilního roztoku filtrací, přičemž prášek se připraví jakýmkoliv vhodným způsobem (např. vakuovým sušením nebo lyofilizací).

Specifická dávka doplňkové protizánětlivé sloučeniny je vypočítána podle přibližné tělesné váhy nebo tělesného povrchu pacienta. Mezi další faktory zohledňované při stanovení vhodného dávkování patří povaha léčeného nebo předcházeného akutního nebo chronického zánětlivého onemocnění nebo patologického stavu, závažnost tohoto onemocnění, způsob aplikace a věk, pohlaví a zdravotní stav pacienta. Odborníci snadno provedenou další zpřesnění výpočtů nezbytných ke stanovení vhodného dávkování při léčbě zahrnující aplikaci jakéhokoli z výše uvedených přípravků. Dávkování se také může stanovit pomocí známých testů pro určení dávky použitých spolu s odpovídajícími údaji o reakci organismu na podávanou dávku.

Do rozsahu tohoto vynálezu tudíž například spadá skutečnost, že lze měnit dávky doplňkových protizánětlivých sloučenin zvolených za účelem léčby daného akutního nebo chronického zánětlivého onemocnění, jako například revmatických chorob (např. Lymská nemoc, juvenilní (revmatoidní) artritida, osteoartritida a stafylokoky vyvolaná („septická“) artritida), a to tak, aby bylo dosaženo požadovaného terapeutického účinku. Jestliže některá z doplňkových protizánětlivých látek vykazuje vedlejší účinky, může se při kombinované terapii podávat pacientům během období alternativní léčby. Například chronická léčba methotrexátem je spojena s toxickými účinky na gastrointestinální trakt, játra, kostní dřeň a plíce (Sandoval et al., (1995) British Journal of Rheumatology, 34:49–56, jehož popis je zde zahrnut odkazem).

Testy sledující zlepšení onemocnění mohou zahrnovat specifické testy, při kterých je například stanovována systémová odpověď organismu na zánět, přičemž tyto testy zahrnují sledování rychlosti sedimentace erytrocytů (ESR – erythrocyte sedimentation rate) a výskyt reaktantů akutní fáze (APR – acute phase reactant). Jsou rovněž pozorovány otoky, atd. postižených částí těla. Rovněž jsou u pacienta sledovány ústup ztuhlosti a zlepšení úchopu (je-li použitelné) a zmírnění bolesti. Jestliže je pacientův stav stabilizovaný, je mu podávána stejná dávka jednou týdně a rovněž jedno týdně je hodnocen jeho stav. Za předpokladu, že stav pacienta je stabilní, může se v léčbě pokračovat. Po šesti měsících léčby jsou anatomické změny na kostře vyhodnoceny nějakou radiologickou zobrazovací metodou, například rentgenografií.

Na konci každého období je pacient znovu hodnocen. Srovnání výsledků radiologických vyšetření, hodnot ESR a APR před a po léčbě ukazuje na účinnost léčby. V závislosti na účinnosti léčby a stavu pacienta může být dávkování v dalším průběhu léčby zvýšeno nebo zachováno na stejné úrovni.

5

Ve výhodném provedení je předkládán vynález směřován k využití způsobů léčby s využitím volitelně jedné z následujících kombinací, a to za účelem léčby nebo prevence akutních nebo chronických zánětlivých onemocnění a stavů (jak jsou definovány výše), jako jsou revmatická onemocnění (např. Lymská nemoc, juvenilní (revmatoidní) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatoidní artritida a stafylokoky vyvolaná („septická“) artritida): zkrácený produkt sTNFR (např. protein R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) a methotrexát; zkrácený produkt sTNFR (např. protein R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂), methotrexát a inhibitor IL-1, přednostně IL-1ra; zkrácený produkt sTNFR (např. protein R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) a jedna nebo více látek ze skupiny zahrnující methotrexát, imunosupresivum (například cyklosporin), ciprofloxacin, antigen Fas a inhibitor IL-1, přednostně IL-1ra; zkrácený produkt sTNFR (např. protein R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) a methotrexát a imunosupresivum (např. cyklosporin); zkrácený produkt sTNFR (např. protein R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) methotrexát a ciprofloxacin; a zkrácený produkt sTNFR (např. protein R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂), methotrexát a inhibitor IL-1, přednostně IL-1ra; zkrácený produkt sTNFR (např. protein R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) a jedna nebo více látek ze skupiny zahrnující methotrexát, sulfasazin a hydroxychloroquin; zkrácený produkt sTNFR (např. protein R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂), methotrexát a hydroxychloroquin; zkrácený produkt sTNFR (např. protein R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂), methotrexát a sulfasazin.

V charakteristickém výhodném provedení zmíněný způsob léčby zahrnuje podání (např. intra-artikulární, subkutánní nebo intramuskulární) zkráceného produktu sTNFR (např. protein R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) případně formulovaného spolu s polymerem v přípravku s řízeným uvolňováním (např. hyaluronanem) volitelně v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s methotrexátem a/nebo inhibitorem IL-1 (např. IL-1ra) a/nebo s rozpustným lidským rekombinantním antigenem Fas, a to za účelem léčby revmatických onemocnění, jak je uvedeno výše (např. Lymská nemoc, juvenilní (revmatoidní) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatoidní artritida a stafylokoky vyvolaná („septická“) artritida) a symptomů s nimi spojených.

V charakteristickém výhodném provedení zmíněný způsob léčby zahrnuje podání (např. intravenózní nebo intravertikulární) zkráceného produktu sTNFR (např. proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂), a volitelně formulovaného spolu s polymerem pro řízené uvolňování (např. hyaluronanem)), volitelně v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s tkáňovým aktivátorem plasminogenu a/nebo IL-1 inhibitorem (např. IL-1ra), a to za účelem léčby poškození mozku, které je důsledkem traumatu, epilepsie, krvácení nebo mrtvice, kde každý z těchto stavů může vést k neurodegeneraci.

40

V charakteristickém výhodném provedení zmíněný způsob léčby zahrnuje podání (např. subkutánní nebo intramuskulární) zkráceného produktu sTNFR (např. proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) volitelně formulovaného spolu s polymerem pro řízené uvolňování (např. hyaluronanem)), volitelně v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s jednou nebo více sloučeninami ze skupiny zahrnující kortikosteroidy, cyklosporin, FK-506, nebo nějaký interferon (např. alfa interferon, beta interferon, gama interferon nebo konsensus interferon a/nebo IL-1ra, a to za účelem léčby roztroušené sklerózy.

V charakteristickém výhodném provedení zmíněný způsob léčby zahrnuje podání (např. subkutánní nebo intramuskulární) zkráceného produktu sTNFR (např. proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) volitelně formulovaného spolu s polymerem pro řízené uvolňování (např. hyaluronanem), volitelně v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s G-CSF a/nebo IL-1ra, a to za účelem léčby zánětlivého onemocnění střev.

V charakteristickém výhodném provedení zmíněný způsob léčby zahrnuje podání (např. subkutánní nebo intramuskulární) zkráceného produktu sTNFR (např. proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) volitelně formulovaného spolu s polymerem pro řízené uvolňování (např. hyaluronanem)), volitelně v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s leptinem, Merinolem (MarinolTM) nebo Megacem (MegaceTM), a to za účelem léčby kachexie/anorexie.

V charakteristickém výhodném provedení zmíněný způsob léčby zahrnuje podání (např. subkutánní, intraventrikulární nebo intrathekální) zkráceného produktu sTNFR (např. proteinu R_1 -[C¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) volitelně formulovaného spolu s polymerem pro řízené uvolňování (např. hyaluronanem)), volitelně v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s NSAID (např. indometacinem a/nebo inhibítorem IL-1 (např. IL-1ra), a to za účelem léčby Alzheimerovy choroby.

V charakteristickém výhodném provedení zmíněný způsob léčby zahrnuje podání (např. subkutánní, intraventrikulární nebo intrathekální) zkráceného produktu sTNFR (např. proteinu R_1 -[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂) volitelně formulovaného spolu s polymerem pro řízené uvolňování (např. hyaluronanem)), volitelně v kombinaci (předběžná léčba, následná léčba nebo souběžná léčba) s propustným rekombinantním lidským antigenem Fas, a to za účelem léčby rakoviny (např. leukemií); diabetes (dětské diabetes mellitus typu 1); odmítnutí štěpu hostitelem; hepatitidy; ischemického/reperfúzního poškození, včetně mozkové ischemie (poškození mozku jako následek traumatu, epilepsie, krvácení nebo mrtvice, které mohou vést k neurodegeneraci); zánětlivých neurologických onemocnění; revmatických onemocnění, jak jsou vymezena výše (např. Lymská nemoc, juvenilní revmatoidní artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatoidní artritida a stafylokoky vyvolaná „septická“) artritida a při transplantaci tkání.

Další aspekty a výhody předkládaného vynálezu budou zřejmé pro zvážení dále uvedených ilustrativních příkladů provedení.

30 Přehled obrázků na výkresech

Další aspekty a výhody předkládaného vynálezu budou zřejmé po shlédnutí obrázků, kde:

Obrázek 1 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO: 1) kódující Asp¹-Asn¹⁶¹, rekombinantní lidský sTNFR-I o plné délce. Rovněž je zobrazena sekvence aminokyselin Asp¹-Asn¹⁶¹ (SEQ ID NO:2).

Obrázek 2 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:3) kódující NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNISIC-[Cys¹⁹-Cys³⁰]-FC-COOH (také uváděný jako sTNFR-I 2.6D/C105). Zobrazena je také sekvence aminokyselin NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNISIC-[Cys¹⁹-Cys³⁰]-FC-COOH (SEQ ID NO:4).

Obrázek 3 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:5) kódující NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (uváděný také jako sTNFR-I 2.6D/C106). Zobrazena je také sekvence aminokyselin NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNISIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (SEQ ID NO:6).

Obrázek 4 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:7) kódující NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNISIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FN-COOH (uváděný také jako sTNFR-I 2.6D/N105). Zobrazena je také sekvence aminokyseliny NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNISIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FN-COOH (SEQ ID NO:8).

Obrázek 5 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:11) kódující NH₂-MYIHPQNNISIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH (uváděný také jako sTNFR-I 2.3D/d8).

Zobrazena je také sekvence aminokyselin $\text{NH}_2\text{-MYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (SEQ ID NO:12).

Obrázek 6 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:9) kódující $\text{NH}_2\text{-M-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (uváděný také jako sTNFR-I 2:3D/d18). Zobrazena je také sekvence aminokyselin $\text{NH}_2\text{-M-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (SEQ ID NO:10).

Obrázek 7 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:13) kódující $\text{NH}_2\text{-MSIS-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (uváděný také jako sTNFR-I 2.3D/d15). Zobrazena je také sekvence aminokyselin $\text{NH}_2\text{-MSIS-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (SEQ ID NO:14).

Obrázek 8 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:34) kódující $\text{Leu}^1\text{-Thr}^{179}$ zralého rekombinantního lidského sTNFR-II. Zobrazena je také sekvence aminokyselin $\text{Leu}^1\text{-Thr}^{179}$ (SEQ ID NO:35).

Obrázek 9 znázorňuje roztok otoku indukovaného v modelu reaktivace indukované streptokokovou buněčnou stěnou tak, jak je uvedeno v popise příkladu II.

Obrázek 10 zobrazuje plazmatické profily sTNFR-I 4D/C103db u zdravých pacientů po dvou minutách intravenózní infuze 0,2 mg/kg tak, jak je uvedeno v popise příkladu III.

Obrázek 11 zobrazuje plazmatické profily sTNFR-I 3D/C105db u zdravých paviánů po dvou minutách intravenózní infuze 0,2 mg/kg tak, jak je uvedeno v popise příkladu III.

Obrázek 12 zobrazuje plazmatické profily sTNFR-I 2.6D/C105db u zdravých paviánů po dvou minutách intravenózní infuze 0,2 mg/kg tak, jak je uvedeno v popise příkladu III.

Obrázek 13 zobrazuje vztah mezi dávkou a odbouráváním (clearancí) různých dimerních konstruktů sTNFR-I tak, jak je uvedeno v popise příkladu III.

Příklady provedení vynálezu

Standardní metody (nebo vhodné alternativní metody) použitelné v postupech popsanych v následujících příkladech jsou popsány v obecně uznávaných manuálech molekulární biologie, jako například v publikacích Sambrook et al. (1989), viz výše, a Ausubel et al. (1990), viz výše. Pro porozumění čtenáře uvádíme, že "mL" se týká mililitrů a "L" se týká litrů.

40 Příklad I

Následující příklad popisuje produkci různých forem zkráceného rekombinantního rozpustného TNFR-I:

45 $\text{NH}_2\text{-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FC-COOH}$ (sTNFR-I 2,6D/C105); $\text{NH}_2\text{-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (sTNFR-I 2,6D/C106); $\text{NH}_2\text{-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FN-COOH}$ (sTNFR-I 2,6D/N105); $\text{NH}_2\text{-MYIHPQNNSIC-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (sTNFR-I 2,3D/d8); $\text{NH}_2\text{-M-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (sTNFR-I 2,3D/d18) a $\text{NH}_2\text{-MSIS-[Cys}^{19}\text{-Cys}^{103}\text{]-FNCSL-COOH}$ (sTNFR-I 2,3D/d15).

A. Příprava DNA:

1. sTNFR-1 2.6D/C106

Byla prováděna PCR amplifikace sTNFR-I 2.6D/C106 s použitím klonované DNA odvozené z klonu lambda-gt107ctnfbp (EP 422 339), jako teploty, a s použitím následujících PCR primerů:

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 obsahují místa *NdeI* a *HindIII* hybridizují na 5' konci (OLIGO#1) a 3' konci (OLIGO#2) zkráceného genu v uvedeném pořadí. PCR amplifikace probíhala v cyklech; každý cyklus se skládal ze 30 sekund při 94 °C denaturace, 15 sekund při 55 °C hybridizace primerů a 1 minuty při 72 °C elongace [v termocykléru typu 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)]. Produkt PCR byl přečištěn pomocí soupravy QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) podle návodu výrobce. Přečištěný produkt PCR byl štěpen s enzymy *NdeI* a *HindIII* a poté byl izolován z gelu pomocí soupravy QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) podle návodu výrobce. Produkt PCR izolovaný z gelu byl ligován do vektoru pMAG11 (WO 95/26746), jehož prostřednictvím byl transformací vnesen do buněk *E. coli* FM 15 (ATCC 55765).

2. STNFR-I 2.6D/C105

Byla prováděna PCR amplifikace sTNFR-I 2.6D/C105 s použitím DNA plazmidu sTNFR-I 2.6D/C106, jako teploty, a s použitím následujících PCR primerů:

OLIGO#3: (SEQ ID NO:70)

5'-ACTCGA GGATCCGCGGATAAATAAGTAACGATCCGGTCCA-3'

OLIGO#4: (SEQ ID NO:71)

5'-CAGGTCGGATCCTATCAGCAGAAGCACTGGAAAAGGTTTTC-3'

OLIGO#3 a OLIGO#4 obsahují *BamHI* místo a mutaci N(105)C následovanou terminačním kodonem. Primery jsou navrženy tak, aby úplné amplifikace matrice zajistila nové *BamHI* místo vhodné pro ligaci. PCR amplifikační reakce probíhala ve 35 cyklech; prvních 10 cyklů se skládalo z 10 sekund při 92 °C denaturace, 30 sekund při 55 °C hybridizace primerů a 4 minut při 68 °C elongace; následovalo 25 cyklů, z nichž každý sestával z 10 sekund při 92 °C denaturace, 30 sekund při 55 °C hybridizace primerů a 4 minut + 20 sekund při 68 °C elongace [v termocykléru typu 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)]. Produkt PCR byl přečištěn z gelu pomocí soupravy QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) podle návodu výrobce a štěpen s enzymem *BamHI*, extrahován směsí fenol/chloroform a precipitován s ethanol. Poté byl resuspendován, ligován do vektoru pMAG11 a vnesen transformací do buněk *E. coli* FM 15.

3. STNFR-12.6D/N105

- 5 Byl prováděna PCR amplifikace sTNFRI 2.6D/N105 s použitím DNA plazmidu sTNFR-I 2.6D/C106, jako templátu, a s použitím následujících PCR primerů:

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

5'-GGTTAGCCATATGGACAGCGTTTGCCCCCAA-3'

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

5'-CGCGGATCCCTATTAATTGAAGCACTGGAAAAGG-3'

- 10 OLIGO#5 a OLIGO#6 obsahující místa *NdeI* a *BamHI* a hybridizují s 5' koncem (OLIGO#5) a 3' koncem (OLIGO#6) zkráceného genu. PCR amplifikační reakce probíhala ve 30 cyklech; každý cyklus se skládal ze 45 sekund při 95 °C denaturace, jedné minuty při 65 °C hybridizace primerů a dvou minut při 72 °C elongace [v termocykléru typu 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)].

- 15 PCR produkt byl přečištěn pomocí soupravy WizardTM Clean-Up Systém (Promega, Madison, WI) dle návodu výrobce. Přečištěný PCR produkt byl štěpen s enzymy *NdeI* a *BamHI*, extrahován směsí fenol/chloroform a precipitován s ethanolem. Poté byl resuspendován, ligován do vektoru pAMG11 a vnesen transformací do buněk *E. coli* FM15.

- 20 Odborníci v oboru si jsou vědomi, že na základě popisu tohoto vynálezu mohou k expresi ve vhodné hostitelské buňce (např. *E. coli* a jiné bakterie) být použity nebo upraveny rozmanité genetické materiály a metody.

4. STNFR 2.3D/d18; sTNFR-I 2.3D/d8 a sTNFR-I 2.3D/d15

- 25 PCR amplifikace sTNFR-I 2.3D/d18, sTNFR-I 2.3D/d8 a sTNFR-I 2.3D/d15 byla po každé provedena s použitím DNA plazmidu 2.6DP/C106, jako templátu, a s použitím následujících PCR primerů:

- 30 PCR primery pro sTNFR-I 2.3D/d8:

5' OLIGO#7: (SEQ ID NO:74)

5'-CCCCATATGTATATCCACCCTCAAAATAAT-3'

3' OLIGO#8: (SEQ ID NO:75)

5'-CCCAAGCTTTTACAGAGAGCAATTGAAGCACTG-3'

PCR primery pro sTNFR-I 2.3D/d15:

- 35 5' OLIGO#9: (SEQ ID NO:76)

5'-CCCCATATGTGCGATTAGCTGTACCAAGTGCCACAAAGG-3'

3' OLIGO#10: (SEQ ID NO:77)

5'-CCCAAGCTTTTACAGAGAGCAATTGAAGCACTG-3'

PCR primery pro sTNFR-I 2.3D/d18:

5' OLIGO#11: (SEQ ID NO:78)

5'-CCCCATATGTGTACCAAGTGCCACAAAGGA-3'

3' OLIGO#12: (SEQ ID NO:79)

5'-CCCAAGCTTTTACAGAGAGCAATTGAAGCACTG-3'

- 5 Každý z primerů OLIGO#7, OLIGO#9 a OLIGO#11 obsahuje místo *NdeI* a každý z primerů OLIGO#8, OLIGO#10 a OLIGO#12 obsahuje *HindIII* místo. PCR amplifikační reakce probíhala v 250 cyklech; každý cyklus se skládal ze 45 sekund při 95 °C denaturace, jedné minuty při 65 °C hybridizace primerů a dvou minut při 72 °C elongace [v termocykléru typu 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)]. PCR produkty byly přečištěny pomocí soupravy WizardTM Clean-Up Systém (Promega, Madison, WI) dle návodu výrobce. Přečištěné PCR produkty byly štěpeny s enzymy *NdeI* a *BamHI*, estrahovány směsí fenol/chloroform a precipitovány s ethanolem. Poté byly resuspendovány, ligovány do pAMG11 a vneseny transformací do buněk *E. coli* FM15.

B. Produkce v *E. coli*:

- 15 Příprava malého množství čerstvého inokula vybraného rekombinantního kmene *E. coli* nesoucího požadovaný konstrukt 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 s TNFR-I 2.3D/d18 kultivací, byla započata přenesením celého obsahu zmražené glycerolové konzervy v zásobní ampuli (asi 1,5 ml) do 2 litrové nádoby, která obsahuje 500 ml živné půdy Luria (LB). Bakteriální kultura byla inkubována při teplotě 20 37 °C na rotační třepačce při 350 ot./min. Hustota kultury byla stanovována měřením absorbance při 660 nm (OD₆₆₀). Inokulační kultura byla pěstována až do hustoty, kdy OD₆₆₀ byla > 2,0. V tomto okamžiku bylo 125 ml kultury asepticky přeneseno do produkčního fermentoru o objemu 15 litrů, který obsahoval 10 litrů sterilního média.

- 25 Produkční médium a podmínky fermentace pro vlastní produkci popisuje jako komplexní médium a podmínky fermentace Sniff (1993), "A Chemically-Defined Medium for the Overproduction of a Recombinant Protein in *E. coli*", thesis, Colorado State University. Obecně, uvedený odkaz uvádí použití komplexního média obsahujícího hydrolyzát kaseinu, soli, glycerola prostředek proti pění, které je sterilizováno ve fermentoru. Po ochlazení fermentoru na teplotu nižší 30 než 40 °C jsou přidány stopové minerály a thiamin hydrochlorid, které byly předem sterilizovány filtrací.

- Po ustálení teploty média na 37 °C bylo toto médium naočkováno inokulem Růst kultury byl 35 sledován měřením OD₆₆₀. pH kultury bylo udržováno na hodnotě 6,0 automatickým přidáváním 5M hydroxidu sodného a 5M kyseliny chlorovodíkové, když se OD₆₆₀ pohybovala v rozmezí hodnot 9,5 až 10,5, byla kultura indukována aseptickým přidáním sterilního izopropyl β-D thio-galaktopyranozidu (IPTG) do konečné koncentrace 0,50 mM. Kultura byla sklizena pro zastavení růstu.

- 40 Kultivační médium a podmínky růstu byly použity v podobě, kterou uvádí Sniff (1993), viz výše, s následujícími výjimkami: do média byl přidán síran amonný 2,0 g/l) a L-cystein hydrochlorid monohydrát (1,0 g/l), tetracyklin hydrochlorid byl vynechán, pH bylo udržováno na hodnotě 6,0 pomocí hydroxidu sodného a kyseliny chlorovodíkové, místo hodnoty 7,0 udržované pouze 45 hydroxidem sodný, teplota kultivace byla zvýšena na 37 °C, koncentrace induktoru byla zvýšena z 0,15 mM na 0,50 mM IPTG, a doby sklizně byla stanovena k zastavení růstu, nikoliv v závislosti na době, která uplynula od indukce.

Po ukončení fermentace byla bakteriální buňky sklizeny centrifugací v 500ml kyvetách. Buňky byly sedimentovány do pelety centrifugací při 10 000 ot./min. po dobu 30 minut. Kašovitá bakteriální peleta byla naředěna na hustotu 15 % pevných částic v lytickém pufru složeném z 50 mM Tris a 5 M EDTA, pH 8,0. Resuspendované buňky byly poté lyzovány trojnásobným protlačením suspenze homogenizátorem (APV Gaulin, Inc., Everett, MA) při tlaku 57 MPa (8 000 psi). Homogenát byl pak centrifugován při 10 000 ot./min po dobu 30 minut pro získání inkluzních tělísek (inclusion bodies, IBs). Inkluzní tělíska byla promyta resuspendováním v lytickém pufru a třetí centrifugací roztoku při 10 000 ot./min 30 minut. Po resuspendování IBs v deionizované vodě (v poměru 1:1) byla naposledy IBs centrifugována při 10 000 ot./min 30 minut, jako druhé promytí. Promytá inkluzní tělíska každého z proteinů tak byla připravena k rozpouštění, renaturaci a purifikaci. Každá várka poskytla výťažek přibližně 200–250 g IBs.

V jiném alternativním provedení může být zkrácený sTNFR-I připraven fermentací podle jiného postupu:

Příprava malého množství čerstvého inokula kultivací vybraného rekombinantního kmene *E. coli* nesoucího požadovaný konstrukt sTNFR-I 2.6D/N105 nebo sTNFR-I 2.6D/C106, byla zahájena přenesením celého obsahu zmražené glycerolové konzervy v zásobní ampuli (asi 1,5 ml) do 2litrové nádoby, která obsahuje 500 ml média s obsahem 10 g/l BBL kvasničného extraktu o pH 7,0. Kultura byla inkubována při teplotě 33 °C na rotační třepačce při 300 ot./min. Hustota kultury byla stanovována měřením absorbance při 600 nm (OD_{600}). Inokulum bylo kultivováno až do hustoty k hodnotě $OD_{600} > 2,0$. V tomto okamžiku bylo 80 ml kultury asepticky přeneseno do produkčního fermentoru o objemu 15 litrů, který obsahoval 7 litrů sterilního živného média.

Produkční fermentace využívá postup kontinuálního doplňování živin do média. Produkční médium je komplexní médium obsahující kvasničný extrakt, soli a prostředek proti pění, které je sterilizováno ve fermentoru. Po ochlazení fermentační nádoby na teplotu nižší než 40 °C jsou přidány stopové minerály, glukóza, síran horečnatý a hexametafosfát, sterilizované filtrací. Jsou používány dvě živiny, jedna je zdrojem uhlíku (glukóza/síran hořečnatý), druhou je kvasničný extrakt obsahující dusík.

Po ustálení teploty produkčního média na 33 °C bylo toto médium naočkováno inokulum. Růst kultury byl sledován měřením OD_{600} , pH kultury bylo udržováno na hodnotě 7,0 automatickým přidáváním hydroxidu amonného a 48,7% kyseliny citronové. Po dosažení hodnot OD_{600} v rozmezí 8,0 až 12,0 bylo zahájeno přidávání živiny I exponenciální rychlostí. Když se hodnoty OD_{600} v rozmezí 8,0 až 12,0 bylo zahájeno přidávání živiny I exponenciální rychlostí. Když se hodnoty OD_{600} nalézaly v rozmezí 30 až 40, začalo se s přidáváním živiny II konstantní rychlostí. Po dosažení hodnoty OD_{600} 67 až 83 byla kultura indukována aseptickým přidáním sterilního autoinduktoru (lakton homoserinu) do konečné koncentrace 0,6 mg/l. V okamžiku indukce byly rychlosti přidávání živin I a II změněny na konstantní. Kultura byla sklizena v čase 16D 2 hodiny po indukci.

Po ukončení fermentace byly buňky sklizeny centrifugací v 500ml kyvetách. Buňky byly sedimentovány do pelety centrifugací při 10 000 ot./min po dobu 30 minut. Kašovitá bakteriální peleta byla naředěna na hustotu 15 % pevných částic v lytickém pufru složeném z 50 mM Tris a 5 mM EDTA, pH 8,0. Resuspendované buňky byly poté lyzovány trojnásobným protlačením suspenze homogenizátorem (APV Gaulin, Inc., Everett, MA) při tlaku 57 MPa (8000 psi). Centrifugací homogenátu při 10 000 ot./min 30 minut byla získána inkluzní tělíska (IBs). Inkluzní tělíska byla promyta resuspendováním v lytickém pufru a třetí centrifugací při 10 000 ot./min 30 minut. IBs byla resuspendována v deionizované vodě (v poměru 1:1) a naposledy byla centrifugována při 10 000 ot./min po dobu 30 minut. Tento krok představuje druhé promytí. Promytá inkluzní tělíska každého z proteinů byla připravena k rozpouštění, renaturaci a purifikaci.

C. Rozpouštění/renaturace proteinů:

5 Promytá inkluzní tělíska z každé 10litrové fermentace byla solubilizována v 80 ml solubilizačního pufru (50 mM Tris, 8 M močovina, 160 mM cystein, pH 9,5). Hodnoty pH solubilizační směsi byla nastavena na 9,5 pomocí 10N NaOH a směs byla míchána při teplotě místnosti 2–3 hodiny. Každá várka poskytla výtěžek zhruba 200–250 g IBs.

10 Jednotlivé solubilizační směsi byly ředěny v poměru 1:20 s ledovým renaturačním pufrem (50 mM Tris, 1, M močovina). Každý z konečných objemů byl přibližně 16 litr. Poté byla hodnota pH jednotlivých směsí upravena na 9,7 pomocí 6N HCl a směsi byly zvolna míchány při 4 °C po dobu 2 až 3 dnů.

15 Poté bylo pH každé ze směsí nastaveno na hodnotu 5,0 pomocí ledové kyseliny octové a 6N HCl. V každé ze směsí se vytvářel precipitát, který byl odstraněn centrifugací při 10 000 x g na centrifuze Beckman Model J2–HS. Získaný materiál byl filtrován na filtru o pórech 5 µm a 0,22 µm.

D. Purifikace

20 Proteinový materiál po renaturaci byl připraven pro purifikaci na sefárovém sloupci IX–1 SP–Sephacrose Big Bead™ (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

Kolona IX–1 SP–Sephacrose Big Bead™ (4,4 cm x 20 cm)

25	Pufr A	Pufr B
	25 mM octan	25 mM octan
	50 mM NaCl	375 mM NaCl
	pH 5,0	pH 5,0.

30 Před nanesením renaturovaného materiálu byla každá kolona ekvilibrována se 4 až 5 objemy kolony pufrem A. Materiál z jednotlivých várek byl odděleně nanášen na kolony k přečištění. Na každou kolonu bylo naneseno maximálně 12 g proteinu na litr pryskyřice. Pak byla každá kolona promyta se 3 až 4 objemy kolony pufrem A (dokud se hodnota UV absorpance nevrátila k základní úrovni). Proteiny byly eluovány pomocí lineárně rostoucího gradientu soli v rozmezí 35 50 až 375 mM NaCl v celkovém rozsahu 8 objemů kolony. Celá bílkovinná frakce pro každé provedení byla sbírána dohromady. Jímání každé proteinové frakce na koloně začalo, když UV absorpance vzrostla přibližně na 20 % maxima píku. Sběr eluátu byl zastaven v případě dosažení hodnot 50 % maxima UV absorpance, anebo pokud absorpance přestala klesat.

40 Rychlost průtoků:

7,5 objemů kolony/hod – ekvilibrace, promývání

15 objemů kolony/hod – nanášení

6 objemů kolony/hod – eluce

45 Veškerá purifikace na kolonách byla prováděna při 4 °C.

Spojené frakce z každé IX–I kolony byly připraveny k dalšímu přečištění na koloně Toyo Pearl™ Butyl 650M HIC column (Toso Haas, Philadelphia, PA).

50

Kolona 300 ml – Toyo Pearl™ Butyl 650M (4,4 cm x 20 cm)

	Pufr A	Ředicí pufr	Pufr B
5	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

Před nanesením spojené frakce z kolony IX-1 byla kolona ekvilibrována se 4 až 5 objemy kolony pufru A. Spojené frakce z IX-1 byly naředěny v poměru 1:1 ředícím pufrům a pH bylo upraveno na hodnotu 6,0. Zředěná spojená frakce z IX-1 byla nanesena na kolonu. Na každou kolonu byla naneseno maximálně deset gramů proteinu na litr pryskyřice. Každá kolona byla promyta se 3 objemy kolony pufru. Proteiny byly z kolony eluovány pomocí lineárního klesajícího gradientu soli v rozmezí od 1,8 M NaCl až do H₂O v celkovém rozsahu 8 objemů kolony. Jímání každé bílkovinné frakce započalo, když UV absorbance vzrostla k 15 až 20 % maxima. Sběr byl ukončen v případě dosažení hodnoty 50 % maxima UV absorbance, anebo pokud absorbance přestala klesat.

Rychlost průtoků:

6 objemů kolony/hod – ekvilibrace, naředění a promývání

3 objemy kolony/jod – eluce

Veškerá purifikace na kolonách byla prováděna při teplotě místnosti.

Každá spojená frakce z HIC byla připravená pro zahuštění/diafiltraci.

Zahuštění/diafiltrace (Concentration/diafiltration, C/D)

V kroku C/D byla užita 1 čtvereční stopa (30,5 cm x 30,5 cm) regenerované celulózy (mol. hmotn., 5000) membrány PLLCTM (Milli-Pore, Bedford, MA). Každá spojená frakce z HIC kolony byla zahuštěna na objem asi 200 ml a potom byla diafiltrována proti 6 až 7 objemům 20mM NaPO₄ o pH 6,0, dokud nebyla hodnota vodivosti < 4 mm/hod.

Zahuštění/diafiltrace byla prováděna při teplotě místnosti.

Každý vzorek po C/D byl poté připraven k přečištění na koloně IX-2-365 ml SP-Sepharose HP™ (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

Kolona IX-2-365 ml SP-Sepharose HP™ 5 cm x 18,5 cm)

	Ekvilibrační pufr	Pufr A	Pufr B
20 mM NaPO ₄		20 mM NaPO ₄	20 mM NaPO ₄
pH 6,0		pH 6,3 50 mM NaCl	pH 6,8

Před nanesením jednotlivých C/D vzorků byla každá kolona ekvilibrována se 4 objemy kolony ekvilibračního pufru. Každý C/D vzorek byl odděleně nanášen na kolonu tak, aby nanesené množství nepřesáhlo osm gram proteinu na litr pryskyřice. Pak byla každá kolona postupně promyta se 3 objemy kolony ekvilibračního pufru a se 3 objemy pufru A. Proteiny byly eluovány pomocí lineárního gradientu pH v rozmezí 6,3 až 6,8 a gradientu soli v rozmezí 0 až 50 mM NaCl (pufr B) v celkovém rozsahu 8 objemů kolony. Sběr frakcí započal při hodnotě OD 1,0 na počátku a končil při dosažení 50 % maxima na konci.

Zkrácený sTNFR-I může být solubilizován, renaturován a přečištěn i jiným způsobem, jehož popis následuje.

5 C.1 Rozpouštění/Renaturace proteinů:

Promytá inkluzní tělíska (IBs) jsou rozpuštěna v roztoku o složení 8 M močovina, 60 mM Tris, 100 mM cystein tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 6,5 M močovina, 50 mM Tris a 80 mM cystain, pH 9,5 a 5 – 10 mg/ml zkráceného sTNFR-I. (Koncentrace sTNFR-I je stanovena na základě množství sTNFR-I v promytých IBs v g/l). Roztok se míchá při teplotě místnosti 90 minut a poté jsou proteiny renaturovány zředěním 1:10 v ledovém (4 °C – 8 °C) pufru o složení 0,85 M močovina, 50 mM Tris, pH 9,8 (pH je měřeno při teplotě 4 °C – 8 °C).

Roztok, ve kterém probíhá renaturace, je míchán 24 až 72 hodin při 4 °C až 8 °C. Ke konci této doby je přidána ledová kyselina octová (~ 20 mM) pH je upraveno na 5,0. Vytvořená sraženina je odstraněna centrifugací a supernatant je uchován pro nanesení na první kolonu.

D.1 Purifikace

Po precipitaci kyselinou byl projasněný spojený vzorek supernatantu nanesen na kolonu SP-Sepharose Big Bead™ (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), která byla ekvilibrována puforem o složení 20 mM octan sodný, 75 mM NaCl, pH 5,0. Vzorek byl nanesen na kolonu v množství nepřesahujícím 15 g zkráceného sTNFR-I na litr objemu náplně. Po nanesení byla kolona promyta se 3 objemy kolony 20 mM octanu sodného, 75 mM NaCl, pH 5,0 a eluována s lineárním gradientem (9 objemů kolony) v rozmezí 75 mM až 450 mM NaCl ve 20mM octanu sodném, pH 5,0. Krok na koloně SP-Sepharose Big Bead™ (SP-BB) byl prováděn při teplotě 4 °C až 8 °C.

Spojené frakce z kolony SP-BB byly naředěny v poměru 1:1 ve 2 M NaCl, 60 mM octanu, pH 4,5 a pokud to bylo nutné, bylo pH upraveno na hodnotu 4,5. Spojená frakce z kolony SP-BB byla nanesená na kolonu Toyopearl™ Butyl 650M (Toso Haas, Philadelphia, PA), která byla ekvilibrována s puforem o složení 1 M NaCl, 30 mM octan, pH 4,5. Na kolonu byl nanesen zkrácený sTNFR-I v množství ~ 10 až 13 gramů na litr náplně kolony. Po nanesení vzorku byla kolona promyta se 3 objemy kolony pufru o složení 1 M NaCl, 30 mM octan, pH 4,5 a eluována s lineárním gradientem (8 objemů kolony) v rozmezí 1 M NaCl až 0 M NaCl ve 30mM octanu, pH 4,5.

Purifikované frakce zkráceného sTNFR-I z kolony Butyl 650M byly spojeny, zředěny vodou v poměru 1:5 a naneseny na kolonu SP-Sepharose High Performance™ (SP-HP) (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), která byla ekvilibrována s 30mM octanem, pH 4,5 (naneseo ne více než ~ 15 g/l objemu náplně). Kolona byla potom promyta se 3 objemy 30mM octanu, pH 4,5 a eluována s lineárním gradientem (12 objemů kolony) v rozmezí 100 mM až 400 mM NaCl v 30 mM octanu, pH 4,5. Purifikované frakce zkráceného sTNFR-i byly spojeny a hodnota pH upravena na 5,0 pomocí NaOH.

45 C. PEGylace:

1. Příprava sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33 kDa)

Do chlazeného (4 °C) roztoku sTNFR-R2.6D/N105 (3,5 mg/ml) v 50mM octanu sodném, pH 4 byl za stálého míchání přidán trojnásobný molární nadbytek t-BuPEG (mono-t-butoxy-polyethylenglykol o průměrné molekulové hmotnosti 33 kDa, Shearwater Polymers, Inc.). Pak byl přidán NaCNBH₃ do výsledné koncentrace 20 mM a reakční směs byla míchána 18 až 24 hodin při 7 °C.

55

Rozsah modifikace proteinu v průběhu reakce byl sledován pomocí SEC HPLC kolony TSKG3000sw_{xl} (Toso Haas, Montgomeryville, PA) vymývané s fosfátovým pufrům o složení 0,1 M fosforečnan sodný pH 6,9, 0,5 M NaCl a 10 % ethanol rychlostí 0,7 ml/min (Toso Haas, Montgomeryville, PA).

pH reakční směsi bylo upraveno na hodnotu přibližně 3,5 pomocí 1M HCl a reakční směs byla zředěna vodou na výslednou koncentraci 1,5 mg/ml.

sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa) byl oddělen od přebytku t-BuPEG a jiných vedlejších produktů iontoměničovou chromatografií na SP Sepharose HP 16/10TM (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

Reakční směs byla nanášena na kolonu a nezreagovaný t-BuPEG byl vymyt se 3 objemy kolony startovacího pufru A (20 mM octan sodný, pH 4,0). sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa) byl eluován s lineárním gradientem (20 objemů kolony) v rozmezí 0 až 30 % pufru B (1 M NaCl ve 220 mM octanu, pH 4,0). Eluát byl měřen při 280 nm. Každá frakce obsahující sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa) byla analyzována pomocí SDS-PAGE na komerčně připravených gradientových 4–20% gelech (Novex, San Diego, CA). Frakce byly spojeny podle výsledků SDS-PAGE, zahuštěny a sterilně zfiltrány. Všechny spojené frakce přečištěného sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33 kDa) byly opět analyzovány pomocí SDS-PAGE a SEC HPLC. Protein je převeden do roztoku 10mM fosforečnanu sodného, pH 6, a 20mM NaCl.

2. Příprava sTNFR-I 2.6D/N105–33 kDa (MePEG)

Do chlazeného (7 °C) a míchaného roztoku sTNFR–2.6D/N105 (4 mg/ml) byla přidávána kyselina octová, dokud pH nedosáhlo hodnoty 5,0. K tomuto roztoku byl přidán 15 mM NaCNBH₃ a dvojnásobný molární přebytek t-butoxy PEG (t-butoxy-polyethylenglykol) o průměrné molekulové hmotnosti 33 kDa, Schaerwater Polymers, Inc.). Reakční směs byla při této teplotě krátce zamíchána a potom ponechána inkubovat po dobu asi 18 hodin.

Po 18 hodinách byla reakční směs upravena na hodnotu pH 3,0 kyselinou citronovou.

sTNFR-I 2.6D/N105–MePEG (33kDa) byl oddělen od přebytku MePEG a jiných vedlejších produktů iontovou chromatografií na koloně SP Sepharose HPTM (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

Reakční směs byla nanášena na kolonu (maximálně 8 mg/ml polymeru) a nezreagovaný MePEG byl eluován se 3 objemy kolony startovacího pufru A (20 mM citronan sodný, pH 3,0). sTNFR-I 2.6D/N105–MePEG (33kDa) byl eluován lineárním gradientem (16 objemů kolony) v rozmezí 0,1 až 0,5 M NaCl ve 20mM citrátu, pH 3,0. Eluát byl měřen při 280 nm. Každá frakce obsahující sTNFR-I 2.6D/N105–MePEG (33kDa) byla analyzována pomocí SDS-PAGE na komerčně připravených gradientových 4–20% gelech (Novex, San Diego, CA). Frakce byly spojeny podle výsledků SDS-PAGE, zahuštěny a sterilně zfiltrány. Všechny spojené frakce přečištěného sTNFR-I 2.6D/N105–MePEG (33kDa) byly opět analyzovány pomocí SDS-PAGE. Purifikovaný sTNFR-I 2.6D/N105–MePEG (33kDa) byl zahuštěn na 5 – 20 mg/ml a převeden do PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35–100 mM NaCl), anebo do roztoku 20 mM octanu, 100mM NaCl, pH 5,0.

3. Příprava sTNFR-I 2.6D/N105–MePEG(20kDa)

Postup kroku A přípravy sTNFR-I 2.6D/N105–MePEG (33kDa) byl v podstatě zopakován s tou výjimkou, že MePEG (mono-methoxy-polyethylenglykol o průměrné molekulové hmotnosti 33 kDa (Shearwater Polymers, Inc.) byl nahrazen MePEGem (mono-methoxy-polyethylenglykolem o průměrné molekulové hmotnosti 20 kDa (Shearwater Polymers, Inc.). Získaný protein byl převeden do roztoku 10mM fosforečnanu sodného, pH 6,5 a 20mM NaCl.

4. Příprava dalších konjugátů

Další konjugáty sTNFR-2.6D/N105 byly připraveny v podstatě shodně jako sTNFR-I 2.6D/N105-MePEG (33kDa) s tou výjimkou, že byly použity následující typy PEG aldehydů (Shearwater Polymers, Inc.):

lineární monofunkční – mol. hmotn. 5 kDa, 6 kDa a 57 kDa,

rozvětvený monofunkční – mol. hmotn. 10 kDa, 20 kDa a 40 kDa,

lineární bifunkční – mol. hmotn. 8 kDa a 20 kDa,

rozvětvený trifunkční – mol. hmotn. 10 kDa.

Získané proteiny byl převedeny do roztoku 10mM fosforečnanu sodného, pH 6,5 a 20mM NaCl.

5. Jiné způsoby pegylace

Zkrácené molekuly sTNFR-I mohou být pegylovány a purifikovány také jinými způsoby:

Eluát z kolony SP-HP (3–5 mg/ml, pH upraveno na 5,0) reaguje se 2 mol polyethylenglykolu (např. MePEG anebo t-BuPEG) na jeden mol sTNFR-I 2.6D/N105 (~ 5 gramů t-BuPEG na gram s TNFR-I 2.6D/N105). Po rozpuštění polyethylenglykolu je přidáno 10 – 20 mM kyanoborohydridu a roztok je inkubován přes noc při 7 °C – 15 °C. Po skončení pegylace (~ za 18 hodin) je reakce ukončena přidáním 10 mM glycinu.

Pegylační směs je zředěna se 4 objemy 50mM octanu, pH 4,0, a jestliže je třeba, je konečné pH je upraveno na hodnotu 4,0. Směs je nanášena na kolonu SP-HP ekvilibrovanou s 50mM octanem, pH 4,0. Na kolonu je nanášeno maximálně 8 gram sTNFR-2.6D/N105 na litr objemu náplně. Poté je kolona promyta se 3 objemy kolony ekvilibračního pufru a eluována lineárním gradientem 0 až 0,3 mM NaCl v 50mM octanu, pH 4,0. Monopegylované frakce sTNFR-2.6D/N105–30kDa jsou sbírány, pH upraveny na hodnotu 5,0, a frakce jsou dále zahuštěny a diafiltrovány do izotonického pufru. Všechny purifikační kroky jsou prováděny při teplotě místnosti. Protein je převeden buď do PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35–100 mM NaCl), nebo do roztoku 20mM octanu, 100mM NaCl, pH 5,0.

6. Příprava sTNFR-I 2.6D/C105 „dumbbell“ a sTNFR-I 6D/C106 „dumbbell“ 1

Polyethylenglykol aktivovaný sulfonovou skupinou (připravený a přečištěný podle US patentové přihlášky č. 08/473, 809, podané 7. června 1995 a US patentové přihlášky č. 08/611,918, podané 6. března 1996) [PEG 20 000–bis–vinylsulfon] byl použit k dimerizaci proteinů v podstatě podle metody popsané v PCT publikované přihlášce WO 95/34326, s výjimkou redukčních a reakčních podmínek. Před připojením k polyethylenglykolu byly proteiny redukovány se 4 mol DTT na jeden mol proteinu při teplotě 5 až 9 °C, pH 7,6. Všechny reakce probíhaly v přítomnosti 30% glycerolu. Dimerizovaný protein se nazývá sTNFR-I 2.6D/C105db a sTNFR-I 2.6D/C106db. Každý protein byl převeden do PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35–100 mM NaCl), nebo do roztoku 20mM octanu, 100mM NaCl, pH 5,0.

7. Příprava srovnávacích molekul sTNFR-I

(i). sTNFR-I 4D/N105 byl připraven podle popisu v EP 422339. sTNFR-I 4D/N105–t-BuPEG (33kDa) byl připraven pegylací sTNFR-I 4D/N105 v podstatě podle postupu uvedeného výše pro pegylaci sTNFR-I 2.6D/N105–t-BuPEG(33kDa). sTNFR-I 4D/N105–t-MePEG (33kDa) byl připraven pegylací sTNFR-I 4D/N105 v podstatě podle postupu uvedeného výše pro pegylaci sTNFR-I 2.6D/N105–t-MePEG (33kDa). Příprava sTNFR-I 4D/C105 a sTNFR-I 4D/C105db je

popsána v PCT publikované přihlášce WO 95/34326. Získané proteiny byly rozpuštěny v roztoku 10mM fosforečnanu sodného, pH 6,5 a 20mM NaCl.

(ii). sTNFR-I 4D/C105-33kDa (MePEG) byl připraven pegylací 4D/C105 v podstatě podle postupu uvedeného výše pro pegylaci sTNFR-I 2.6D/C105-33kDa (MePEG) s touto výjimkou: reakce probíhala při pH 7,5 s 1,3 mol DTT na mol s TNFR-I přibližně 5 až 6 hodin, poté následovalo odstranění DTT na koloně SP-SepharoseTM FF a pegylace s 1,5 až 3 mol PEGu na mol proteinu po dobu nejméně 15 hodin při teplotě místnosti. Získaný protein byl rozpuštěn buď v PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35–100 mM NaCl), nebo ve 20mM octanu, 100mM NaCl, pH 5,0.

(iii). sTNFR-I 3D/N105 (sTNFR-I 4D/N105 zkrácený o 34 aminokyselin na C konci) byl připraven následujícím způsobem. PCR amplifikace byla provedena s sTNFR-I 4D/N105 jako templátem a s primery OLIGO#13 (nese *NdeI* místo, hybridizuje s 5' koncem zkráceného genu) a OLIGO#14 (nese *HindIII* místo, hybridizuje s 3' koncem zkráceného genu). PCR amplifikační reakce probíhala ve 25 cyklech; každý cyklus se skládal ze 30 sekund při 94 °C denaturace, 15 sekund při 60 °C hybridizace primerů a 1 minuty při 72 °C polymerace [termocyklér typ 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)]. PCR produkt byl přečištěn pomocí soupravy QIAquickTM PCR Purification Kit (QIAGEN, Chatworth, CA). Přečištěný PCR produkt byl štěpen s enzymy *NdeI* a *HindIII* a poté byl izolován z gelu pomocí soupravy QIAquickTM Gel Extraction Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA). PCR produkt izolovaný z gelu byl ligován do vektoru pAMG11 a vnesen transformací do buněk *E. coli* FM 15.

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

5'-GGTTAGCCATATGGACAGCGTTTGGCCCCAA-3'

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

5'-CCCAAGCTTTTAGGTGCACACGGTGTCTGTTT-3'

Získaný protein byl rozpuštěn v 10mM fosforečnanu sodném, pH 6,5 a 20mM NaCl.

(iv). sTNFR-I 3D/C105 (sTNFR-I 4D/C105 zkrácený o 34 aminokyselin na C konci) byl připraven shodně jako sTNFR-I 3D/N105, jako templátu byl však použit sTNFR-I 4D/C105. sTNFR-I 3D/C105 byl rozpuštěn buď v PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35–100 mM NaCl), nebo ve 20 mM octanu, 100 mM NaCl, pH 5,0.

(v). sTNFR-I 3D/C105db byl připraven podobně jako sTNFR-I 4D/C105db, jako výchozí látka byl však použit sTNFR-I 3D/C105 namísto sTNFR-I 4D/C105. sTNFR-I 3D/C105db byl rozpuštěn buď v PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35–100 mM NaCl), nebo ve 20 mM octanu, 100 mM NaCl, pH 5,0.

Příklad II

U různých forem zkráceného rekombinantního rozpustného TNFR-I byla stanovována schopnost inhibovat aktivitu TNF.

A. WEHI cytotoxický test:

Test WEHI je založen na proliferaci buněk *in vitro* (Edwards et al. (1991), Endocrinology, 128:989–996). Buněčné linie jsou citlivé k TNF- α (tzn., že TNF- α je cytotoxický). V přítomnosti inhibitoru TNF- α jsou buňky chráněny před cytotoxickým účinkem a jsou proto schopny proliferace.

Protokol:

Buňky WEHI 164, klon 13, které jsou citlivé k TNF (ATCC, Rockville, MD), byly suspendovány v koncentraci 20×10^4 buněk/ml v RPMI médiu (Gibco, Grand Island, NY) doplněném 5% fekálním hovězím sérem (Fetal Calf Serum, Hyclone, Ogden, UT) a penicilinem se streptomycinem v poměru penicilin 50 U/ml:streptomycin 50 mg/ml. Sto mikrolitrů této buněčné suspenze bylo naneseno do každé z jamek 96místné mikrotitrační destičky s plochým dnem a buňky byly ponechány adherovat po dobu 4 až 6 hodin při 37 °C v 5% CO₂. Do každé jamky bylo přidáno 10 µl aktinomycinu D v koncentraci 0,0060 mg/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Deset mikrolitrů rekombinantního lidského TNF-α o koncentraci 50 ng/ml (konečná koncentrace 5 ng/ml) bylo přidáno do každé jamky. Dvojková ředící řada různých forem sTNFR (sTNFR-I 2.6D/C106, sTNFR-I 4D/C105 a sTNFR-I 4D/C105db) byla naředěna v PBS a z tohoto ředění bylo dvojmo do jamek přidáno 10 µl/jamku, obsahující adherované buňky linie WEHI 164, k nimž byl již dříve přidán rekombinantní lidský TNF-α. Buňky WEHI 164, klon 13 byly inkubovány po dobu 18 hodin při 37 °C v 5% CO₂. Po skončení inkubace bylo přidáno 10 ml roztoku (2 mg/ml) organického barviva, jímž byl MTT tetrazolium (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]2,5-difenyl tetrazolium bromid; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a buňky byly solubilizovány přidáním 50 µl roztoku DMF/SDS (20 % SDS a 50 % N,N-dimethylformamid, pH 4,7). Roztok DMF/SDS byl promícháván několikerým nabráním a vypuštěním do a ze špičky pipety, dokud nebyly všechny krystalky MTT rozpuštěny a buňky byly dále inkubovány po dobu 2 až 22 hodin. Hodnoty absorbance (abs) byly měřeny na čtecím zařízení Vmax při 570 m. Procento specifické cytotoxicity bylo vypočítáno z hodnot optických denzit podle vzorce:

$$\% \text{ specifické cytotoxicity} = 100\% \times [\text{abs (buňky + médium)} - \text{abs (buňky + vzorek)}] / [\text{abs (buňky + médium)} - \text{abs (buňky + TX-100)}].$$

Počet jednotek TNF v každém vzorku byl určen pomocí procentuální specifické cytotoxicity vzhledem k myším standardům tak, jak bylo popsáno dříve.

Výsledky WEHI testu jsou shrnuty níže v tabulce 2:

TABULKA 2: *In vitro* aktivita v testu WEHI

Sloučenina	IC ₅₀ (ng/ml)
sTNFR-I 2.6D/C106	208
sTNFR-I 4D/C105	238
sTNFR-I 4D/C105db	N/A

Na základě výsledku testu WEHI nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v biologické účinnosti in vitro mezi sTNFR-I 2.6D/C106 a sTNFR-I 4D/C105.

B. L929 cytotoxický test:

L929 cytotoxický test je založen na proliferaci buněk in vitro (Parmely et al. (1993), J. Immunol., 151:389-396), a stanovuje rovněž cytotoxicitu na základě citlivosti buněk k TNF-α vedoucí

k jejich zabíjení. Buněčné linie jsou citlivé na TNF- α (tzn., že TNF- α je pro ně cytotoxický). V přítomnosti rozpustného inhibitoru TNF- α jsou buňky chráněny před cytotoxickým účinkem TNF- α , a jsou proto schopné proliferace.

5 Protokol:

Buněčná linie L929 byla získána z American Type Culture Collection (Catalog number CCL 1, NCTC klon 929, klon kmene L, pojivová tkáň, myš). K pomnožení buněk bylo použito RPMI Medium 1640 doplněné 10% FBS (fetální hovězí sérum) + 1% roztok L-glutaminu + 1% roztok penicilin-streptomycinu.

Test byl prováděn v 96místných mikrotitračních destičkách (Corning) tak, že bylo použito pouze 60 vnitřních jamek. Testované a standardní vzorky byly testovány trojmo na téže destičce.

15 TNF- α použitý v testu pochází od R&D Systems (Minneapolis, MN). Ve všech pokusných jamkách byla konečná koncentrace TNF- α 1 ng/ml.

Jako ředidlo bylo v testu používáno růstové médium pro L929, obsahující 10 ng/ml TNF- α a 10 μ g/ml aktinomycinu D (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Destičky byly sklizeny pomocí roztoku XTT/MEN (1,5 mg/ml XTT + 75 mM MEN).

25 První den byly buňky vysety na pokusné destičky. Buněčná suspenze byla připravena trypsinizací a resuspendováním buněk do koncentrace $3,33 \times 10^4$ buněk/ml. Do každé z vnitřních 60 jamek pokusné destičky bylo vyseto 180 μ l této buněčné suspenze. 200 μ l růstového média bylo rozmístěno ve vnějších 36 jamkách, aby byly vyloučeny chyby pokusu způsobené odpařováním. Destičky, přikryté fólií a chráněné před průvanem, byly ponechány při teplotě místnosti asi jednu hodinu. Poté byly umístěny do inkubátoru s vysokou vlhkostí, při teplotě $37 \pm 2^\circ\text{C}$, a v $5 \pm 1\%$ CO₂. Destičky byly inkubovány po dobu přibližně 20 až 22 hodin, poté byl přidán sTNFR-I v různém ředění.

30 Druhý den byl připraven standard sTNFR-I 4D/N105 a pokusné vzorky tímto způsobem: standard s TNFR-I 4D/N105 a pokusné vzorky byly zředěny na koncentraci přibližně 2,0 mg/ml (anebo na jinou vhodnou koncentraci). Byla provedena postupná ředění této koncentrace tak, aby vznikla ředicí křivka o 10 bodech sahající od hodnoty přibližně $1,0 \times 10^6$ ng/ml k $1,0 \times 10^{-3}$ ng/ml, včetně hodnoty 0 ng/ml (pouze testovací ředidlo). Mohou být použity i jiné vhodné koncentrace. Trojmo na každou testovací destičku bylo nanášeno 1 000 μ l z každého ředění. Poté byly destičky inkubovány v inkubátoru s vysokou vlhkostí při teplotě $37 \pm 2^\circ\text{C}$, a v $5 \pm 1\%$ CO₂ po dobu 20 E 1 hodina.

40 Třetí den byl přidáno 50 μ l na jamku roztoku XTT/MEN do 60 vnitřních jamek testovacích destiček. Destičky byly inkubovány v inkubátoru s vysokou vlhkostí při teplotě $37 \pm 2^\circ\text{C}$, a v $5 \pm 1\%$ CO₂ (Falcon, New York, New York) po dobu $24 \pm 0,5$ hodina.

45 Čtvrtý den byly stanoveny hodnoty optické hustoty (OD) pokusných destiček při 450 nm minus 650 nm na čtecím zařízení ELISA (SpectraMAX, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA). Pokud byla pro jamky na destičce při těchto vlnových délkách získána hodnota OD 4000, musela být destička ihned znovu odečtena při 490 nm minus 650 nm, a tyto údaje byly použity pro výpočet.

50 Standardní logaritmická křivka závislosti odpovědi na dávce byla stanovena pomocí čtyřparametrové logistické aproximace. Původní koncentrace neznámých vzorků byly vypočítány ze standardní křivky, pro standard byla vypočtena hodnota ED₅₀ a korelační koeficient byl vypočten ze standardní křivky.

Výsledky:

Výsledky L929 cytotoxického testu jsou shrnuty v tabulce 3.

TABULKA 3: *In vitro* aktivita v L929 cytotoxickém testu

Sloučenina	Koncentrace (mg/ml)	ED ₅₀ (ng/ml)
sTNFR-I 4D/C105db	7,8	1,0 ± 0,1
sTNFR-I 2.6D/C105db	2,6	1,1 ± 0,0
sTNFR-I 2.D/C106db	2,2	1,0 ± 0,1
sTNFR-I 4D/N105-t- -BuPEG (33kDa)	2,0	229,2 ± 8
sTNFR-I 4D/C105-t- -BuPEG (33kDa)	1,1	325,5 ± 147
sTNFR-I 2.6D/C105- t-BuPEG (33kDa)	1,7	210,2 ± 9
Vnitřní standard sTNFR-I 4D/C105	3,5	314,8 ± 188,1

Údaje naznačují, že sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 2.6D/C105db a sTNFR-I 2.6D/C106db jsou aktivní a mají srovnatelnou odpověď na délku v porovnání se standardem. Dále z těchto údajů plyne, že sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG (33kDa), sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG (33kDa) a sTNFR-I 2.6D/C105-t-BuPEG (33kDa) mají téměř o dva řády nižší aktivitu, nicméně jsou ještě v tomto testu aktivní v porovnání s sTNFR-I 4D/C105db.

Pokus #2

sTNFR-I 3D/C105db	0,2	2,2 ± 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*
Vnitřní standard: sTNFR-I 4D/C105	3,5	115,9 ± 42,1

* Hodnota založená na jediném výsledku

Tyto údaje naznačují, že sTNFR-I 3D/C105db je aktivní a hodnoty ED₅₀ jsou v rozmezí hodnot charakterizujících sTNFR-I 4D/C105db (pokus #1), sTNFR-I 2.6D/C105db (pokus #1) a sTNFR-I 2.6D/C106db (pokus #1). Výsledky rovněž ukazují, že sTNFR-I 3D/N105 je méně aktivní než vnitřní standard sTNFR-I 4D/C105.

C. Reaktivací modelový pokus založený na indukci buněčnou stěnou streptokoka:

Reaktivací modelový pokus artritidy indukované buněčnou stěnou streptokoka u krys byl proveden podle známých protokolů (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 krys Lewis (Charle River Laboratories, Inc., Wilmington, MA), každá o váze 175 až 185 gramů, byly intraartikulárně injikovány do kloubu na pravém kotníku se suspenzí preparátu buněčné stěny streptokoka, obsahujícím peptidoglykan–polysacharid (SCW) (Lee Laboratory, Grayson, GA) v dávce 1,5 mg/10 mg na kloub. Fyziologický roztok byl injikován do kontralaterálního kloubu jako kontrola. Intraartikulární injekce SCW způsobuje akutní artritidu relativně krátkého trvání s otokem kloubu, která vrcholí jeden až dva dny po injekci. Po dvaceti dnech, během nichž dozní akutní zánětlivá odpověď, byl opět podán SCW, a to intravenózní injekcí v dávce 200 mg/200 ml na krysu. Druhá dávka je postačující k reaktivaci zánětu v tomto kotníkovém kloubu, do kterého byl předtím injikován SCW, avšak má malý účinek na kotník injikovaný fyziologickým roztokem. Rozsah zánětu během 72 hodin po nitrožilní injekci SCW byl stanoven měřením zadního kotníkového kloubu pomocí kotníkového kaliperu v časech 0, 24, 36, 48 a 72 hodin po reaktivaci artritidy, poté byl zadní kontralaterální kloub odebrán pro histologické vyšetření (např. zánět, vytvoření pannusu, poškození chrupavky a kosti.).

Výsledky:

Byly testovány účinky podání sTNFR-I 2.6D/C106db na vývoj kloubního otoku během reaktivace artritidy. Každý z inhibitorů a slepý vzorek byly podány v jedné intravenózní injekci 24 hodin před reaktivací pomocí SCW.

sTNFR-I 2.6D/C106db vykazoval statisticky významnou účinnost v redukci otoku kloubu, prokázanou analýzou rozptylu (ANOVA) ve „Fischerově post-hoc testu“ (Statview®), ve všech čtyřech dávkách podaných dva nebo tři dny po reaktivaci a ve všech dávkách s výjimkou jedné (1,5 mg/kg) podaných první den. Tato redukce otoku je srovnatelná s pozitivní kontrolou sTNFR-I 4D/C105db, podávanou denně v dávce 0,5 mg/kg (např. 8,8 mM) v časovém rozmezí od prvního dne před reaktivací do třetího dne po reaktivaci. Preparáty sTNFR vykazovaly také významnou účinnost, pokud hodnotíme rozsah otoku jako celek v průběhu tří dnů. Plocha vymezená křivkou (AUC) má charakter závislosti odpovědi na dávce při všech dávkách (viz obrázek 9, sTNFR-I 2.6/C106db je označen „sTNFR-I 2.6D“ a sTNFR-I 4D/C105db je označen „sTNFR-I 4D“).

sTNFR-I 2.6D/N105–t-BuPEG (33kDa) vykazoval významnou redukci v šířce kloubu a histologických indexech ve srovnání s kontrolní skupinou v pokusu modelujícím onemocnění.

D. Modelový pokus s použitím

D–galaktosamin/lipopolysacharidu:

D–galaktosamin (D–GalNH₂)/lipopolysacharidový (LPS) model (Parmely et al. (1993), viz výše) je modelový pokus *in vivo*, založený na zvířecí letalitě vysoce závislé na TNF-α. Kromě toho u autoimunních myši MRL-lpr/lpr byla prokázána extrémní citlivost k LPS– nebo SEB–indukovanému TNF-α (Mountz et al. (1995), *J. Immunol.*, 155:4829–4837).

Protokol:

U 6–8 týdnů starých myších samic (MRL–lpr/lpr) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) byla po hladovění přes noc i.p. injekcí vyvolána reakce na následující farmakologické preparáty: 25 mg D–GalNH₂ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suspendovaný v Hanksově balancovaném solném roztoku (Gibco Laboratories, Inc., Grans Island, NY) (50 mg/ml); lipopolysacharid (LPS) z E. coli sérotypu 0127:B8 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ve sterilním, endotoxinu prostém, fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS) (25mg/myš), anebo SEB (Toxin Technologies, Sarata, FL) v běžném fyziologickém roztoku (50 mg/myš). Různé formy sTNFR byly podávány v postupném dvojnásobném ředění (dávka v mg/kg) tak, aby byla získána křivka ED₅₀ s využitím statistického softwaru od firmy MacIntosh (Statview®, Mountain View, CA). Letalita byla sledována během 48 hodin po vyvolání reakce.

Výsledky:

Jak ukazuje tabulka 4 níže, jestliže byl sTNFR–I 2.6D/C106db podán tak, jak bylo výše popsáno, 1 hodinu před podáním LPS/DGalNH₂, byla hodnota ED₅₀ (tj. dávka sTNFR–I 2.6D/C106db nutná pro 50% ochranu myši) v čase 48 hodin R 50 µg/kg (N = 8 myších jedinců). V porovnání s sTNFR–I 4D/C105db nebyly zjištěny žádné významné rozdíly (P > 0,05) ve schopnosti této formy zabránit letalitě.

(ED₅₀ = ~ 50 µg/kg; N = 8 myších jedinců).

TABULKA. 4: Srovnání sTNFR a optimalizovaných forem sTNFR v modelovém 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 (33kDa)	~ 2 mg/kg	~ 400 µg/kg
sTNFR–I 2.6D/N105– –MePEG (20kDa)	~ 800–1000 µg/kg	~ 1 mg/kg
sTNFR–I 2.6D/N105– –MePEG (20kDa rozvětvený)	2 mg/kg	~ 1–1,5 mg/kg
sTNFR–I 2.6D/N105– –MePEG (40kDa rozvětvený)	1,5 mg/kg	~ 1 mg/kg

Uvedené údaje ukazují, že sTNFR–I 2.6D/C106db má stejnou aktivitu jako sTNFR–I 4D/C105db, avšak sTNFR–I 2.6D/N105–T–BuPEG (33kDa) je v tomto modelovém pokuse méně aktivní (hodnota ED₅₀ je R400 µg/kg (n = 5 myších jedinců). Kromě toho byly sTNFR–I 2.6D/N105–MePEG (20 kDa rozvětvený) a 2.6D/N105–MePEG (40kDa rozvětvený) v tomto pokuse méně účinné.

E. Pokusný model artritidy indukované pomocí adjuvans:

Revmatoidní artritida indukovaná u krys pomocí adjuvans se v mnohém podobá revmatoidní artritidě u lidí. Účelem tohoto pokusu je demonstrovat, že systémové podání zkrácených forem sTNFRs má zmírňující účinek na patogenezi artritidy vyvolané pomocí adjuvans u myši.

Protokol:

Samci krys Lewis (5–7 ve skupině) (Charles Laboratories, Inc., Wilmington, MA) o váze nejméně 200 g byli kanylováni katétrem SQ a ponecháni zotavit se po dobu několika dnů. Potom byli umístěni do infuzních klecí a klimatizováni po dobu jednoho týdne před začátkem infuzí fyziologickým roztokem.

V den 0 byly všechny krysy injikovány se 100 μ l Freundova kompletního adjuvans (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), ke kterému bylo přidáno syntetické adjuvans M,N-dioktyldecyl-decyl-N',N-bis(2-hydroxy-ethyl)propandiamin, 50 mg/ml. Osmý den byla různým skupinám krys podávána SQ kontinuální infuze sTNFR-I 4D/C105 a sTNFR-I 2.6D/N105.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.

TABULKA 5: Artritida indukovaná pomocí adjuvans

Sloučenina	Dávka	AUC%	Hmotnost tlapky	Zánět	Res. kosti
	(mg/kg/hod)	(% inhib.)	(% inhib.)	Histopatologie (% inhib.)	(% inhib.)
Pokus#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
Pokus#2					
sTNFR-I 2.6D/N105	5	42	ND	19	67
	1	38	ND	13	49
Pokus#3					
sTNFR-I 2.6D/N105-- -MePEG (20kDa)	9	50	40	13	27
	3	35	34	9	22
	1	36	30	0	0
sTNFR-I 2.6D/N105-- -MePEG (33kDa)	9	43	37		
	3	38	33		
	1	24	20		

Formy sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa) a sTNFR-I 4D/C105db měly srovnatelnou anti-artritickou aktivitu pro případ artritidy vyvolané pomocí adjuvans u kryš Lewis, ačkoliv sTNFR-I 4D/C105db je účinnější v *in vitro* cytotoxických testech WEHI-164 a L929, stejně jako v pokusném modelu LPS/GalN.

F. Model artritidy indukované kolagenem:

Artritida indukovaná kolagenem typu II u kryš v mnohém připomíná revmatoidní artritidu u lidí. Účelem tohoto pokusu bylo demonstrovat, že systémové podání zkrácených forem sTNFR má zmírňující účinek na patogenezi artritidy vyvolané kolagenem typu II u kryš a myši.

Protokol pro krysy:

Krysím samicím Lewis (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA) byly implantovány kanyly SQ, krysy byly přivyknuty na upoutání během kontinuální infuze. Poté byly imunizovány bovinním kolagenem typu II ve Freundově kompletním adjuvans. 13., 14. nebo 15. den po imunizaci byla zvířata s rozvinutou artritidou náhodně rozdělena do skupin po osmi jedincích. Infuze různých dávek sTNFR-I nebo slepého vzorku (vehikula) byla podávána pokusným skupinám po dobu sedmi dnů, jak je popsáno v tabulce 6. Zánět v tlapce byl hodnocen denním měřením kotníkových kloubů kaliperem. Sedmý den byla zvířata šetrně usmrcena a tlapy byly odebrány k určení váhy, která slouží jako index zánětu. Kotníkové a kolenní klouby byly odebrány k histopatologickému vyhodnocení parametrů artritidy.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6A.

TABULKA 6A: Artritida indukovaná kolagenem

Sloučenina	Dávka	AUC%	Hmotnost tlapky	Zánět	Res. Kosti
	(mg/kg/hod)	(% inhib.)	(% inhib.)	Histopatologie (% inhib.) (% inhib.)	
Pokus#1					
sTNFR-I	5	65	81	ND	ND
4D/C105	1	35	34	ND	ND
	0,2	19	22	ND	ND
sTNFR-I 2.6D/N105	1	39	41	ND	ND
Pokus#2	(mg/kg/hod)				
sTNFR-I 2.6D/N105- MePEG (33kDa)	3	50	60	76	46
sTNFR-I 4D/N105- MePEG (33kDa)	3	47	50	ND	ND

Pokus#3	(mg/kg/hod)				
sTNFR-I 2.6D/N105- -MePEG (33kDa)	9	25	44	ND	ND
sTNFR-I 2.6D/N105- -MePEG (33kDa)	3	25	37	ND	ND
sTNFR-I 2.6D/N105- -MePEG (20kDa)	9	35	52	ND	ND
sTNFR-I 2.6D/N105- -MePEG (20kDa)	3	35	37	ND	ND

Je zajímavé, že v krysím modelu kolagenem indukované artritidy byly účinnost u všech léčených skupin téměř shodná (např. tvar křivky procento (%) inhibice plochy vymezené křivkou (AUC) bylo v rozmezí 30–59 %, inhibice hmotnosti tlapky se pohybovala v rozmezí 40–64 %). V tomto modelu artritidy byla skupina zvířat, která nebyla léčena, statisticky významně odlišná.

Protokol pro myši:

Samci DBA/1 (Jackson Laboratories, Inc. Bar Harbor, ME) byli imunizováni bovinním kolagenem typu II (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ve Freundově nekompletním adjuvans. 24., 25. a 26. den po imunizaci byla zvířata s rozvinutou artritidou náhodně rozdělena do skupin po osmi zvířatech. Jedincům v pokusných skupinách byl dvakrát denně i.p. cestou podáván buď fyziologický roztok, anebo sTNFR-I 2.6 D/N105-mePEG(33kDa) po tři dny za sebou (dny +27, +28, +29). Zánět v tlapce byl hodnocen denním měřením kotníkových kloubů kaliperem. 34. den byla zvířata šetrně usmrcena a tlapky byly odebrány ke stanovení jejich hmotnosti, která slouží jako index zánětu. Kotníkové a kolenní klouby byly odebrány k histopatologickému vyhodnocení parametrů artritidy.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 6B.

TABULKA 6B: Artritida indukovaná kolagenem

Sloučenina	Dávka	AUC%	Celkem
	(mg/kg 2D)	(% inhib.)	Histopatologie (% inhib.)
Pokus#1			
sTNFR-I 4D/C105db	3	49	39
Pokus#2			
sTNFR-I 2.6D/N105- -MePEG (33kDa)	9	73	ND
sTNFR-I 2.6D/N105- -MePEG (33kDa)	3	75	ND

G. Krysí model produkce TNF- α indukované kontinuální infuzí LPS:

sTNFR-I 2.6D/C105db a sTNFR-i 2.6D/C106db, sTNFR-I 2.6D/N105 a sTNFR-I 4D/N105 byly i.v. jugulárně implantované pomocí AlzetTM minipumpy (Alza Corp., Palo Alto, CA), podle návodu výrobce, pro 48 hodinovou kontinuální infuzi (1 mg/kg). Hladiny TNF- α v séru měřené testem ELISA (Genzyme, Cambridge, MA) byly významně sníženy ve srovnání s kontrolami měřenými +2 hodiny po podání vysoké dávky LPS.

Příklad III: Imunologické testy

Imunogenicita různých forem zkráceného rekombinantního rozpustného TNFR-I byla stanovována v několika zvířecích modelech.

A. Hlodavci:

sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG(33kDa) a sTNFR-I 4D/C105db byly subkutánně podány (4 mg/kg) v prvním a pátém pokusném dnu krysích samicích Sprague Dawley (Charles Rivers Labs, Wilmington, MA) (n = 6 až 8 ve skupině). Retroorbitální vzorky krve byly odebírány týdně až do 21. dne od začátku pokusu. Ve vzorcích byla stanovena produkce protilátek IgM a IgG.

TABULKA 7: Imunogenicita u hlodavců

Čas [dny]	0,01	7	14	21
SKUPINA+ZVÍŘE	Titř IgM	Titř IgM	Titř IgM	Titř IgM
sTNFR-I 2.6D/N105- 33kDaPEG				
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 2.6/N105- -t-BuPEG (33kDa)	0	0,00	0,00	0,00
SEM	0	0,00	0,00	0,00
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

Čas [dny]	0,01	7	14	21
SKUPINA+ZVÍŘE	Titř IgG	Titř IgG	Titř IgG	Titř IgG
sTNFR-I 2.6D/N105-				
-t-BuPEG (33kDa)				
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-	0,00	0,00	0,00	0,00
-t-BuPEG (33kDa)				
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 tabulky 7 je patrné, že sTNFR-I 4D/C105db, podaný subkutánně (SC) 1. a 5. den, poskytuje vyšší titry krysích anti-sTNFR-I IgG protilátek do 21. dne, než sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa), který má téměř nulové titry protilátek. Podobné trendy imunogenicity byl pozorován i v případě krys produkujících anti-sTNFR-I IgM protilátky do 21. dne. sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33 kDa) nevyvolával tvorbu krysích anti-sTNFR-I IgM protilátek do 21. dne.

B. *Papio anubis*:

Předmětem části 1, fáze A v této studii bylo stanovení farmakokinetiky a imunogenicity sTNFR-I 4D/C105db (0,2 mg/kg živé váhy [BW]), sTNFR-I 3D/C105db (0,2 mg/kg BW) a sTNFR-I 2.6D/C105db (0,2 mg/kg BQ), které byly i.v. dvakrát podány zdravému paviánovi ve 21 denním intervalu.

Část 1 studie byla rozdělena do dvou fází. Cílem fáze A bylo stanovení farmakokinetiky a imunogenicity různých preparátů sTNFR-I u zdravého paviana v odpovědi na dvě injekce. Dvanáct paviánů bylo rozděleno do tří skupin. Jedinci z každé skupiny dostali v anestézii 0,2 mg/kg BW sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 3D/C105db nebo sTNFR-I 2.6D/C105db. Během jednoho pokusu byli studováni tři paviani. Zvířata byla sledována po dobu 21 dnů, potom obdržela druhou identickou i.v. injekci proteinu a byla studována po dalších 21 dnů. Farmakokinetika a imunogenita byla stanovována v níže uvedených intervalech.

Cílem fáze B této studie bylo určení účinnosti těchto preparátů na dobře prozkoumaném modelu letality způsobené TNF- α (Espat et al., J. Surg. Res., 59:153–158, 1995). U 16 zvířat rozdělených do skupin po 4 jedincích byla indukována letální *E. coli* bakteriémie podáním 5–10 x 10¹⁰ cfu/kg živé váhy. Skupina, která dostala placebo byla porovnávána s paviany, kteří byli předem i.v. injikováni se sTNFR-I 4D/C105db (0,2 mg/kg živé váhy [BW]), sTNFR-I 3D/C105db (0,2 mg/kg BW) a sTNFR-I 2.6D/C105db (1 mg/kg BW).

V obou fázích studie 1 byli mladí, dospělí paviani *Papio anubis*, samci i samice, (6–11 kg), (Biomedical Research Foundation, San Antonio, TX) ponecháni hladovět přes noc. Anestézie zvířat byla provedena ketaminem (10 mg/kg i.m.) a cefalika (povrchová žíla horní končiny) byla perkutánně kanylována. Anestézie byla udržována prvotním podáním až 35 mg/kg pentobarbitalu sodného, pak následovaly opakované injekce 3–5 mg/kg/hod pentobarbitalu sodného. Horní cesty dýchací byly zajištěny umístěním endotracheální trubice s manžetou a zvířata si uchovávala spontánní dýchání. Do femorální tepny byl perkutánně umístěn katétr umožňující opakovaný odběr arteriálních krevních vzorků, stejně jako nepřetržité sledování srdečního pulzu a středního arteriálního krevního tlaku s pomocí monitoru anestézie a srdeční činnosti Datascope 2000 (Datascope, San Antonio, TX). Vzorky krve z arterie byly odebírány v intervalech, antikoagulovány s EDTA nebo heparinem a bezprostředně po odběru byly chlazeny na ledu. Frakce krevní plazmy byla oddělena centrifugací při 4 °C a uchovávána při –70 °C až do okamžiku analýzy. Vnitřní tělesná teplota zvířat byla sledována rektální sondou. Trvale připojený urinární Foleyův katétr byl umístěn do močové trubice tak, aby bylo možno sledovat vylučování moče a clearance kreatininu. Každých patnáct minut byly sledovány hemodynamické parametry. Všechna zvířata dostala 0,9% chlorid sodný (4 ml/kg) po udržení i.v. tekutin. Během fáze B pokusu dostávala zvířata další tekutinu (10 ml/kg každých 15 minut), dokud nebylo dosaženo dvou z následujících fyziologických kritérií: 1) střední arteriální tlak poklesne o více než 30 %; 2) tepová frekvence se zvýší o více než 30 % 3) výdej moči poklesne na méně než 1 ml/kg/hod. Po odběru krevních vzorků reprezentujících základní hodnoty a nejméně hodinu trvajícím obdobím klidu k dosažení rovnováhy začala infuze proteinů.

Během fáze A této studie byla infuze rekombinantních proteinů provedena *via* cefalika (povrchová žíla horní končetiny), zvířata byla pozorována po dobu osmi hodin, poté byly odstraněny všechny katetry a zvířata byla vrácena do svých klecí na dobu 21 dní. Za 24 a 48 hodin a dále pak ve 3., 5., 8., 11., 16. a 21. dnu byla u zvířat provedena lehká anestézie i.m. injekcí ketaminu (10 mg/kg) a byly odebrány vzorky žilní krve. 21. den byla anestézie opakována, byla podána druhá aplikace proteinu a celý postup započatý v den 0, byl opakován po dalších 21 dnů, kdy po této době byla zvířata šetrně usmrcena.

Během fáze B této studie byla jednu hodinu před infuzí *E. coli* náhodně vybrána čtyři zvířata, která dostávala buď placebo, anebo jeden z výše zmíněných rekombinantních preparátů. Zvířata byla sledována po dobu osmi hodin, poté byly všechny katetry odstraněny, a zvířata byla navrátna do klecí a bylo pozorováno případné přežívání letální bakteriémie. Zvířata, která nadměrně trpěla, byla šetrně usmrcena. Nadměrné utrpení je IACUC definováno tak: 1) neschopnost stát nebo sedět po dobu 12 hodin, 2) neschopnost přijímat potravu či vodu po dobu 12 hodin, 3) nezvladatelné krvácení z míst, v nichž byly zavedeny katetry, anebo 4) neodpovídavost na vnější podněty. Vzorky žilní krve byly odebírány v časech –1, 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 hodin, 48 hodin a ve dnech 3, 5, 8, 11, 16 a 21. Ve 21. dnu byla zvířata, která do této doby přežila, šetrně usmrcena.

Přítomnost *Papio* protilátek proti podaným rekombinantním proteinům byla stanovována pomocí sendvičového testu ELISA. Velice stručně popsáno, ELISA destičky byly potaženy s preparáty sTNFR-I (1 µg/ml), pak byla přidána ředěná (1:50 až 1:100 000) paviánní plazma (100 µl). Po promytí vzorků byl přidán konjugát křenuvé peroxidázy a proteinu A (0,5 µg/ml), reakce byla vizualizována s pomocí TMB.

Výsledky (Část I):

Tři kombinantní preparáty se významně lišily poločasem života v plazmě. Křivky popisující vymizení byly stanoveny metodou nezávislou na modelu a poločasy byly obecně hodnoceny mezi 8 až 172 hodinami. U nedotčených zvířat vstupujících do pokusu byl poločas života v plazmě nejdelší u paviánů, kterým byl podán 4.0 doménový konstrukt (29 hod) a postupně klesal u paviánů, kterým byl podán sTNFR-I 3D/C105db (24,7 hod) a sTNFR-I 2.6D/C105db (21,5 hod). Rozdíl, byť statisticky významný, byl pouhým 26%.

Po druhém podání proteinů příslušným paviánům měly poločasy života v plazmě neočekávanou tendenci k výraznému zkrácení, což naznačuje rychlejší vylučování (clearanci). Tato redukce poločasů byla nejvýraznější u paviánů ošetřených s sTNFR-I 4D/C105db, u nichž byly poločasy kratší o 48 % ($p < 0,01$) [obrázek 10]. Střední redukce poločasů byla u paviánů ošetřených s sTNFR-I 3D/C105db (31 %) [obrázek 11] a nejmenší u zvířat, kterým byl podán sTNFR-I 2.6D/C105db (14 %) [obrázek 12]. U paviánů, kteří dostali sTNFR-I 2.6D/C105db, nebyly redukce poločasů statisticky odlišné.

Všechny preparáty byly u paviánů imunogenní. Avšak nejvyšší hodnota imunogenicity byla nalezena u paviánů ošetřených s sTNFR-I 4D/C105db, střední u zvířat ošetřených s sTNFR-I 3D/C105db a nejnižší u zvířat, kterým byl podán sTNFR-I 2.6D/C105db (tabulka 8).

TABULKA 8: Vrcholy protilátkové odpovědi¹

	Prvních 21 dnů		Druhých 21 dnů	
	Střední hodnota	25 % - 75 %	Střední hodnota	25 % - 75 %
sTNFR-I 4D/C105db (n=4)	3,20	3,20 3,20	3,95	3,50 4,40
sTNFR-I 3D/C15db (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	1,45	0,00 3,50

¹ logaritmické měřítko (převrácená hodnota ředění plazmy potřebná k dosažení poloviny maxima absorbance v sendvičovém testu ELIA; viz Experimentální metody).

* $p=0,056$, stanoveno dle Kruskal–Wallis dvoufaktorovou ANOVA (analýzou variace) (hodnoty vyjádřené logaritmičsky nebyly použitelné v normálním rozložení).

Protilátkové odpovědi se obecně rozvíjely kolem osmého dne po podání rekombinantního konstruktů a byly přítomny během 21-denního testovacího období. Kromě toho měly protilátkové odpovědi tendenci být silnějšími během odpovědi na druhou injekci proteinových konstruktů.

Všichni čtyři paviáni, kteří dostali sTNFR–I 4D/C105db, vytvářeli protilátky, dvě ze čtyř zvířat, kterým byl podán sTNFR–I 3D/C105db a jeden ze čtyř paviánů, kterým byl podán sTNFR–I 2.6D/C105db rovněž tvořili protilátky. Velikost protilátkové odpovědi (vyjádřená logaritmičsky) dle Kruskal–Wallis ANOVA se významně lišila mezi třemi skupinami jako Funkce času ($p<0,05$). „Post-hoc analýza“ naznačuje, že významný rozdíl v protilátkové odpovědi byl především mezi zvířaty, která dostala sTNFR–I 4D/C105db a sTNFR–I 2.6D/C105db, střední (a nevýznamné) odpovědi byly nalezeny u zvířat, kterým byl podán sTNFR–I 3D/C105db.

Byla pozorována korelace mezi tvorbou protilátek a změnou v clearanci mezi oběma 21denními studii ($p<0,01$). U zvířat se silnou protilátkovou odpovědí na první podání konstruktů byl podle očekávání protein po druhém podání rychleji vylučován. Změna v clearanci po prvních a druhých injekcích byly porovnány u zvířat, u nichž se vyvinula protilátková odpověď ($n=7$) a u těch, u nichž se odpověď nevyvinula ($n=5$) [obrázek 13].

Přímá cytotoxicita na buněčnou linii ME–180 a neutralizační kapacita v testu L–929 testu byla hodnocena u protilátek nalezených v plazmě paviánů u vybraného počtu zvířat. Žádná cytotoxicita ani neutralizace nebyly nalezeny u protilátek proti kterémukoliv ze tří zkoumaných konstruktů.

Ve fázi A studie u paviánů, vykazují zvířata, která rozvinula nejsilnější protilátkovou odpověď, nejrychlejší zvýšení v clearanci konstruktů po jejich druhém podání. Taková zjištění naznačují, že protilátková odpověď může redukovat biologický poločas a tedy i terapeutickou účinnost konstruktů, a proto může být vyžadována úprava dávky. Nezdá se však být prokázána jakákoliv nepříznivá klinická odpověď na přítomnost protilátek, jestliže konstrukty byly podány po druhé. Terapeutické úsilí, které je zaměřeno na modifikace takových konstruktů ke snížení jejich imunogenicity bez významného ovlivnění poločasu účinnosti, směřuje primárně k omezení potřeby zvýšit dávku, spíše než ke snížení rizika nepříznivých vedlejších reakcí.

Část 1 fáze B Výsledky:

Závěrem je možné kontrolovat, že všechny tři konstrukty jsou téměř stejně účinné u dosud nedotčených zvířat a zabráňují poškození způsobenému cytokiny během bakteriémie *E. coli*, pokud jsou podávány v dávce 1,0 mg/kg BW. Přežil jeden ze čtyř paviánů, kteří dostali placebo, dále přežili 4 ze 4 paviánů léčených sTNFR–I 4D/C105db nebo sTNFR–I 3D/C105db a 3 ze 4 paviánů léčených sTNFR–I 2.6D/C105db. Všechny tři konstrukty zabráňují biologické aktivitě TNF– α a mají dostatečnou neutralizační kapacitu.

Část II:

Cílem části II studie u paviánů bylo určit, zda má opakovaná expozice zvířat (tj. 3 oddělené injekce) k různým sTNFR–I konstruktům za následek další imunogenicitu a snížený poločas. Kromě toho tato studie byla navržena tak, aby byla srovnávána imunogenicitu a farmakokinetika několika sTNFR–I konstruktů, zahrnující sTNFR–I 4D/C105db a sTNFR–I 2.6D/C105db, dále sTNFR–I 2.6D/N105–t–BuPEG(33kDa) a sTNFR–I 4D/N105–t–BuPEG(33kDa). Konečně tato studie byla zaměřena na zhodnocení klinického významu protilátkové odpovědi a změn clearance pro následnou odpověď k poškození způsobenému TNF– α (*E. coli* bakterií).

Ve dnech 0, 21 a 42 byly paviánům podány i.v. (0,2 mg/kg) různé konstrukty (sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 2.6D/C105db, sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG(33kDa) a sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33kDa). 63 den dostali paviáni 2,0 mg/kg BW příslušného konstruktu. 65. den (tj. o 48 hodin později) byla paviánům podána letální dávka *E. coli*, jak bylo popsáno výše v části I. Hlavní poznatky z části II jsou následující.

Výsledky (část II):

U nedotčených paviánů mají sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33kDa) a sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG(33kDa) obecně delší poločasy života než sTNFR-I 4D/C105db a sTNFR-I 2.6D/C105db bez ohledu na počet domén. Délka poločasu života se pohybovala v rozmezí od 30 do 35 hodin u monopegylovaných forem sTNFR-I, na rozdíl od rozmezí 10 až 20 hodin u dimerických pegylovaných forem. Kromě toho u nedotčených zvířat mají sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33kDa) a sTNFR-I 4D/C105db delší poločasy života, což sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG(33kDa) a sTNFR-I 2.6D/C105db.

sTNFR-I 4D/C105db a sTNFR-I 2.6D/C105db byly také imunogenní, s mírným trendem k nižší imunogenicitě u sTNFR-I 2.6D/C105db. Avšak pouze sTNFR-I 4D/C105db vykazoval redukovanou clearanci po opakovaném podávání. sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33kDa) a sTNFR-I 2.6/N105-t-BuPEG (33kDa) nebyly ani antigenní, ani se rychlost jejich clearance významně neměnila po opakovaném podávání.

Byla stanovena *in vitro* imunoreaktivita (pomocí „ELISA sandwich capture“) k jiným konstrukům, získaným ze séra každého z paviánů (N=3), kteří byli ošetřeni odlišnými sloučeninami 21., 42. a 61. den, a to s použitím odlišných konstruktů jako záchytného (capture) antigenu. Tak například, sérum získané z paviánů, kterým byl podán sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG(33kDa) v +21.den (tabulka 9) „nereaguje“ ani s sTNFR-I 4D/C105db, ani s sTNFR-I 4D/N105, jestliže tyto sloučeniny byly použity na ELISA destičkách jako záchytné antigeny.

Tabulka 9
Imunitní reakce paviánů
I₉G (titr $\geq$ 1:400) Den 21

Počet zvířat: n=3	STNFR-I 2.6D/C105db	STNFR-I 2.6D/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.	3/3 neg

Za pozitivní byla pokládána protilátková odpověď o titru $> 1:400$. Údaje ze 42. a 61. dne jsou shrnuty v tabulkách 10 a 11. Za důležitý je považován fakt, že sérum z jednoho paviána, kterému byl podán sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG(33kDa), vykazovalo pozitivní reakci *in vitro* při testování se sTNFR-I 4D/C105db záchytným antigenem.

5

Tabulka 10
Imunitní reakce paviánů
I_gG (titr $\geq$ 1:400) Den 42

Počet zvířat: n=3	STNFR-I 2.6D/C105db	STNFR-I 2.6D/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. (1600)			3/3 neg	3/3 neg
STNFR-I 4D/N105-t- BuPEG (33kDa)				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)

Tabulka 11
Imunitní reakce paviánů
IgG (titr $\geq 1:400$) Den 61

Počet zvířat: n=3	STNFR-I 2.6D/C105db	STNFR-I 2.6D/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. (1500)	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)				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)

U pavíánů, kteří byli předem třikrát vystaveni působení konstruktů byla účinnost vyvolané odpovědi na poškození zprostředkované TNF nejvyšší u (1) sTNFR-I 4D/C105db, (2) sTNFR-I 2.6D/C105db, (3) sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33kDa) a (4) sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG(33kDa) (jak bylo stanoveno na základě přežívání, systémového selhání orgánů, IL-6 v séru a WBC odpovědi). Nedostatkem této studie je fakt, že nebrala v úvahu rozdíly ve schopnosti různých rekombinantních proteinů neutralizovat TNF.

C. Šimpanz

Cílem této studie bylo stanovit imunogenicitu různých forem sTNFR-I, které byly opakovaně injikovány i.v. cestou šimpanzům v průběhu jednoho měsíce. Byly testovány následující formy sTNFR-I: sTNFR-I 2.6D/C105db, sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33kDa), sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG(33kDa) a sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33kDa). V jedné pokusné skupině byli celkem tři šimpanzi.

Dávkovací režim a parametry této studie byly následující: Každý šimpanz dostával pokusný vzorek v podobě intravenózní injekce (0,1 mg/kg) dvakrát týdně v pondělí a v pátek po dobu čtyř týdnů (celkem 8 dávek). Objem dávky se měnil v závislosti na koncentraci podávaného vzorku. 5 ml séra bylo odebráno každému zvířeti v den 0 před začátkem pokusu. Další vzorky séra byly odebírány těsně před podáním preparátu 1., 14., 21. a 28. den.

Základní údaje o imunogenicitě u šimpanze jsou uvedeny v tabulce 12.

TABULKA 12

Výsledky protilátek IgG - Titr (počet šimpanzů)

	Den 0 (Pre-dávka)	Dan 7 (2 dávky)	Den 14 (4 dávky)	Den 21 (6 dávek)	Den 28 (8 dávek)
sTNFR-I 2.6D/C106db			1100 (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/N105-t- BuPEG (33kDa)				200 (1) * 1600 (1)	100 (1) * 400 (1)
*Poznámka: Titry pozorované s použitím sTNFR-I 4D/C105db jako záchytné (capture) antigen					

5 Do 28. dne byla u všech zvířat ($n=3$), kterým byl podáván sTNFR-I 4D/C105db nebo sTNFR-I 2.6D/C105db, zaznamenána pozitivní reakce (stanoveno testem ELISA), s pozorovanými nejvyššími naměřenými titry 1:12800 nebo 1:3200 (tabulka 12). (Poznámka: V této části pokusu byly všechny „imunizující“ antigeny použity jako odpovídající záchytné antigeny imobilizované na ELISA destičce). Jedno zvíře ošetřené s sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33kDa) mělo pozitivní protilátkovou reakci 21. a 28. den (tabulka 12). Významné je zjištění, že u žádných zvířat ošetřených během tohoto pokusu s sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33kDa) nebo sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG(33kDa) nebyla pozorována tvorba protilátek proti sTNFR-I (tabulka 12).

10 Tak, jak bylo popsáno v části týkající se pavíánů, bylo 28. den odebráno sérum všem šimpanzům ($n=3$), kteří byli ošetřeni s různými formami sTNFR-I, a sérum bylo testováno na *in vitro* imunoaktivitu (metodou ELISA) proti jiným konstruktům s použitím forem sTNFR-I jako záchytných antigenů. Pozitivní reakcí byla protilátková odpověď o titru $>1:400$. Je významné, že sérum získané od šimpanzů, kterým byl podáván sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG(33kDa) „nereaguje“ ani s sTNFR-I 4D/C105db, ani s sTNFR-I 4D/N105, když byly tyto sloučeniny použity jako záchytné antigeny na ELISA destičce (tabulka 13).

20 Totéž bylo rovněž pozorováno u zvířat ošetřených s sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33kDa) nebo sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33kDa) (tabulka 13).

TABULKA 13

Výsledky protilátek u šimpanzů

I₉G (titr $\geq 1:400$)

Počet zvířat: n=3	STNFR-I 2.6D/C105db	STNFR-I 2.6D/N105-t- BuPEG (33kDa)	STNFR-I 4D/C105-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)

Příklad IV

EAE je akutní nebo chronická recidivující zánětlivá demyelinizující choroba CNS, která vzniká jako důsledek působení neuroantigenů, jako je např. myelinový bazický protein (MBP), na geneticky citlivá zvířata. EAE představuje uznávaný a často užívaný model akutní lidské MS.

Krysí samice Lewis (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) byly v anestézii imunizovány na chodidle levé zadní končetiny (den 0) s 0,1 ml emulze obsahující myelinový bazický protein (MBP) v kompletním Freundově adjuvans rozpuštěný v PBS se stejným objemem kompletního Freundova adjuvans (CFA) obsahujícího 5 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco Lab MI). Kontrolním krysám byl podán 0,1 ml PBS/CFA emulze bez MBP do chodidla levé zadní končetiny.

Klinické hodnocení nemoci je založeno na obvyklém bodovacím systému 0 až 5. Následující stavy jsou přiřazeny jednotlivým hodnotám: 0, normální; 0,5, částečná ztráta ocasního tonusu; 1, úplná ztráta ocasního tonusu; 2, vláčení jedné zadní končetiny; 3, paralýza obou zadních končetin; 4, umírání; 5, smrt. Všechny injekce konstruktů sTNFR-I nebo slepého vzorku (vehikula) byly podávány subkutánně (s.c.) v dávce 1 mg/kg každý další den počínaje 9. dnem po imunizaci. Pokus byl ukončen u všech zvířat 21. den. Výsledky jsou vyjádřeny ve dvou podobách, jednak jako skóre klinické závažnosti v průběhu času, jednak je integrované skóre každé krysy v celém průběhu choroby spočítáno jako plocha vymezená křivkou závislosti denního klinického skóre na čase. Hodnoty integrovaného klinického skóre léčených skupin je srovnány s hodnotami kontrolní skupiny pomocí Mannova-Whitneyova testu.

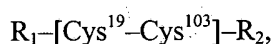
Zvířata, kterým byl podán slepý vzorek (vehikulum), projevovала začátek onemocnění kolem desátého dne, nemoc vrcholila 16. den a potom ustupovala. sTNFR-I 4D/C106db zmírňoval klinické příznaky o zhruba 73 % ve srovnání se zvířaty léčenými slepým vzorkem. sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33kDa) rovněž zmírňoval klinické příznaky o zhruba 85 %. sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33kDa) a sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33kDa) byly stejně účinné ve zmírňování klinických příznaků (64 a 57 %).

Lze uzavřít, že zkrácené formy sTNFR se zdají být klinicky účinné v tomto zvířecím modelu MS.

Ačkoliv tento vynález byl výše popsán jak v obecné podobě, tak v podobě konkrétních výhodných provedení, odborník v oboru snadno nalezne další jeho obměny a modifikace na základě předkládaného popisu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Zkrácený rozpustný receptor faktoru nekrotizujícího tumory, sTNFR, obecného vzorce



kde

$[Cys^{19}-Cys^{103}]$ představuje zbytky 19 až 103 sTNFR-I z obrázku 1 (SEQ ID NO:2); a

kde R_1 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu Cys^{19} nebo aminoskupinu aminoterminálního aminokyselinového zbytku ze skupiny

C

IC

SIC

NSIC (SEQ ID NO:15)

NNSIC (SEQ ID NO:16)

QNNSIC (SEQ ID NO:17)

PQNNNSIC (SEQ ID NO:18)

HPQNNNSIC (SEQ ID NO:19)

IHPQNNNSIC (SEQ ID NO:20)

YIHPQNNNSIC (SEQ ID NO:21)

KYIHPQNNNSIC (SEQ ID NO:22)

GKYIHPQNNNSIC (SEQ ID NO:23)

QGKYIHPQNNNSIC (SEQ ID NO:24)

PQGKYIHPQNNNSIC (SEQ ID NO:25)

CPQGKYIHPQNNNSIC (SEQ ID NO:26)

VCPQGKYIHPQNNNSIC (SEQ ID NO:27)

SVCPCQKYIHPQNNNSIC (SEQ ID NO:28)

DSVCPQKYIHPQNNNSIC (SEQ ID NO:29),

5 a kde R_2 představuje karboxyskupinu Cys¹⁰³ nebo karboxyskupinu karboxyterminálního amino-
kyselinového zbytku vybraného ze skupiny:

F

FN

FNC

FNCS (SEQ ID NO:30)

FNCSL (SEQ ID NO:31)

FNCSLC (SEQ ID NO:32)

FNCSLCL (SEQ ID NO:33),

10 kde uvedené sTNFRs mají sníženou antigenicitu ve srovnání s rozpustným TNFR-I obsahujícím
první tři domény, a jeho deleční a/nebo substituční mutein schopný inhibovat TNF, jakož i konju-
gát tohoto zkráceného sTNFR s vodorozpustným polymerem.

2. Zkrácený sTNFR podle nároku 1, vybraný ze skupiny skládající se z sTNFR 2.6D/C105 [NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNISIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FC-COOH], sTNFR 2.6D/C106 [NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNISIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH], sTNFR-I 2.6D/N105 [NH₂-MDSVCPQGKYIHPQNNISIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FN-COOH], sTNFR-I 2.3D/d8 [NH₂-MYIHPQNNISIC-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH], sTNFR-I 2.3D/d15 [NH₂-MSIS-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH] a sTNFR-I 2.3D/d18 [NH₂-M-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-FNCSL-COOH].

3. Zkrácený sTNFR podle nároku 1 nebo 2, který je na karboxylovém konci fúzován s celou konstantní doménou nebo její částí těžkého nebo lehkého řetězce lidského imunoglobulinu.

4. Zkrácený sTNFR podle některého z nároků 1 až 3, který je neglykosylovaný.

5. Zkrácený sTNFR podle některého z nároků 1 až 3, který je glykosylovaný.

6. Zkrácený sTNFR podle nároku 1, v němž je vodorozpustným polymerem polyethylenglykol.

7. Polyvalentní vazebný protein faktoru nekrotizujícího tumory, TNFbp, obsahující nejméně jeden zkrácený sTNFR podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6.

8. TNFbp podle nároku 7 obsahující dimér zkráceného sTNFR podle nároku 3.

9. TNFbp podle nároku 7 obecného vzorce R_a-X-R_b, kde X obsahuje linker, kterým je ve vodě rozpustný polymer a R_a a R_b jsou biologicky aktivní molekuly kovalentně vázané na uvedený ve vodě rozpustný polymer, přičemž alespoň jeden z R_a a R_b je zkrácený sTNFR podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5.

10. TNFbp podle nároku 9, v němž ve vodě rozpustným polymerem je polyethylenglykol.

11. TNFbp podle nároku 10, v němž je sTNFR vybrán ze skupiny skládající se z sTNFR-I 2.6D/C105db a sTNFR-I 2.6D/C106db.

12. Polynukleotid mající sekvenci kódující zkrácený sTNFR podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 nebo sekvenci k ní komplementární.

13. Polynukleotid podle nároku 12, který má sekvenci nukleové kyseliny zvolenou ze sekvencí uvedených na obrázcích 2, 3, 4, 5, 6 nebo 7, nebo sekvenci, která je v kódujících oblastech degenerována.

14. Vektor obsahující polynukleotid podle nároku 12 nebo 13 operativně připojený k sekvenci řídící expresi.

15. Prokaryotní nebo eukaryotní hostitelská buňka obsahující polynukleotid podle nároku 12 nebo 13 nebo vektor podle nároku 14.

16. Způsob přípravy zkráceného sTNFR, **vyznačující se tím**, že se kultivuje hostitelská buňka podle nároku 15 za podmínek vhodných pro umožnění exprese zkráceného sTNFR hostitelskou buňkou a popřípadě se zkrácený sTNFR izoluje.

17. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že hostitelskou buňkou je buňka *E. coli*.

18. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že hostitelskou buňkou je buňka vaječníku čínského křečka (CHO).

19. Zkrácený sTNFR podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, který je rekombinantním expresním produktem prokaryotní nebo eukaryotní hostitelské buňky podle nároku 15.

20. Způsob přípravy farmaceutické kompozice, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se terapeuticky účinné množství zkráceného sTNFR podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 nebo nároku 19 nebo TNFbp podle kteréhokoliv z nároků 7 až 11 smíchá s jedním nebo více farmaceuticky vhodnými nosiči.

21. Farmaceutická kompozice, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje zkrácený sTNFR podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 nebo 19 ve spojení s farmaceuticky vhodným nosičem.

22. Farmaceutická kompozice, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje TNFbp podle kteréhokoliv z nároků 7 až 11 ve spojení s farmaceuticky vhodným nosičem.

23. Farmaceutická kompozice podle kteréhokoliv z nároků 21 až 22, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje směs s prodlouženým uvolňováním.

24. Farmaceutická kompozice podle kteréhokoliv z nároků 21 až 23, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že je lyofilizována.

25. Použití zkráceného sTNFR podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 nebo nároku 19 pro výrobu léčiva pro léčení pacientů postižených chorobou zprostředkovanou TNF.

26. Použití zkráceného sTNFR podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 nebo nároku 19 pro výrobu léčiva pro léčení pacientů postižených diabetes, hyperalgesií, zánětlivou chorobou střev, ischemickým poškozením, reperfučním poškozením nebo revmatickou chorobou.

27. Použití podle nároku 26, kde revmatická choroba je zvolena ze souboru sestávajícího z revmatoidní artritidy, osteoartritidy, juvenilní (revmatoidní) artritidy, ankylozující spondylitidy, dermatomyozitidy, lupénkové artritidy, sklerodermie, Sjögrenova syndromu a vaskulitidy.

28. Použití podle kteréhokoliv z nároků 25 až 27, kde léčivo je upraveno pro intravenózní, intramuskulární, intradermální, subkutánní, intraartikulární nebo infuzní podávání.

29. Použití podle kteréhokoliv z nároků 25 až 28, kde léčivo je určeno pro podávání před podáním protizánětlivého léčiva, současně s ním nebo po něm.

30. Použití podle nároku 29, kde protizánětlivé léčivo je zvoleno ze souboru sestávajícího z nesteroidních protizánětlivých léčiv, NSAID, kostikosteroidů, pomalu působících antirevmatických léčiv, SAARD, nebo léčiv modifikujících chorobu, DM.

31. Použití podle nároku 29, kde protizánětlivým léčivem je inhibitor interleukinu-1, IL-1, zvolený z antagonisty receptoru IL-1 (IL-1ra) nebo rozpustného receptoru IL-1.

32. Kit, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje zkrácený sTNFR podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 nebo nároku 19 nebo TNFbp podle kteréhokoliv z nároků 7 až 11.

33. Použití podle nároku 30, kde protizánětlivým léčivem je methotrexát.

34. Farmaceutická kompozice podle některého z nároků 21 až 24, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje protizánětlivé léčivo.

35. Farmaceutická kompozice podle nároku 34, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že protizánětlivé léčivo je zvoleno z nesteroidních protizánětlivých léčiv, NSAID, kortikosteroidů, pomalu působících antirevmatických léčiv, SAARD, nebo léčiv modifikujících chorobu, DM.

36. Farmaceutická kompozice podle nároku 35, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protizánětlivým léčivem je methotrexát.

37. Farmaceutická kompozice podle nároku 34, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protizánětlivým léčivem je inhibitor interleukinu-1, IL-1, zvolený z antagonisty receptoru IL-1, IL-1ra, nebo rozpustného receptoru IL-1.

38. Farmaceutická kompozice podle nároku 37, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že IL-1ra obsahuje sekvenci lidského IL-1ra.

39. Použití TNFbp podle kteréhokoliv z nároků 7 až 11 pro výrobu léčiva pro léčení pacientů postižených chorobou zprostředkovanou TNF.

40. Použití TNFbp podle kteréhokoliv z nároků 7 až 11 pro výrobu léčiva pro léčení pacientů postižených diabetes, hyperalgesii, zánětlivou chorobou střev, ischemickým poškozením, reperfúzním poškozením nebo revmatickou chorobou.

41. Použití podle nároku 40, kde revmatická choroba je zvolena ze souboru sestávajícího z revmatoidní artritidy, osteoartritidy, juvenilní (rvmatoidní) artritidy, ankylozující spondylitidy, dermatomyozitidy, lupénkové artritidy, sklerodermie, Sjögrenova syndromu a vaskulitidy.

42. Použití podle kteréhokoliv z nároků 39 až 41, kde léčivo se podává intravenózně, intramuskulárně, intradermálně, subkutánně, intraartikulárně nebo infuzí.

43. Použití podle kteréhokoliv z nároků 39 až 42, kde léčivo se podává před podáním protizánětlivého léčiva, současně s ním nebo po něm.

44. Použití podle nároku 43, kde protizánětlivé léčivo je zvoleno ze souboru sestávajícího z nesteroidních protizánětlivých léčiv, NSAID, kostikosteroidů, pomalu působících antirevmatických léčiv, SAARD, nebo léčiv modifikujících chorobu, DM.

45. Použití podle nároku 44, kde protizánětlivým léčivem je inhibitor interleukinu-1, IL-1, zvolený z antagonisty receptoru IL-1, IL-1Ra, nebo rozpustného receptoru IL-1.

46. Použití podle nároku 45, kde protizánětlivým léčivem je methotrexát.

24 sekvencí
13 výkresů

Seznam sekvencí

<110> Amgen Inc.

<120> Zkrácené rozpustné receptory faktorů
nekrotizujícího tumoru 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> Rekombinantní lidská

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidská

<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 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 cgg 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 tgc tga taggatcc 332
 Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Cys
 100 105

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidská

<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 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 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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidská

<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 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 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> Rekombinantní lidská

<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> Rekombinantní lidská

<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 ccg 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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidská

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidská

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(288)

<400> 13

cat atg tgc 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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<400> 15

Asn Ser Ile Cys
 1

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

<400> 16
Asn Asn Ser Ile Cys
1 5

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

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

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

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

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

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

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

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

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

<400> 21

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

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Rekombinantní lidský

<400> 22

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

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Rekombinantní lidský

<400> 23

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

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<400> 30
 Phe Asn Cys Ser
 1

<210> 31
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Rekombinantní lidský

<400> 31
 Phe Asn Cys Ser Leu
 1 5

<210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Rekombinantní lidský

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

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Rekombinantní lidský

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

<210> 34
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> Rekombinantní lidská

<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 tgc 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
 tgc 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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<400> 36

Ala Gln Met Cys

1

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Rekombinantní lidský

<400> 37

Thr Ala Gln Met Cys

1

5

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

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

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

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

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

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

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

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

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

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

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Rekombinantní lidský

<400> 43

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

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Rekombinantní lidský

<400> 44

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

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<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> Rekombinantní lidský

<400> 64
 Ala Pro Leu Arg
 1

<210> 65
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Rekombinantní lidský

<400> 65
 Ala Pro Leu Arg Lys
 1 5

<210> 66
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Rekombinantní lidský

<400> 66
 Ala Pro Leu Arg Lys Cys
 1 5

<210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Rekombinantní lidský

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

<210> 68
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Rekombinantní lidská

<400> 68
 ggtagccat atggacagcg ttgccccca a 31

<210> 69
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Rekombinantní lidská

<400> 69
 cccaagcttt tacagagagc aattgaagca ctg 33

<210> 70
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Rekombinantní lidská

<400> 70
 actcgaggat cgcggataa ataagtaacg atccgggtcca 40

<210> 71
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Rekombinantní lidská

<400> 71
 caggtcggat cctatcagca gaagcactgg aaaaggtttt c 41

<210> 72
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Rekombinantní lidská

<400> 72
 ggtagccat atggacagcg ttgccccca a 31

<210> 73
<211> 34
<212> DNA
<213> Rekombinantní lidská

<400> 73
cgcgatccc tattaattga agcactggaa aagg

34

<210> 74
<211> 30
<212> DNA
<213> Rekombinantní lidská

<400> 74
cccatatgt atatccaccc tcaaaataat

30

<210> 75
<211> 33
<212> DNA
<213> Rekombinantní lidská

<400> 75
cccaagcttt tacagagagc aattgaagca ctg

33

<210> 76
<211> 38
<212> DNA
<213> Rekombinantní lidská

<400> 76
cccatatgt cgattagctg taccaagtgc cacaaagg

38

<210> 77
<211> 33
<212> DNA
<213> Rekombinantní lidská

<400> 77
cccaagcttt tacagagagc aattgaagca ctg

33

<210> 78
<211> 30
<212> DNA
<213> Rekombinantní lidská

<400> 78
cccatatgt gtaccaagtg ccacaaagga

30

<210> 79

<211> 33

<212> DNA

<213> Rekombinantní lidská

<400> 79

cccaagcttt tacagagagc aattgaagca ctg

33

<210> 80

<211> 31

<212> DNA

<213> Rekombinantní lidská

<400> 80

ggttagccat atggacagcg tttgccccca a

31

<210> 81

<211> 33

<212> DNA

<213> Rekombinantní lidská

<400> 81

cccaagcttt taggtgcaca cggtgttctg ttt

33

5' -GATAGTGTGTGTCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAATAATTGATTGTGTACC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
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 -
-TGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACTCAGACACTGCCTC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
C R E C E S G S F T A S E N H L R H C L -
-AGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTGAGGTGGAGATCTCTTCTGCACAGTGGAC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S C S K C R K E M G Q V E I S S C T V D -
-CGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAACCTT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
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 *

Obr.1

5' -CATATGGACAGCGTTTGTCCCCCAAGGAAAATACATCCACCCTCAAAATAATTGATTGTC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
M D S V C P Q G K Y I H P Q N N S I C -
-TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCCGGGGCAGGAT-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
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 -
-TGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTGAGGTGGAGATCTCTTCTTGCACA-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
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 *

Obr.2

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 -
-ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACACCTCAGACAC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
T D C R E C E S G S F T A S E N H L R H -
-TGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTGCACA-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
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 *

Obr.3

5' - CATATGGACAGCGTTTGCCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAAATAATTCGATTGTC -
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
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 -
-ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCCACCTCAGACAC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
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 -
-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 *

Obr. 4

5' -CATATGTATATCCACCCTCAAAATAATTGATTGCTGTACCAAGTGCCACAAAGGAACC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
M Y I H P Q N N S I C C T K C H K G T -
-TACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGCAGGATACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Y L Y N D C P G P G Q D T D C R E C E S -
-GGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACTCAGACACTGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGA-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
G S F T A S E N H L R H C L S C S K C R -
-AAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTCACAGTGGACCGGGACACCGTGTGTGGC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
K E M G Q V E I S S C T V D R D T V C G -
-TGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAAAACCTTTTCCAGTGCTTCAATTGC-
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
C R K N Q Y R H Y W S E N L F Q C F N C -
-TCTCTGTAAAAGCTT-3'
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S L *

Obr.5

```

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 *

```

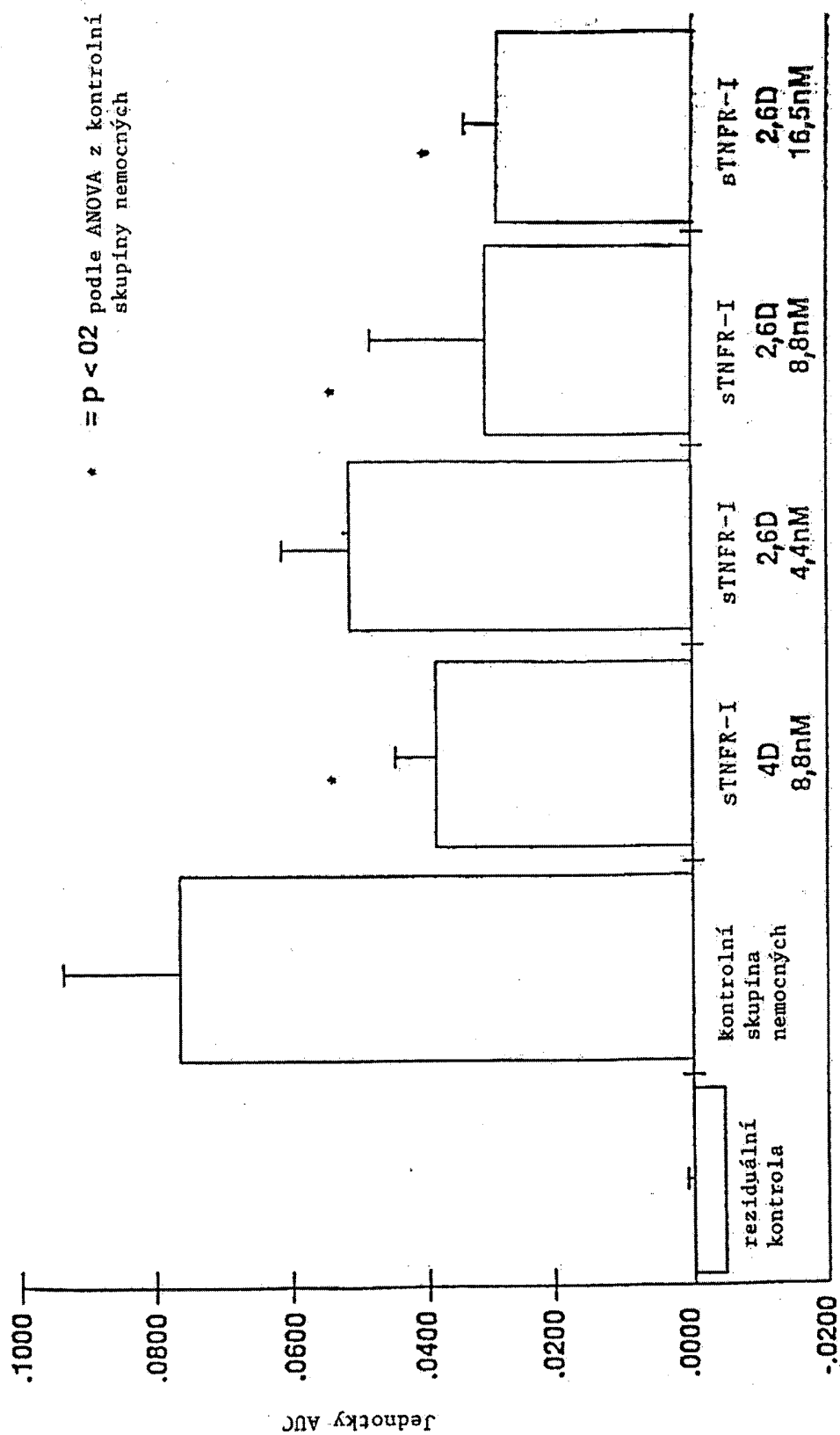
Obr. 6

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 *

Obr.7

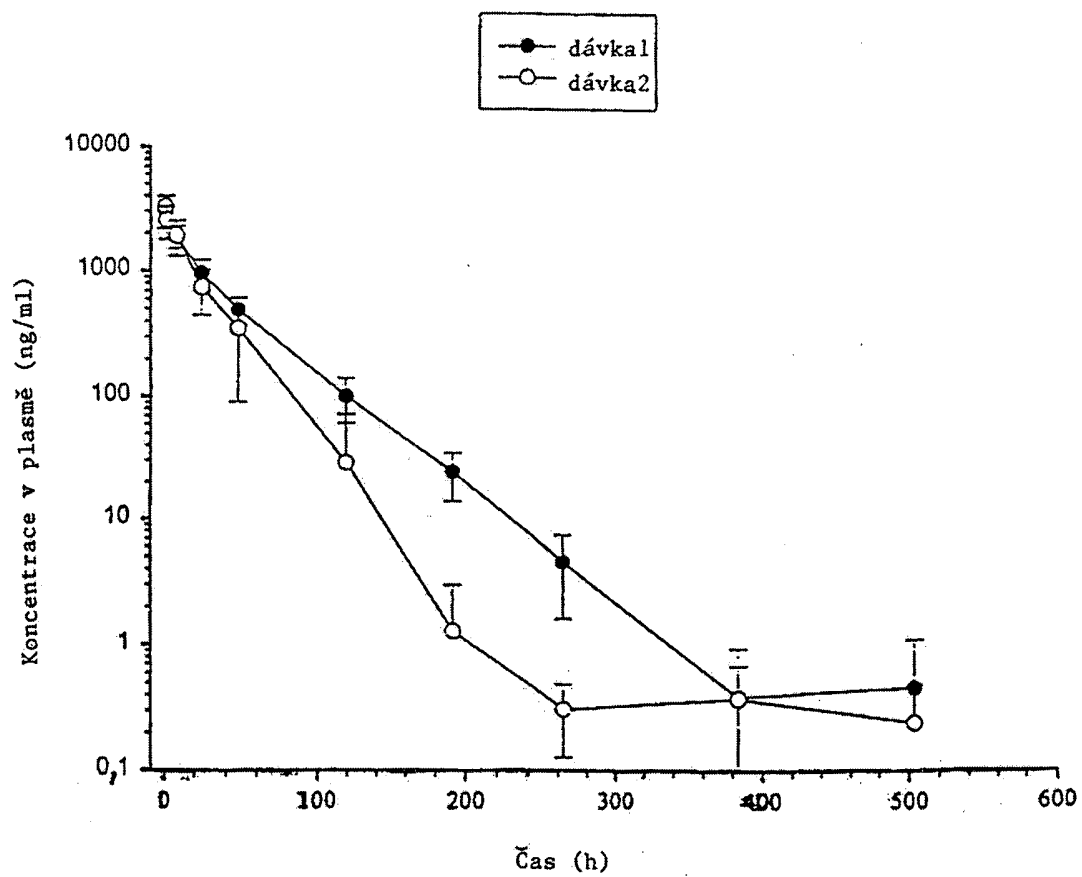
5'-TTGCCCCGCCAGGTGGCATTACACCTACGCCCCGGAGCCGGGAGCACATGCCGGCTC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 L P A Q V A F T P Y A P E P G S T C R L -
 -AGAGAATACTATGACCAGACAGCTCAGATGTGCTGCAGCAAGTGCTCGCCGGGCCAACAT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 R E Y Y D Q T A Q M C C S K C S P G Q H -
 -GCAAAAGTCTTCTGTACCAAGACCTCGGACACCGTGTGTGACTCCTGTGAGGACAGCACA-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A K V F C T K T S D T V C D S C E D S T -
 -TACACCCAGCTCTGGAAGTGGGTCCCGAGTGCTTGAGCTGTGGCTCCCGCTGTAGCTCT-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 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 -
 -CAGATCTGTAACTGGTGGCCATCCCTGGGAATGCAAGCAGGGATGCAGTCTGCACGTTC-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Q I C N V V A I P G N A S R D A V C T S -
 -ACGTCCCCCACC CGGAGTATGGCCCCAGGGGCGAGTACACTTACCCAGCCAGTGTCCACA-
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 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. 8

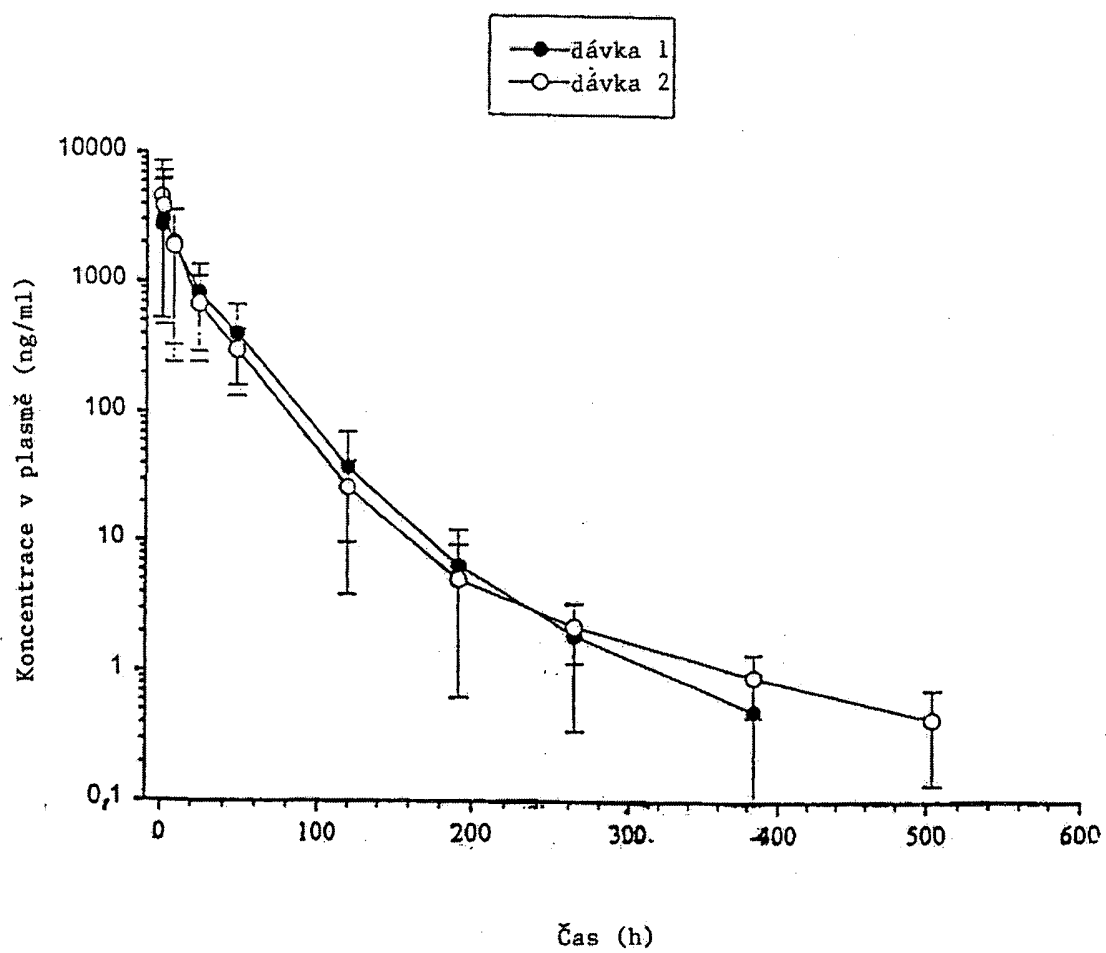


ošetření

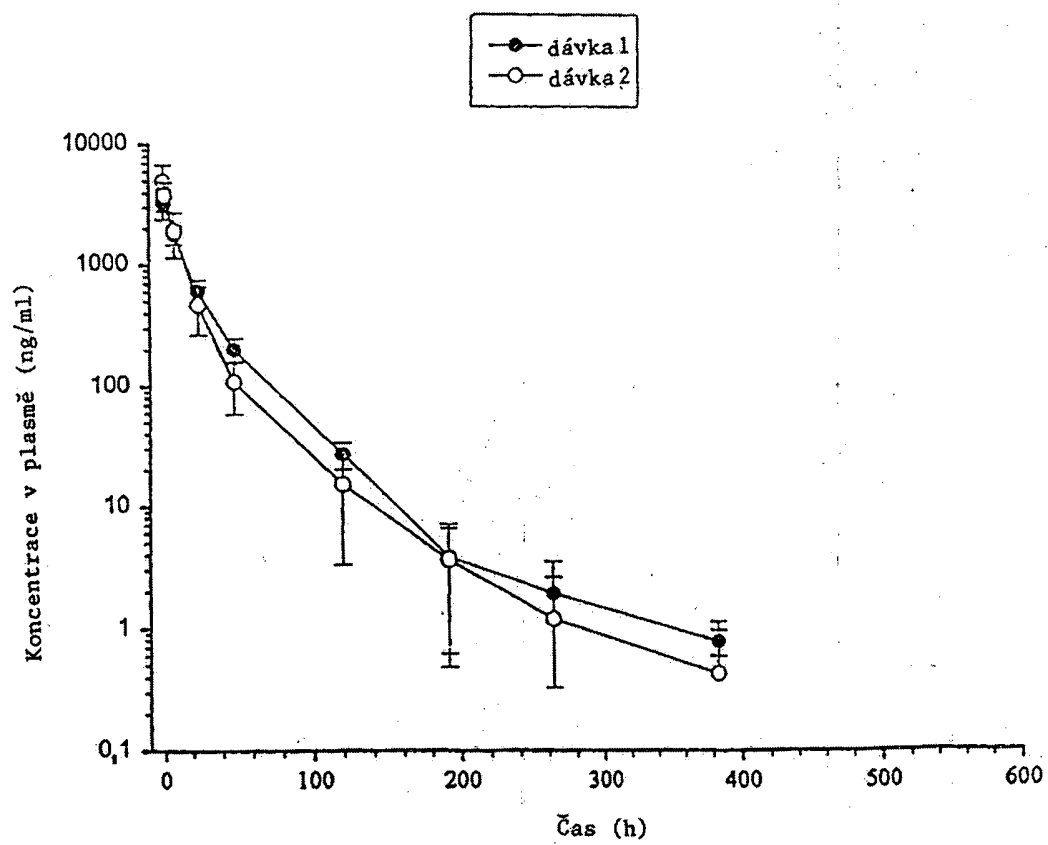
Obr. 9



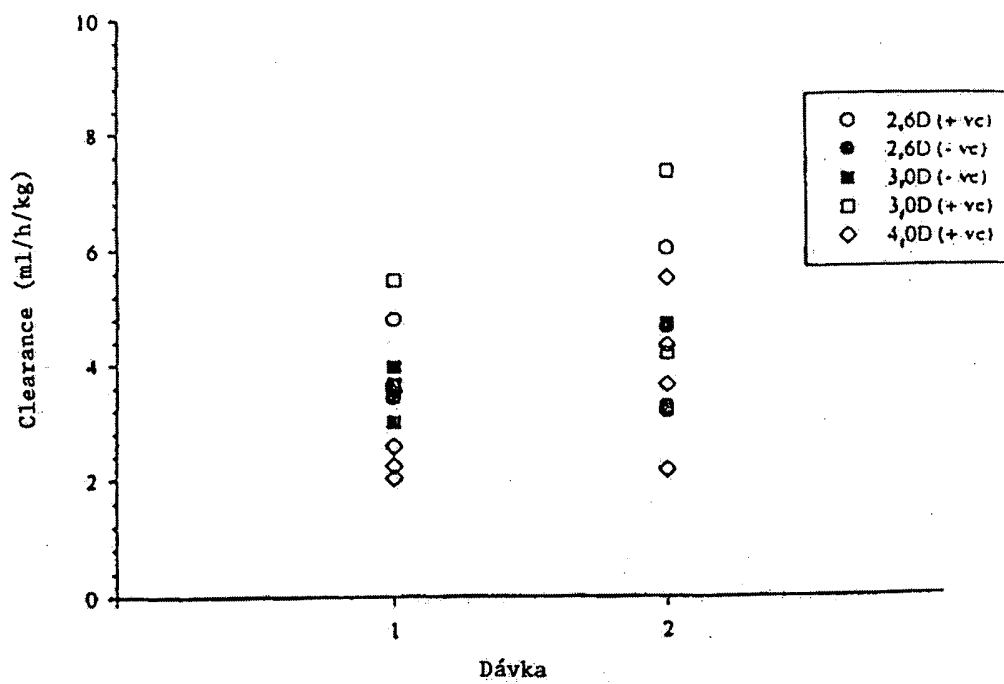
Obr.10



Obr.11



Obr. 12



Obr.13

Konec dokumentu
