PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
1999 - 4

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 12 N 15/12
C 07 K 14/715
C 07 K 1/107
A 61 K 38/17
A 61 K 47/48
A 61 K 49/00
A 61 P 19/02

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.07.1997**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.07.1996 06.12.1996 23.01.1997 07.02.1997 04.03.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1996/021443 1996/032534 1997/037737 1997/039314 1997/039792**

(33) Země priority: **US US US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/12244**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/01555**

(71) Přihlašovatel:
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:
Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1, 110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Zkrácené rozpustné receptory faktoru nekrotizujícího tumoru typu I a typu II

(57) Anotace:

Řešení se vztahuje k problematice zánětů, konkrétněji k problematice funkčně aktivních zkrácených receptorů faktoru nekrotizujícího tumory /truncated tumor necrosis factor receptors - sTNFRa/.

CZ 1999 - 4 A3

11.10.99

PV4-99

Zkrácené rozpustné receptory faktoru nekrotizujícího tumory typu-I a typu-II

Oblast techniky

Předkládaný vynález se vztahuje k problematice zánětů. Konkrétněji se předkládaný vynález vztahuje k problematice zkrácených receptorů faktoru nekrotizujícího tumory (truncated tumor necrosis factor receptors - sTNFRs).

Zkracené sTNFR mají následující vzorec: R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2, kde [Cys^{19}-Cys^{103}] představuje zbytky 19 až 103 sTNRF-I a kde dále R_1 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou amino skupinu Cys^{19} nebo aminokyselinového zbytku (či zbytků) aminokyselinového konce vybraných 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)
HPQMMSIC (SEQ ID NO:19)
IHPQNNSIC (SEQ ID NO:20)
YIHPQNNSIC (SEQ ID NO:21)
KYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:22)
GKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:23)
QGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:24)
PQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:25)
CPQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:26)
VCPQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:27)
SVCPQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:28)
DSVCPQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:29),

a kde R_2 představuje karboxyskupinu Cys^{103} nebo karboxyskupinu karboxykoncového aminokyselinového zbytku vybraného ze skupiny:

F

11.10.99

FC
FCC
FCCS (SEQ ID NO:30)
FCCSL (SEQ ID NO:31)
FCCSLC (SEQ ID NO:32)
FCCSLCL (SEQ ID NO:33)

a od nich odvozených obměn nebo derivátů, ale za předpokladu, že když R_1 představuje methionylovanou nebo nemethiolovanou aminoskupinu aminokyselinové sekvence VCPQGKYIHPQNNSIC nebo odtud odvozené N terminální zkrácení 1 až 15 zbytků, pak R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 není přidaná varianta mající vzorec R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FCCSLCL-R_3, kde R_3 reprezentuje karboxyskupinu aminokyselinových zbytků Asn^{111}-Asn^{161} nebo zkrácení na karboxylovém konci Asn^{111}-Asn^{161}.

Dosavadní stav techniky

Zánět je obranná reakce těla na poranění způsobené například mechanickým poškozením, infekcí nebo působením antigenů. Zánětlivá reakce se může projevit patologicky, když je zánět indukován nevhodnými stimuly (jako např. autoantigenem), když se projevuje výrazným způsobem nebo když stále přetrvává i po odstranění původního škodlivého činidla. Takováto zánětlivá reakce může zahrnovat produkci určitých cytokinů.

Zatímco etiologie zánětů není doposud zcela objasněna, byla v poslední době zlepšena naše znalost molekulárních aspektů zánětů. Tento výzkum vedl k identifikaci určitých cytokinů, o kterých se předpokládá, že hrají výraznou roli v procesech 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.

Již dříve byly popsány nejméně dva typy TNF, konkrétně TNF alfa (TNF α) a TNF beta (TNF β nebo lymfotoxin (lymphotoxin)). Oba jsou aktivní jako trimerická molekula (trimeric molecule) a předpokládá

se, že iniciují přenos buněčných signálů propojením receptorů (Engelmann et al. (1990), J. Biol. Chem., 265:14497-14504).

Některé důkazy naznačují, že TNF-α a TNF-β jsou hlavními cytokiny zánětu. Tyto známé TNF mají důležité fyziologické účinky na řadu rozdílných cílových buněk, které se účastní na zánětlivé odpovědi na různé podněty, například na infekci nebo poranění. Proteiny podněcují sekreci latentní kolagenázy (latent collagenase) a prostagladinu E_2 jak u fibroblastů tak u synoviálních buněk (sinovial cells) a dále působí, že buňky osteocytů stimulují resorpci kostí. Tyto proteiny zvyšují povrchové adhezívní vlastnosti endoteliálních buněk vůči neutrofilům. Také způsobují, že endoteliální buňky sekretují koagulační aktivitu a redukují jejich schopnost rozkládat (lyse) sraženiny. Navíc přesměrují aktivitu adipocytů (adipocyte) od ukládání lipidů inhibicí exprese enzymu lipoproteinová lipáza (lipoprotein lipase). TNF také podněcují u hepatocytů syntézu jedné třídy proteinů známých jako „reaktanty akutní fáze (acute phase reactants)", které působí na hypotalamus jako pyrogeny (pyrogens) (Selby et al. (1988), Lancet, 1(8583): 483; Starness, Jr. et al. (1988) J. Clin. Invest., 82: 1321; Oliff et al. (1987), Cell, 50: 555 a Wage et al. (1987), Lancet, 1(8529):355). Také preklinické výsledky na různých zvířecících modelech zánětů (včetně revmatické artritidy) naznačují, že inhibice TNF má významný dopad na vývoj nemoci a její vážnost (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). I nedávné předběžné klinické testy na lidech s revmatickou artritidou s inhibitory TNF ukázaly slibné výsledky (Rankin et al. (1995), British Journal Of Rheumatology, 3(4):4334-4342; Elliot et al. (1995), Lancet, 344:1105-1110; Tak et al. (1996), Arthritis and Rheumatism, 39:1077-1081; a Paleolog et al. (1996), Arthritis and Rheumatism, 39:1082-1091.

Proteinové inhibitory TNF jsou zmíněné ve zprávě EP 308 378 - proteiny izolované z moči pacientů s horečkou vykazují TNF inhibiční aktivitu. Efekt těchto proteinů je pravděpodobně dán kompetitivním mechanismem na úrovni receptorů. EP 308 378 popisuje proteiny dostatečně čisté pro to, aby mohly být charakterizovány svým

N-koncem. Odkaz ale nic neříká o jakékoliv DNA sekvenci nebo rekombinantně produkovaném TNF inhibitoru.

Existují ale také údaje o rekombinantně připravených inhibitorech TNF. Například EP 393 438 a EP 422 339 uvádí aminokyselinové a nukleotidové sekvence hotového (mature) rekombinantního lidského "30 kDa inhibitoru TNF" (známého také jako p55 receptor a jako sTNFR-I) a hotového rekombinantního lidského "40 kDa inhibitoru" (známého také jako p75 receptor a jako sTNFR-II); popisuje také jejich modifikované formy, jako např. fragmenty, funkční odvozeniny a varianty. EP 393 438 a EP 422 339 také uvádí metody pro isolaci genů kódujících tyto inhibitory, klonování příslušných genů ve vhodných vektorech a buňkách a expresi genů vedoucí k produkci inhibitorů. Hotový rekombinantní lidský 30 kDA inhibitor TNF a hotový rekombinantní lidský 40 kDa inhibitor TNF jsou schopné inhibovat TNF (EP 393 438, EP 422 339, PCT Publication No. WO 92/16221 a PCT Publication No. WO 95/34326.

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

Nejkonzervativnější vlastnost v této skupině buněčných povrchových receptorů je na cystein bohatá, extracelulární ligand vázající doména, 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).

EP 393 438 dále pojednává o 40 kDa TNF inhibitoru Δ51 a 40 kDa TNF inhibitoru Δ53, což jsou zkrácené verze rekombinantího 40 kDa proteinu inhibitoru TNF plné délky, kde jsou odstraněny aminokyselinové zbytky 51 nebo 53 na karboxy konci hotového proteinu. Odborník ocení, že čtvrtá doména jak 30kDa inhibitoru TNF tak 40 kDa inhibitoru není nutná pro inhibici TNF. Tento fakt byl potvrzen více skupinami. Byly připraveny varianty 30 kDa a 40kDa inhibitorů TNF s odstraněnými doménami a tyto varianty bez čtvrté domény si zachovávají plnou TNF vazebnou aktivitu; naproti tomu varianty bez první, druhé nebo třetí domény si nezachovají TNF

vazebnou aktivitu (Corcoran et al. (1994), Eur. J. Biochem., 223:831-840; Chih-Hsueh et al. (1995) The Journal of Biological Chemistry, 270(6):2874-2878 a Scallon et al. (1995), Cytokine, 7(8):759-770).

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

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

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se věnuje funkčně aktivním zkráceným formám sTNFR-I a sTNFR-II, které jsou dále zmiňované jako "zkrácený(zkrácené) sTNRF". Zkrácené sTNRF jsou modifikované formy sTNFR-I a sTNFR-II, které neobsahují čtvrtou doménu (aminokyselinová residua Thr^{127}-Asp^{161} u sTNFR-I a aminokyselinová residua Pro^{141}-Thr^{179} u sTNFR-II); část třetí domény (aminokyselinová residua Asn^{111}-Cys^{126} u sTNFR-I a Pro^{123}-Lys^{140} u sTNFR-II); a které případně neobsahují část první domény (aminokyselinová residua Asp^{1}-Cys^{19} u sTNFR-I a Leu^{1}-Cys^{32} u sTNFR-II). Tyto nové inhibitory TNF (např. TNF-α a/nebo TNF-β) mají obecné uplatnění.

Zkrácené sTNFR předkládaného vynálezu zahrnují proteiny, které odpovídají vzorci R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 a R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5. Tyto proteiny jsou zkrácené formy sTNFR-I a sTNFR-II.

Vzorcem " R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2" se rozumí jeden nebo více proteinů, kde [Cys^{19}-Cys^{103}] odpovídají sTNFR-I residuím 19 až 103 při číslování aminokyselinových zbytků podle schématu na obrázku 1 (SEQ ID NO:2); kde R_1 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou amino skupinu Cys^{19} nebo amino konec některého aminokyselinového zbytku(ů) z 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)

a kde R_2 představuje karboxyskupinu Cys^{103} nebo karboxy konce aminokyselinového residua vybraného ze skupiny:

F	
FC	
FCC	
FCCS	(SEQ ID NO:30)
FCCSL	(SEQ ID NO:31)
FCCSLC	(SEQ ID NO:32)
FCCSLCL	(SEQ ID NO:33)

a jejich variant, ale za předpokladu, že když R_1 představuje methionylovanou nebo nemethiolovanou amino skupinu aminokyselinové sekvence VCPQGKYIHPQNNSIC nebo zkrácení N-konce o 1-15 residuí, pak R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 protein není variantou R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FCCSLCL-R_3, kde R_3 představuje karboxyskupinu aminokyselinové sekvence Asn^{111}-Asn^{161} z obrázku 1 nebo jeho zkrácení na karboxy konci.

Následující molekuly můžou sloužit jako příklady zkrácených sTNFR-I předkládaného vynálezu: NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FC-COOH (také zmiňovaná jako sTNFR-I 2.6D/C105); NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (také zmiňovaná jako sTNFR-I 2.6D/C106); NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FN-COOH (také zmiňovaná jako sTNFR-I 2.6D/N105); NH_2-MYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (také zmiňovaná jako sTNFR-I 2.3D/d8); NH_2-M-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (také zmiňovaná jako sTNFR-I 2.3D/d18) a NH_2-MSIS-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (také zmiňovaná jako sTNFR-I 2.3D/d15) buď methionylované nebo nemethionylované a jejich varianty a odvozeniny.

„R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5" se rozumí jeden nebo více proteinů, kde [Cys^{32}-Cys^{115}] představují residua Cys^{32} až Cys^{115} sTNFR-I podle schématu použitém na obrázku 8 (SEQ ID NO:35) pro usnadnění porovnání a kde R_4 představuje methionylovanou nebo nemethyionylovanou aminoskupinu Cys^{32} nebo aminokyselinový zbytek (zbytky) na amino konci vybrané ze skupiny:

C
MC
QMC
AQMC (SEQ ID NO:36)
TAQMC (SEQ ID NO:37)
QTAQMC (SEQ ID NO:38)
DQTAQMC (SEQ ID NO:39)
YDQTAQMC (SEQ ID NO:40)
YYDQTAQMC (SEQ ID NO:41)
EYYDQTAQMC (SEQ ID NO:42)
REYYDQTAQMC (SEQ ID NO:43)
LREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:44)
RLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:45)
CRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:46)
TCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:47)
STCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:48)
GSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:49)
PGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:50)
EPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:51)

PEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:52)
APEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:53)
YAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:54)
PYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:55)
TPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:56)
FTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:57)
AFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:58)
VAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:59)
QVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:60)
AQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:61)
PAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:62)
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:63)

a kde R_5 představuje karboxyskupinu Cys^{115} nebo karboxyskupinu karboxy konce 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 variant, ale za předpokladu, že když R_4 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou amino skupinu aminokyselinové sekvence TCRLREYYDQTAQMC nebo zkrácení N-konce o 1 až 15 zbytků, pak R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 není variantou se vzorcem R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-APLRKCR-R_6, kde R_6 představuje karboxy skupinu aminokyselinové sekvence Pro^{123}-Thr^{179} z obrázku 8 nebo zkrácení jeho karboxy konce.

V jednom aspektu předkládaného vynálezu můžou být připraveny zkrácené sTNFR v glykosilované nebo neglykosilované formě. Zkrácené sTNFR jsou připravovány technikami rekombinantního genového inženýrství. Kromě toho se zkrácené sTNFR můžou syntetizovat chemickými technikami nebo kombinací rekombinantních a chemických technik.

V jiném aspektu předkládaného vynálezu můžou být zkrácené sTNFR modifikovány připojením zkrácených sTNFR k ve vodě rozpustnému polymeru. Například zkrácené sTNFR můžou být konjugovány k jedné nebo více molekulám polyetylen glykolu s cílem zlepšit farmakokinetickou účinnost zvětšením zdánlivé molekulové hmotnosti molekuly.

Další aspekt předkládaného vynálezu zahrnuje různé polynukleotidy kódující zkrácené sTNFR. Vhodné nukleotidové sekvence zahrnují například ty konkrétně uvedené v obrázcích a také degenerované sekvence a jejich přirozeně se vyskytující alelické varianty. Takovéto sekvence nukleových kyselin můžou být použité při expresi zkrácených sTNFR 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 sTNFR funkčně spojené (operatively link) s amplifikačními a/nebo expresi řídícími sekvencemi. Jak prokaryontní tak eukaryontní hostitelské buňky můžou být stabilně transformovány nebo transfekovány takovýmito vektory pro expresi zkrácených sTNFR. Předkládaný vynález dále zahrnuje rekombinantní produkci zkrácených sTNFR. Hostitelské buňky obsahující takovéto polynukleotidy jsou pěstovány ve vhodném živném médiu a buňkami exprimované zkrácené sTNFR jsou případně isolované z hostitelských buněk a/nebo živného média.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu zahrnuje farmaceutické směsi obsahující zkrácené sTNFR nebo jejich deriváty. Typicky můžou být zkrácené sTNFR nebo jejich deriváty připravené ve spojení s farmaceuticky vhodnými nosiči. Pro usnadnění výroby, uskladnění, manipulace, dopravy a/nebo účinnosti zkrácených sTNFR a jejich variant se může použít řada materiálů.

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

Polynukleotidy kódující zkrácené sTNFR se můžou také využít v buněčné terapii nebo v genové terapii.

Zkrácené sTNFR předkládaného vynálezu jsou vhodné zejména pro produkci proteinu ve velkých množstvích. Například sTNFR-I má deamidované místo uvnitř aminokyselinové sekvence 111 až 126 (aminokyseliny Asn^{111}-Gly^{126}). 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 sTNFR mají méně disulfidových můstků než ostatní dříve objevené 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 pak má disulfidový můstek mezi Cys^{121} a Cys^{139}, Cys^{142} a Cys^{157} a Cys^{163} a Cys^{178}. Snížený počet disulfidových můstků je důležitý proto, že vyšší počet těchto vazeb může komplikovat proces opětovného skládání proteinu. Je překvapivé, že zkrácené sTNFR mají méně míst pro antigenní epitopy než mají ostatní dříve popsané proteiny inhibitorů TNF (např. zkrácená forma sTNFR-I s prvními třemi doménami má nový epitop vzniklý odhalením určitých zbytků, viz Příklad III), což značně sníží antigenicitu a dále dochází k významnému snížení rychlosti odbourávání při opakovaném podávání. Předpokládá se, že snížená imunogenicita zkrácených sTNFR je vhodná pro léčení TNF-zprostředkovaných onemocnění, zejména pro chronické zánětlivé onemocnění.

Další aspekty a výhody vynálezu budou jasné odborníkům při následujícím popisu, kde jsou podrobně popsány obvyklé metody (practice) předkládaného vynálezu.

Detailní popis vynálezu

Předkládaný vynález je založen na neočekávaném zjištění, že jak u sTNFR-I, tak u sTNFR-II může být zmenšena jejich velikost nejenom odstraněním čtvrté domény, ale také části třetí domény a případně i částí první domény při zachování biologické aktivity a snížení antigenicity. Produkce těchto biologicky aktivních zkrácených sTNFR nebo jejich derivátů se pokládá za výhodnou minimálně z následujících důvodů. Za prvé tyto molekuly můžou mít o jedno potenciálně destabilizující deamidované místo méně. Za druhé tyto molekuly mají méně disulfidových můstků a to usnadní případnou

purifikaci a opětovné skládání. Za třetí tyto molekuly mají menší počet míst pro možné antigenní epitopy.

Zde používaný termín "zkrácený(é) sTNFR" zahrnují jeden nebo více biologicky aktivních, syntetických nebo rekombinantních, molekul se vzorcem R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 nebo R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 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 vlasnosti jako sTNFR-I a/nebo sTNFR-II, i když ne nutně všechny a ne nutně v plném rozsahu. Obecně zkrácené sTNFR a jejich odvozeniny mají schopnost inhibovat TNF. Biotesty zkrácených sTNFR jsou popsány níže v Příklady II. Výběr konkrétních TNF inhibičních vlastností závisí na požadovaném použití zkráceného sTNFR.

Zkrácené sTNFR proteiny můžou být výhodně produkovány rekombinantními technikami v bakteriálních, savčích nebo hmyzích buněčných systémech a můžou být buď v glykosilované nebo neglykosilované formě. Alternativně můžou být syntetizovány chemicky. Produkční metody preferované v současnosti jsou popsané detailně níže.

Všechny zkrácené sTNFR můžou být typicky isolovány a purifikovány do značné čistoty a zbavené tak ostatních proteinových materiálů (např. nezkrácených sTNFR). Upřednostňuje se, když je zkrácený sTNFR z asi 80% zbaven ostatních proteinů, které můžou být přítomné vzhledem k produkční technice použité při přípravě zkrácených sTNFR. Výhodné je, je-li protein ještě čistší (z více než 90%, 95% nebo z více než 98%). Je ale cenné, když může být požadovaný protein před podáváním kombinován s dalšími aktivními komponentami, chemickými sloučeninami a/nebo vhodnými farmaceutickými materiály, jak je podrobněji popsáno níže.

Zkrácené sTNFR

Zkrácené sTNFR předkládaného vynálezu můžou být jedním nebo více proteiny reprezentované následujícím vzorcem:

R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2

kde [Cys^{19}-Cys^{103}] představuje residua 19 až 103 sTNFR-I (při označení aminokyselinových zbytků použitém na obrázku 1 (SEQ ID

NO:2)), kde R_1 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu Cys^{19} nebo aminokyselinový zbytek (zbytky) na amino konci patřící do následující skupiny:

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

a kde R_2 představuje karboxy skupinu Cys^{103} nebo aminokyselinový zbytek karboxy konce vybraný z následující skupiny:

F	
FC	
FCC	
FCCS	(SEQ ID NO:30)
FCCSL	(SEQ ID NO:31)
FCCSLC	(SEQ ID NO:32)
FCCSLCL	(SEQ ID NO:33)

a jejich varianty, ale za předpokladu, že když R_1 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou amino skupinu aminokyselinové sekvence VCPQGKYIHPQNNSIC nebo zkrácení N-konce o 1-15 zbytků, pak

R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 není variantou se vzorcem R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FCCSLCL-R_3, kde R_3 představuje karboxy skupinu aminokyselinové sekvence Asn^{111}-Asn^{161} z obrázku 1 nebo zkrácení jeho karboxy konce.

V dalším případě zkrácené sTNFR předkládaného vynálezu můžou být jedním nebo více proteiny reprezentované následujícím vzorcem:

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

kde [Cys^{32}-Cys^{115}] reprezentuje sTNFR-II residua Cys^{32} až Cys^{115} podle schématu číslování aminokyselinových zbytků na obrázku 8 (SEQ ID NO:35), kde R_4 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu Cys^{32} nebo aminokyselinový zbytek (zbytky) na amino konci patřící do následující skupiny:

C	
MC	
QMC	
AQMC	(SEQ ID NO:36)
TAQMC	(SEQ ID NO:37)
QTAQMC	(SEQ ID NO:38)
DQTAQMC	(SEQ ID NO:39)
YDQTAQMC	(SEQ ID NO:40)
YYDQTAQMC	(SEQ ID NO:41)
EYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:42)
REYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:43)
LREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:44)
RLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:45)
CRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:46)
TCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:47)
STCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:48)
GSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:49)
PGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:50)
EPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:51)
PEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:52)
APEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:53)
YAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC	(SEQ ID NO:54)
PYAPEPGSTCRLRFYYDQTAQMC	(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 karboxy skupinu Cys^{115} nebo aminokyselinový zbytek karboxy konce vybraný z následující 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, ale za předpokladu, že když R_4 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou amino skupinu aminokyselinové sekvence TCRLREYYDQTAQMC nebo zkrácení N-konce o 1-15 zbytků, pak R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 není variantou se vzorcem R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-APLRKCR-R_6, kde R_6 představuje karboxyskupinu aminokyselinové sekvence Pro^{123}-Thr^{179} z obrázku 8 nebo jeho zkrácení na karboxy konci.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu zahrnuje jednu nebo více variant R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 a R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 buď metionylované nebo nemethinylované. Termín "zkrácený (zkrácené) sTNFR" tedy zahrnuje jednu nebo více přirozeně se vyskytujících alelických variant R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 a R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 a jednu nebo více variant proteinů, kde byly aminokyselinová residua v aminokyselinových sekvencích R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2a R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 odstraněna ("deleční varianty"), včleněna ("inserční varianty") nebo substituována ("substituční varianty").

Delece sekvencí aminokyselin jsou typicky v rozsahu asi od 20 aminokyselinových zbytků; zpravidla se ale jedná o asi 1-10 zbytků a nejčastěji o 1-5 zbytků, takže nedojde k narušení konformace proteinu. Myslí se delece na N-konci, C-konci a vnitřních

intrasekvencích. Počet celkových delecí a/nebo následných delecí bude zvolen tak, aby se zachovala terciární struktura proteinu v ovlivněné doméně, např. cysteinová křížová vazba.

Delece uvnitř aminokyselinové sekvence R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 a uvnitř aminokyselinové sekvence R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 se můžou 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-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 a uvnitř aminokyselinové sekvence R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 se můžou 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 NGF/TNF receptorové rodiny 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 R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2jsou R_1-[Cys^{19}(ΔThr^{20})-Cys^{103}]-R_2 a R_1-[Cys^{19}-(ΔCys^{19}-Lys^{21})Cys^{103}]-R_2, kde R_1 a R_2 odpovídají výše uvedené definici. Příkladem tří delečních variant R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 jsou R_4-[Cys^{32}-(ΔCys^{115})Cys^{115}]-R_5, R_1-[Cys^{19}-(ΔCys^{115}-Lys^{115})Cys^{103}]-R_2 a R_4-[Cys^{32}-(ΔCys^{115}-Arg^{113})Cys^{115}]-R_5, kde R_1 a R_2 odpovídají výše uvedené definici.

Přidání sekvencí aminokyselin může zahrnovat fůze na amino a/nebo karboxy konci v rozsahu délek od jednoho residua do jednoho sta nebo více residuí a také interní intrasekvenční inzerce jednoho nebo více aminokyselinových residuí. Interní adice se pohybují 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 aminokyselinové zbytky.

Adiční varianty amino konce zahrnují přidání methioninu (například jako výsledek přímé exprese proteinu v bakteriálních rekombinantních buněčných kulturách) nebo další aminokyselinová residua nebo sekvence. Další příklad inzerce na amino konci zahrnuje fůzi signální sekvence, někdy s ostatními pre-pro sekvencemi, k usnadnění sekrece proteinu z rekombinantních hostitelských buněk. U prokaryontních hostitelských buněk, které nerozeznávají a nezpracovnávají původní signální sekvence sTNFR-I a sTNFR-II, můžou být signální sekvence nahrazeny prokaryotickými signálními

sekvencemi, například ze skupiny alkalických fosfatáz, peniciláz nebo počáteční sekvence teplotně odolného enterotoxinu II. U kvasnic můžou být signální sekvence vybrány například ze skupiny kvasničních invertáz, alfa faktoru nebo počáteční sekvence kyselé fosfatázy. U savčích buněk je exprese původních signálních sekvencí sTNFR-I a sTNFR-II (EP 393 438 a EP 422 339) dostatečná, i když i jiné savčí signální sekvence můžou být vhodné (např. sekvence odvozené od ostatních členů rodiny NGF/TNF).

Adiční varianty na karboxy konci nezahrnují přidání jednoho nebo více aminokyselinových residuí, které by ovlivňovaly rekonstituci sTNFR-I nebo sTNFR-II. Je žádoucí, když adiční varianty na karboxy konci nezahrnují přidání jednoho nebo více residuí karboxy kyseliny, které by ovlivnily rekonstituci třetí nebo čtvrté domény sTNFR-I nebo sTNFR-II. Příkladem adiční varianty na karboxy konci můžou být chimerické proteiny zahrnující fůzi R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 nebo R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 s celou nebo částí konstantní domény těžkého nebo lehkého řetězce lidského imunoglobulinu. Takovéto chimérické proteiny se preferují, když jejich imunoglobulinová část zahrnuje všechny domény kromě první domény konstantní oblasti těžkého řetězce lidského imunoglobulinu, jako jsou IgG, IgA, IgM nebo IgE (zejména IgG, např. IgG1 nebo IgG3). Odborník ocení, že (jestliže TNF vázající část stále váže TNF a imunoglobulinová část vykazuje jednu nebo více svých charakteristických vlastností) se může jakákoliv aminokyselina každé imunoglobulinové části odstranit nebo nahradit jednou nebo více aminokyselinami, nebo že se může přidat jedna nebo více aminokyselin.

Další skupinou jsou varianty se substitucí aminokyseliny. Všechny tyto varianty mají nejméně jeden aminokyselinový zbytek v R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 nebo R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 odstraněný a nahrazený odlišnými zbytky na jejich místech. Substituční varianty zahrnují alelické varianty, které jsou charakterizovány změnami v přirozeně se vyskytujících nukleotidových sekvencích v druhové populaci, které můžou nebo nemusí mít za následek změny aminokyselin. Odborníci můžou použít jakoukoliv známou informaci o vazebném nebo aktivním místě polypeptidu při výběru možných míst pro mutace.

Jedna metoda pro identifikaci aminokyselinových zbytků nebo oblastí pro mutagenezi proteinu se nazývá „mutageneze alaninovým

vyhledáním" (alanine scanning mutagenesis) (Cunningham a Wells (1989), Science, 244:1081-1085, jehož popis je zde zahrnut odkazem). V této metodě je identifikován aminokyselinový zbytek nebo skupina cílových zbytků proteinu (např. nabité zbytky jako Arg, Asp, His, Lys a Glu) a nahrazen neutrální nebo negativně 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 včlenění změněné sekvence nukleových kyselin. Pro další optimalizaci vlastností mutace v daném místě se může provést alaninové vyhledávání nebo náhodná mutageneze. U výsledných variantních polypeptidů je zjišťována optimální kombinace žádoucí aktivity a stupně aktivity.

Zájmová místa pro substituční mutagenesi zahrnují místa, kde jsou aminokyseliny vyskytující se v R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 nebo R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 významně odlišné (co se týče podstatné části postraního řetězce, náboje a/nebo hydrofobicity) od sTNFR podobným proteinům jako jsou např. sTNFR různých jiných druhů nebo jiných členů receptorové rodiny NGF/TNF.

Další zájmová místa zahrnují ty, ve kterých jsou určitá residua podobná nebo identická s odpovídajícími místy u sTNFR-I podobným proteinům a sTNFR-II podobným proteinům. Takováto 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 třírozměrnou strukturu předvídatelný. Ale na základě zde uvedených výsledků odborník ocení, že první principy vývoje strategie pro tvorbu variantních proteinů se mohly částečně zakládat na dříve vysvětlených údajích pro sTNFR-I a sTNFR-II plné délky. Následující informace byly tedy objasněny o 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 struktury domény 1, 2 a 3 byla identifikována residua Tyr^9, Thr^{39}, His^{55} domény 1, residua Phe^{49}, Ser^{63}, Asp^{82} domény 2 a residua Tyr^{92} a Ser^{107} domény 3. Residua Pro^{12} a His^{55} byla identifikována jako potenciálně vzájemně se ovlivňující se Ser^{86}-Tyr^{87} na subjednotce C TNFα. Residua Glu^{45}-Phe^{49} byla

identifikována jako podstata smyčky, která se potenciálně vzájemně ovlivňuje s residui Leu^{29}-Arg^{32} podjednotky A TNFα. Residua Gly^{49} byla identifikována jako vzájemně se ovlivňující s Asn^{19}-Pro^{20} na podjednotce A TNFα. Residua His^{58}-Leu^{60} byla identifikována jako důležitý prvek v konformaci prodlouženého pramene a interakce postraního řetězce s residui Arg^{31}-Ala^{33} na podjednotce A TNFα byla potenciálně identifikována s residuem His^{58} sTNFR-I, které se specificky vzájemně ovlivňuje s residuem Arg^{31}. Residua Lys^{64}-Arg^{66} byla identifikována jako důležitý prvek v konformaci prodlouženého pramene a bylo zjištěno, že vykazují interakce postraního řetězce a hlavního řetězce s residui Ala^{145}-Glu^{146} a residuem Glu^{46} na podjednotce A TNFα. U residua Met^{69} byla identifikována možná interakce s residuem Tyr^{115} na podjednotce A TNFα. Zjistilo se, že residua His^{94}-Phe^{101} tvoří smyčku, která se vzájemně ovlivňuje s residui Thr^{72}-Leu^{75} a Asn^{137} podjednotky C TNFα a s residuem Trp^{96} sTNFR-I, specificky se ovlivňujícím s residui Ser^{71}-Thr^{72} na podjednotce C TNFα, Leu^{100} sTNFR-I (které je v těsné blízkosti s residuem Asn^{137} na podjednotce C TNFα) a residuem Gln^{102} sTNFR-I (které se vzájemně specificky ovlivňuje s residuem Pro^{113} na podjednotce A TNFα) (Residues His^{94}-Phe^{101} have been identified as forming a loop which interacts with residues Thr^{72}-Leu^{75} and Asn^{137} of subunit C of TNFα, with residue $Trp^{9}6$ of sTNFR-I specifically interacting with residues Ser^{71}-Thr^{72} on subunit C of TNFα, Leu^{100} of sTNFR-I being in close proximity with residue Asn^{137} on subunit C of TNFα and residue Gln^{102} of sTNFR-I specifically interacting with residue Pro^{113} on subunit A of TNFα). Odborník pak ocení, že nejprve by měly být tato místa modifikovány substitucí relativně konzervativním způsobem.

Takovéto konzervativní substituce jsou uvedeny v tabulce 1 pod záhlavím „Preferované substituce (Preferred Substitutions). Jestliže takovéto substituce vyvolají změny biologické aktivity, pak se můžou použít výraznější substituční změny (Vzorové substituce, Exemplary substitutions) a/nebo se můžou provést další adice/delece a pak analýza výsledných produktů.

Tabulka 1: Substituce aminokyselin

Původní zbytek	Preferovaná substituce	Vzorová 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 (norleucine)
Leu (L)	Ile	norleucin (norleucine); Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Leu	Leu; Val; Ile; Ala
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Phe	Trp; .Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucin (norleucine)

Při takovýchto změnách obdobné povahy se může brát v úvahu hydropatický index (hydropathic index) aminokyselin. Každé aminokyselině byl přiřazen hydropatický index na základě na základě jejich hydrofobicity a charakteristikách náboje. Hodnoty jsou následující: isoleucin (+4,5); valin (+4,2); leucin (+3,8); fenylalanin (+2,8); cystein/cystin (+2,5); metionin (+1,9); alanin (+1,8); glycin (-0,4); treonin (-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); lyzin -3,9) a arginin (-4,5).

Důležitost hydropatického indexu aminokyselin při porovnávání interaktivních biologických funkcí na proteiny je odborníkům zpravidla jasná (Kyte a Doolittle (1982), J. Mol. Biol., 157:105-131, jehož popis je zde zahrnut odkazem). Je známé, že určité aminokyseliny můžou být substituovány za jiné s podobným hydropatickým indexem nebo stavem a stále se zachová podobná biologická aktivita. Dělají-li se změny založené na hydropatickém idexu, preferují se substituce aminokyselin, jejichž hydropatický index je v rozsahu ±2, nebo lépe v rozsahu ±1, nebo nejlépe ±0,5.

Odborníkům je také známé, že substituce podobných aminokyselin může být efektivně provedena na základě hydrofilicity zejména tehdy, když biologicky funkční ekvivalentní protein nebo peptid takto vytvořený se bude používat pro imunologické účely, jako v tomto případě.

U.S Patent 4 554 101 (jehož popis je zde zahrnut odkazem) říká, 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 uvedeno v US Patent 4 554 101, jednotlivým aminokyselinovým zbytkům se přiřadily následující hodnoty hydrofilicity: arginine (+3,0); lysin (+3,0); aspartát (+3,0±1); glutamát (+3,0 ±1); serin (+0,3); asparagin (+0,2); glutamine (+0,2); glycin (0); treonin (-0,4); prolin (-0,5 ±1); alanin (-0,5); histidin (-0,5); cystein (-1,0); methionin (-1,3); valin (-1,5); leucin (-1,8); isoleucin (-1,8); tyrozin (-2,3); fenylalanin (-2,5) a tryptofan (-3,4).

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

U.S. Patent 4 554 101 také popisuje identifikaci a přípravu epitopů z primární aminokyselinové sekvence na základě hydrofilicity. Metodou uvedenou v U.S. Patent 4 554 101 by byl odborník schopen identifikovat epitopy uvnitř sevence aminokyselin

jako jsou zde popsané sTNFR sekvence. Tyto oblasti jsou uvedené 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 dispizici 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 (Brutlag et al. (1990), CABS, 6:237-245 a Weinberger 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 sekvencí aminokyselin (a odpovídající modifikace kodující sekvence nukleových kyselin) R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 nebo R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 dají proteiny mající podobné funkce a chemické charakteristiky, jako modifikovaný protein.

Naproti tomu se může dosáhnout významné modifikace ve funkci a/nebo chemické charakteristice R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 a R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 výběrem substitucí, které se výrazně liší svým vlivem na zachování: (a) struktury polypeptidové kostry v oblasti substituce (například šroubovicová konformace nebo konformace listu) (b) náboje nebo hydrofobicity proteinu v cílovém místě (c) převážné části postranního řetězce. Přirozeně se vyskytující residua jsou rozdělena do skupin založených na vlastnostech postranního řetězce:

1) hydrofobní: norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
2) neutrální hydrofilní: Cys, Ser, Thr;
3) kyselé: Asp, Glu;
4) zásadité: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
5) residua, která ovlivňují orientaci řetězce: Gly, Pro a
6) aromatické: Trp, Tyr, Phe.

Nekonzervativní substituce mohou zahrnovat výměnu člena jedné z těchto skupin za jiného. Takováto záměna může být vnesena do oblastí R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 a R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5, které jsou homologní nebo nehomologní s jinými členy rodiny receptorů NGF/TNF.

Specifické mutace sekvencí R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 a R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 můžou zahrnovat substituci nepůvodních (non-native) aminokyselin na N-konci, C-konci nebo na jakémkoliv místě proteinu, které je modifikováno přidáním N-vázaného nebo O-vázaného karbohydrátu. Takovéto modifikace můžou 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 původně se vyskytující Asn^{105} sTNFR-I je zaměněn za Cys k usnadnění připojení molekuly polyethylen glykolu (Příklad I).

Sekvence R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 nebo R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 může být dále modifikována s cílem přidat glykosilační místo nebo odstranit N-vázané nebo O-vázané glykosilační místo. Asparaginem připojené glykosilační rozpoznávací místo zahrnuje tripeptidovou sekvenci, která je specificky rozpoznána příslušným buněčným glykosilačním enzymem. Tyto tripeptidové sekvence jsou Asn-Xaa-Thr nebo Asn-Xaa-Ser, kde Xaa může být jakákoliv aminokyselina kromě Pro. Dokázaná nebo předpovězená asparaginová rezidua sTNFR-I existují na pozicích 14, 105 a 111. Dokázaná nebo předpovězená asparaginová rezidua sTNFR-II existují na pozicích 149 a 171. Pro modifikaci nebo přidání N-vázanných nebo O- vázaných glykosilačních míst se může provést náhrada nebo odstranění aminokyseliny; výsledkem je protein s pozměněnou glykosilací.

Ve specifickém případě jsou varianty značně homologní k aminokyselině R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 nebo R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5. Termín „značně homologní", jak je zde použit, znamená stupeň homologie, který je přednostně přes 70%, nebo lépe přes 80%, přes 90% a nejlépe dokonce přes 95%. Procento homologie zde popsané se vypočítá jako procento aminokyselinových zbytků nalezených v menší ze dvou sekvencí, které se shodují (which align) s identickými aminokyselinovými residui v porovnávané sekvenci, přičemž se mohou uvést čtyři mezery (gaps) v délce 100 aminokyselin pro usnadnění tohoto porovnání, jak je uvedeno v Dayhoff (1972), in Atlas of

Protein Sequences and Structure, 5:124, National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C., jehož popis je zde zahrnut odkazem. Jako podstatně homologní jsou také zahrnuté zkrácené sTNFR, které mohou být izolovány díky křížové reakci protilátek se sekvencí aminokyselin v SEQ IF NO:2 a SEQ ID NO:35, nebo jejichž geny můžou být izolované pomocí hybridizace s DNA SEQ ID NO:1a nebo SEQ ID NO:34 nebo jejich segmenty.

Mezi příklady sTNFR předkládaného vynálezu patří následující molekuly: NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FC-COOH (také je uváděná jako sTNFR-I 2.6D/C105); NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (také je uváděná jako sTNFR-I 2.6D/C106); NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FN-COOH (také je uváděná jako sTNFR-I 2.6D/N105); NH_2-MYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (také je uváděná jako sTNFR-I 2.3D/d8); NH_2-M-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (také je uváděná jako sTNFR-I 2.3D/d18); a NH_2-MSIS-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (také je uváděná jako sTNFR-I 2.3D/d15) buď jako methionylované nebo nemethionylované a jejich varianty a odvozeniny.

Produkce variant zkrácených sTNFR je popsána podrobněji níže. Takovéto varianty se můžou připravit včleněním odpovídajících nukleotidových změn do DNA kódující zkrácené sTNFR nebo *in vitro* chemickou syntézou požadovaných zkrácených sTNFR. Odborníci ocení, že se může provést mnoho kombinací delecí, inzercí a substitucí za předpokladu, že jsou výsledné sTNFR biologicky aktivní.

Techniky mutageneze pro výměnu, včlenění nebo odstranění jednoho nebo více vybraných aminokyselinových residuí jsou odborníkům známé (např. U.S. Patent No. 4 518 584, jehož popis 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 záležet na modifikované biochemické charakteristice (či modifikovaných biochemických charakteristikách). Každé mutační místo může být modifikováno individuálně nebo v sérii, např. (1) nejprve substitucí vybraných konzervativních aminokyselin a poté s radikálnějším výběrem v závislosti na dosaženém výsledku (2)

odstraněním cílového aminokyselinového residua (3) včleněním aminokyselinových residuí do sousedství vybraného místa.

Chemicky modifikované deriváty nebo zkrácené sTNFR může připravit odborník zde popsaným postupem. Konjugáty se můžou připravit použitím glykosilovaných, neglykosilovaných nebo deglykosilovaných zkrácených sTNFR. Typicky se použijí neglykosilované zkrácené sTNFR. Mezi vhodné chemické složky (moieties) pro úpravu (derivatization) zkrácených sTNFR patří ve vodě rozpustné polymery.

Ve vodě rozpustné polymery jsou vhodné, protože protein, ke kterému jsou připojené, 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 schopný vybrat příslušný polymer v závislosti na úvaze, zdali konjugát polymer/protein bude použitý terapeuticky a jestliže ano, na žádoucí dávce, cirkulační době a odolnosti proteolýze.

Mezi vhodné, klinicky akceptovatelné, ve vodě rozpustné polymery patří polyetylenglykol (PEG), polyetylenglykol propionaldehyd, kopolymery etylen glykol/propylen glykol, monometoxy-polyetylen glykol, karboxymetyl celulóza, dextran, polyvinyl alkohol (PVA), polyvinyl pyrrolidon, poly-1, 3-dioxalan, poly-1, 3, 6-trioxan, kopolymer etylen/malein anhydridu, poly (β-amino kyselina) (buď homopolymer nebo náhodné kopolymery), poly (n-vinyl pyrolidon) polyetylen glykol, homopolymery propylen glykolu (PPG) a další polyalkylenové oxidy, kopolymery polypropylen oxidu/etylen oxidu, polyoxyetylované polyoly (POG) (např. glycerol), polyoxyetylovaný sorbitol nebo polyoxyetylovaná glukóza, kolonové kyseliny (colonic acids) nebo jiné karbohydrátové polymery, Ficoll nebo dextran a jejich směsi.

Polyetylenglykolem se zde rozumí jakákoliv z forem, která byla použita pro derivatizaci jiných proteinů, jako např. mono-(C1-C10) alkoxy- nebo aryloxy-polyetylen glykol. Polyetylen glykol propionaldehyd může být výhodný při výrobě vzhledem ke své stabilitě ve vodě.

Každý z ve vodě rozpustných polymerů může mít libovolnou molekulovou hmotnost a může být větvený nebo nevětvený. Typická průměrná molekulová hmotnost ve vodě rozpustných polymerů je asi

mezi 2 kDa a 100 kDa (termín „asi" naznačuje, že v preparátech ve vodě rozpustných proteinů mají některé molekuly váhu větší a některé menší, než je uvedená molekulová hmotnost). Preferovaná průměrná molekulová hmotnost ve vodě rozpustných polymerů se pohybuje mezi asi 5 kDa a 50 kDa, lépe mezi asi 12 kDa a asi 40 kDa a nejlépe mezi asi 20 kDa a asi 35 kDa.

Obecně, čím je vyšší molekulová hmotnost nebo čím více je větvený, tím větší je poměr polymer:protein. V závislosti na požadovaném terapeutickém profilu (např. na délce trvání požadovaného uvolňování; na účinku -existuje-li- na biologickou aktivitu; na snadnost manipulace; na stupeň nebo absenci antigenicity a jiných známých účincích ve vodě rozpustných polymerů na terapeutické proteiny) se můžou použít i jiné velikosti.

Každý z ve vodě rozpustných polymerů by měl být připojen k proteinu se zřetelem na vliv na funkční nebo antigenní oblasti proteinu. Obecně se může chemické modifikování provádět za jakýchkoliv vhodných podmínek použitých pro reakci proteinu s aktivovanou molekulou polymeru. Mezi aktivovatelné skupiny (activating groups), které můžou být použité pro připojení ve vodě rozpustného proteinu k jednomu nebo více proteinům, patří následující: sulfonová, maleimidová, sulfhydrylová, thiolová, triflátová, tresylátová, azidirinová, oxiranová a 5-pyridylová.

Všechny ve vodě rozpustné proteiny jsou obecně připojeny k proteinu na α- nebo ε- amino skupině aminokyseliny nebo k reaktivní thiolové skupině. Ve vodě rozpustná skupina může být připojená k jakékoliv reaktivní skupině proteinu, která je dostatečně reaktivní pro připojení k ve vodě rozpustné skupině za vhodných reakčních podmínek. Aminokyselinové zbytky s volnou aminoskupinou můžou zahrnovat lysinová residua a residua aminokyselin na N-konci. Ty s volnou karboxyskupinou můžou zahrnovat residua kyseliny asparagové, residua kyseliny glutamové a residua aminokyselin na C-konci. Ty s reaktivní thiolovou skupinou zahrnují cysteinová residua.

Metody pro přípravu proteinů konjugovaných s ve vodě rozpustnými polymery budou obecně zahrnovat tyto kroky: (a) reakci proteinu s ve vodě rozpustným polymerem za podmínek, kdy se protein připojí k jednomu nebo více ve vodě rozpustným polymerům (b) získání

reakčního produktu. Reakční podmínky pro každou konjugaci můžou být vybrány libovolně ze známých nebo z těch které budou vyvinuty ale tak, aby se vyloučilo nebo omezilo působení reakčních podmínek (jako je teplota, rozpouštědla nebo hodnota pH), které by mohly inaktivovat modifikovaný protein. Obecně se optimální reakční podmínky pro reakce určí případ od případu v závislosti na známých parametrech a požadovaném výsledku. Například čím větší je poměr konjugátu ve vodě rozpustný polymer:protein, tím větší je procento konjugovaného produktu. Optimální poměr (ve smyslu účinnosti reakce, takže nedochází k přebytku nezreagovaného proteinu nebo polymeru) může být dán takovými faktory, jako je stupeň derivatizace (např. mono-, di-, tri- atd.), molekulovou hmotností vybraného polymeru, tím, je-li polymer větvený nebo nevětvený a použitými reakčními podmínkami. Poměr ve vodě rozpustného proteinu (např. PEGu) k proteinu bude obecně v rozsahu 1:1 až 1:100. Z každé směsi se může získat standardními izolačními technikami (ke kterým patří např. dialýza, vysolování, ultrafiltrace, iontová chromatografie, gelová filtrace a elektroforéza) jeden nebo více purifikovaných konjugátů.

Může se vyskytnout požadavek na protein chemicky modifikovaný na N-konci. Ve vodě rozpustný polymer může být vybrán na základě molekulové hmotnosti, větvení atd., podílu ve vodě rozpustného polymeru k proteinovým (nebo peptidovým) molekulám v reakční směsi, typu prováděné reakce a metodě získání vybraného na N-koncově modifikovaného proteinu. Metodou získání N-koncově chemicky modifikovaného proteinového preparátu (tj. separace této aktivní složky od ostatních monoderivatizovaných složek, je-li to nezbytné) může být purifikace N-koncově chemicky modifikovaného proteinového materiálu z populace chemicky modifikovaných proteinových molekul. Selektivní chemická modifikace na N-konci se může provést redukční alkylací, která využije rozdílnou reaktivitu odlišných typů primárních aminoskupin (lysin oproti N-konci) dostupných v určitém proteinu pro derivatizaci. Za vhodných reakčních podmínek se dosáhne značně selektivní derivatizace proteinu na N-konci s polymerem obsahujícím karbonylovou skupinu. Například je možné selektivně připojit ve vodě rozpustný polymer k N-konci proteinu reakcí při pH, které umožní využít výhodu rozdílného pK mezi ε-amino skupinou lysinových residuí a α-amino skupinou residua na N-konci proteinu.

Takovouto selektivní derivatizací se řídí připojení ve vodě rozpustného polymeru k proteinu: konjugace s polymerem se uskuteční převážně na N-konci proteinu a nedochází k významné modifikaci ostatních reakčních skupin jako třeba amino skupin na lysinovém postranním řetězci. Při redukční alkylaci může být ve vodě rozpustný polymer jedním z výše popsaných typů a měl by mít jeden reakční aldehyd pro spojení s proteinem. Může se použít polyethylen glykol propionaldehyd obsahující jeden reaktivní aldehyd.

Předkládaný vynález se zabývá konkrétně chemicky upravenými proteiny s mono- nebo poly- (např. 2-4) PEG složkami. PEGylace (pegylation) se může provést jakoukoliv alkylační reakcí s PEGem známou odborníkům. Metody pro přípravu PEGylovaných proteinových produktů zpravidla zahrnují tyto kroky: (a) reakci proteinového produktu s polyetylenglykolem (například s reaktivním esterem nebo aldehydovým derivátem PEGu) za podmínek, kdy dojde k připojení proteinu k jedné nebo více PEG skupinám a (b) získání reakčního produktu (reakčních produktů). Obecně optimální reakční podmínky pro reakci se určí případ od případu na základě známých parametrů a požadovaném výsledku.

Odborníkům je známá řada metod pro připojení. Příkladem je např. EP 0 401 384, jehož 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, Frien Barnet Lane, London N20 OLD, UK); 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 polyethylen glykolu. Čili proteinové produkty podle předkládaného vynálezu zahrnují také PEGylované proteiny (pegylated proteins), kde je (jsou) PEG skupina (skupiny) připojené přes acylovou nebo alkylovou skupinu. Takovéto produkty můžou být mono- nebo poly- PEGylované (např. obsahující 2-6 nebo lépe 2-5 PEG skupin). PEG skupiny jsou obecně připojené k proteinu na α- nebo ε-amino skupinách aminokyselin, ale je také nutné vzít do úvahy, že PEG skupiny můžou být připojeny k jakékoliv aminoskupině připojené k proteinu, která je dostatečně reaktivní na to, aby se mohla připojit k PEG skupině za vhodných reakčních podmínek.

11.10.99

PEGylace obecně zahrnuje reakci aktivního esterového derivátu polyetylenglykolu (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 k N-hydroxysukcinimidu (NHS). „Acylací" se zde myslí následující typy vazeb (bez omezení pouze na ně) mezi terapeutickým proteinem a ve vodě rozpustným polymerem (např. PEGem): amidová, karbamátová, uretanová a podobné (viz Chamov (1994), Bioconjugate Chem., 5(2):133-140; jehož popis je zde zahrnut odkazem). Reakční podmínky se můžou vybrat ze známých odborníkům v s PEGylaci nebo případně nově vyvinuté, ale měly by se vyloučit takové podmínky, které by vedly k inaktivaci modifikovaných proteinů (např. teplota, rozpouštědlo, pH).

PEGylace acylací vede zpravidla k proteinům s více PEG molekulami (poly-pegylated protein). Preferuje se, když je spojovací vazba amid. Také se preferuje, když je výsledný produkt z větší části (např. z více než 95%) mono-, di- nebo tri- PEGylován. Může ale také dojít k tvorbě některých produktů s vyšším stupněm PEGylace v množstvích závislých na použitých specifických reakčních podmínkách. Je-li zapotřebí, můžou se ze směsi oddělit čistší PEGylované komponenty (zejména nezreagovaných druhů) standardními purifikačními postupy, mezi které patří například: dialýza, vysolování, ultrafiltrace, iontová výměnná chromatografie, gelová filtrace a elektroforéza.

PEGylace alkylací obecně zahrnuje reakci koncového aldehydového derivátu PEGu s proteinem za přítomnosti redukčního činidla. Pro reakci redukční alkylace by vybraný protein (proteiny) měl mít jednu reaktivní aldehydovou skupinu. Příkladem reaktivního PEG aldehydu je polyetylen glykol propionaldehyd, který je ve vodě stabilní, nebo jeho mono C1-C10 alkoxy nebo aryloxy deriváty (viz U.S Patent 5 252 714, jehož popis je zde zahrnut odkazem).

Výsledkem PEGylace alkylací může také být protein s více PEG molekulami (poly-pegylated protein). Navíc je možné ovlivnit reakční podmínky s cílem podstatně upřednostnit PEGylaci jenom α-aminoskupiny na N-konci proteinu (tj. proteinu s jednou PEG molekulou). V obou případech (monoPEGylace nebo polyPEGylace) jsou

PEG skupiny přednostně připojeny k proteinu přes $-CH_2-NH-$ skupinu. Pokud jde o $-CH_2-$ skupinu, tento typ spojení je zde zmiňován jako „alkylová" vazba.

Redukční alkylace pro produkci značně homogenní populace produktu monopolymer/protein bude obecně zahrnovat následující kroky: (a) reakce proteinu s reaktivní PEG molekulou za podmínek pro redukční alkylaci a při pH umožňujícím selektivní modifikaci α--aminoskupiny na amino konci daného proteinu a (b) získání reakčního produktu (produktů). Příprava derivátů redukční alkylací pro produkci produktů s jednou PEG molekulou využívá rozdílů pKa mezi lysinovou aminoskupinou a α-aminoskupinou na N-konci (pKa je pH, kdy 50% aminoskupin je protonovaných a 50% ne).

Reakce probíhá při pH, které umožní využít rozdíl pKa mezi ε-aminoskupinami lysinových residuí a α-aminoskupinou residua na N-konci proteinu. Obecně, je-li pH nižší, bude žádoucí větší převaha polymeru k proteinu (tj. čím méně reaktivní je α-aminoskukpina N-konce, tím více polymeru bude potřeba k dosažení optimálních podmínek). Jestliže je pH vyšší, poměr polymer:protein nemusí být tak vysoký (tj. jsou k dispozici reaktivnější skupiny, takže je zapotřebí méně molekul polymeru). Pro účely předkládaného vynálezu bude pH zpravidla v rozsahu 3-9, nebo lépe 3-6. Pro redukční alkylaci by redukční činidlo mělo být stabilní ve vodných roztocích a také schopné redukovat jenom Schiffovu bázi tvořenou v počátku procesu redukční alkylace. Vhodná redukční činidla můžou být vybrána z borohydridu sodného (sodium borohydride), kyanoborohydridu sodného (sodium cyanoborohydride), dimetylamin boranu (dimethylamine borane), trimetylamin boranu (trimethylamine borane), pyridin boranu (piridine borane). Zvláště vhodným redukčním činidlem je kyanoborohydrid sodný. Ostatní reakční parametry, jako je například rozpouštědlo, reakční čas, teplota a způsob purifikace produktu můžou být určeny případ od případu a odvozeny na základě publikovaných informací vztahujících se k přípravě derivátů proteinů s ve vodě rozpustnými polymery.

Takovouto selektivní přípravou derivátů se řídí připojení ve vodě rozpustného polymeru (který obsahuje reaktivní skupinu, jako například aldehyd) k proteinu: konjugace s polymerem se uskuteční převážně na N-konci proteinu a nedochází k významné modifikaci

ostatních reaktivních skupin, jako jsou aminoskupiny lysinového postranního řetězce. Přípravek bude typicky tvořen z více než 90% konjugátem monopolymer/protein (zpravidla z více než 95% konjugátem monopolymer/protein) s tím, že se budou vyskytovat i zjistitelné nezreagované molekuly (tj. protein bez polymerové složky).

Specifickým případem předkládaného vynálezu je nevětvená monomethoxy-polyetylen glykol aldehydová molekula (unbranched monomethoxy-polyethylene glykol aldehyde molecule) s průměrnou molekulovou hmotností buď asi 20kDa nebo asi 33kDa (např. mezi 30kDa a 35kDa) nebo terciární butyl polyetylen glykol aldehyd (tertiary-butyl polyethylene glycol aldehyde) s průměrnou molekulovou hmotností asi 33kDa (např. mezi 30kDa a 35 kDa) konjugovaných redukční alkylací k sTNFR-I 2.6D/N105.

PEGylace také může být speciálně provedena přes ve vodě rozpustné polymery s alespoň jednou reaktivní hydroxyskupinou (např. polyetylen glykol), které můžou reagovat s činidlem s reaktivní karbonylovou, nitrilovou nebo sulfonovou skupinou pro konverzi hydroxylové skupiny na reaktivní Michaelův akceptor (ractive Michael acceptor). Tím se vytvoří „aktivovaná spojka (activated linker)" užitečná při modifikaci různých proteinů s cílem poskytnout lepší biologicky aktivní konjugáty. „Reaktivní karbonyl, nitril nebo sulfon" znamená karbonylovu, nitrilovou nebo sulfonovou skupinu, ke které je připojena dvouuhlíkatá skupina s reaktivním místem pro thiol specifickou vazbu na druhém uhlíku od karbonylové, nitrilové nebo sulfonové skupiny (WO 92/16221).

Aktivované spojky mohou být monofunkční, bifunkční nebo multifunkční. Užitečnými činidly s reaktivní sulfonovou skupinou, které můžou být použité v těchto metodách, jsou (bez omezení pouze na ně) chlorosulfon, vinylsulfon a divinylsulfon.

Ve specifickém případě může být ve vodě rozpustný polymer aktivován Michaelovým akceptorem. WO 95/13312 popisuje (kromě jiného) ve vodě rozpustné, sulfonem aktivované PEGy, které jsou vysoce selektivní pro vazbu s thiolovou složkou místo amino složek na molekule a na povrchu. Tyto deriváty PEGu jsou déle stabilní při hydrolýze ve vodném prostředí při pH 11 nebo nižším a mohou tvořit vazby s molekulami, přičemž dochází k tvorbě konjgátů, které jsou také hydrolyticky stabilní. Vazba, kterou jsou konjugovány PEGy a

biologicky aktivní molekula, zahrnují sulfonovou složku spojenou s thiolovou složkou a mají strukturu PEG-SO_2-CH_2-CH_2-S-W, kde W představuje biologicky aktivní molekulu a kde sulfonová skupina je vinyl sulfon nebo aktivní etyl sulfon. Dva zvláště užitečné homobifunkční (homobifunctional) deriváty jsou PEG-*bis*-chlorosulfon a PEG-*bis*-vinylsulfon.

PCT International Application No. US96/19459, jehož popis je zde zahrnut odkazem, uvádí metodu přípravy sulfonem-aktivovaných vazeb (sulfone activated linkers) získáním sloučeniny s reaktivní hydroxylovou skupinou a konverzí hydroxylové skupiny na reaktivní Michaelův akceptor pro vytvoření aktivované spojky (activated linker). Jako rozpouštědlo pro konverzi se použije tetrahydrofuran (THF). PCT International Application No. US96/19459, jehož popis je zde zahrnut odkazem, uvádí postup pro purifikaci aktivovaných spojek, který používá chromatografii s hydrofobními interakcemi založenou na k separaci spojek podle velikosti a funkčnosti koncové skupiny.

Předkládaný vynález se konkrétně zabývá následovnými prokaryontně-exprimovanými molekulami chemicky pozměněnými tak, aby obsahovaly poly- (např. 2-4) PEG složky: 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, buď metionylovanými nebo nemetionylovanými a jejich variantami.

Polyvalentní forma (formy)

Může se také připravit polyvalentní forma (formy), tj. molekuly obsahující více než jednu aktivní složku (active moiety). V jednom případě může mít molekula více vazebných míst pro faktor nekrotizující tumory pro TNF ligand (např. kombinace zkráceného sTNFR produktu). Molekula má dále nejméně 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 interleukin-1 receptoru („IL-1ra"), jak je popsáno dále).

Můžou se také vytvořit polyvalentní formy, např. chemickým spojením nejméně jednoho zkráceného sTNFR produktu s jakoukoliv

klinicky akceptovatelnou spojkou (linker) (např. ve vodě rozpustným polymerem jak je popsáno dále). Zpravidla by spojka neměla dodávat novou imunogenicitu (vzhledem k novým aminokyselinovým residuím) nebo pozměňovat hydrofobicitu a náboj konstruktu tak, aby došlo k škodlivému ovlivnění jeho biodistribuce a odbourávání.

Takovéto polymery, jsou-li použity jako spojky, mohou být homopolymery, náhodné nebo blokující kopolymery (momopolymer, random or block copolymers) a terpolymery (terpolymers) založené na výše uvedených monomerech, nevětvené nebo větvené, substituované nebo nesubstituované. Polymer může mít jakoukoliv délku nebo molekulovou hmotnost, ale tyto charakteristiky můžou ovlivnit biologické vlastnosti. Polymery zvláště vhodné pro snížení rychlosti odbourávání ve farmaceutických aplikacích mají průměrnou molekulovou hmotnost v rozsahu 2000 až 35000 daltonů. Délka polymeru může být navíc rozmanitá pro optimalizaci nebo vytvoření požadovaných biologických aktivit.

Mezi aktivované (activating) skupiny, které se můžou použít pro připojení ve vodě rozpustného polymeru ke dvou nebo více proteinům, patří následující: sulfonová, maleimidová, sulfhydrylová, thiolová, triflátová, tresylátová, azidirinová, oxiranová a 5-pyridylová (sulfone, maleimide, sulfhydryl, thiol, triflate, tresylate, azidirine, oxirane and 5-pyridyl).

Ve specifickém případě se můžou bifunkční nebo multifunkční aktivované spojky s alespoň jedním Michaelovým akceptorem připravit podle United States Patent Application No. 08/473 809 a purifikovat podle United States Patent Application No. 08/611 918.

Aktivní složky mohou být připojeny použitím konvenčních připojovacích (coupling) technik (viz PCT Publication No. WO 92/16221 a viz PCT Publication No. WO 95/34326, jejichž popis je zde zahrnut odkazem). Kromě toho PCT Publication No. WO 92/16221 popisuje přípravu různých dimerizovaných inhibitorových molekul sTNFR-I, např. dimerizované c105 sTNFR-I. Příklad polyvalentního faktoru nekrotizujícího tumory vazebného proteinu se vzorcem (sTNFR-I 2.6D/C106)$_2$-(20 kDa PEG) je uveden v Příkladu I.

Nebo se může bivalentní molekula skládat z dvou tandemových opakování zkrácených sTNFR produktů oddělených polypeptidovou spojkou (by polypeptide linker region). Návrh polypeptidových spojek

je podobný návrhu vložení krátké smyčky sekvencí mezi domény *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 dimerické formy rekombinantního lidského sTNFR-II (Neve et al. (1996), Cytokine, 8(5):365-370, jehož popis je zde zahrnut odkazem). Připravilo se (a úspěšně použilo u protilátek) několik odlišných konstruktů spojek; nejúspěšnější funkční spojky mají velikost mezi 12 až 25 aminokyselinami (aminokyseliny s nereaktivními postraními skupinami, např. alanin, serin a glycin), což dohromady tvoří hydrofilní sekvenci s několika opačně nabitými zbytky pro zvýšení rozpustnosti a jsou přizpůsobivé (Whitlow a Filipula (1991), Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:97-105 a Bridgo et al. (1993), J. Immunol., 150: 469-479, jejichž popis je zde zahrnut odkazem).

V jiném aspektu mohou být zkrácené sTNFR chemicky připojené k biotinu a konjugáty biotin/zkrácené sTNFR se můžou potom vázat na avidin, čímž vznikne tetravalentní molekula avidin/biotin/zkrácené molekuly sTNFR. Zkrácené sTNFR můžou být také kovalentě připojené k dinitrofenolu (DNP) nebo tetranitrofenolu (TNP) a výsledný konjugát precipitován anti-DNP nebo anti-TNP IgM za tvorby dimerických konjugátů, kde je hodnota valence pro TNF vazebná místa 10.

Také se můžou připravit rekombinantní fůzní proteiny se zkráceným sTNFR, kde každá rekombinantní chimerická molekula má sTNFR sekvenci (jak je popsána výše) substituovanou za variabilní domény buď kterékoliv samotné nebo obou částí imunoglobulinové molekuly (lehké nebo těžké řetsězce) a s úplnými nebo částmi konstantních domén (ale nejméně jednou konstantní doménou) těžkého nebo lehkého řetězce lidských imunglobulinů. Například každý takovýto chimerický zkrácený sTNFR/IgG1 fůzní protein může být připraven ze dvou chimerických genů: chiméra zkráceného sTNFR/lidský kapa lehký řetězec (zkrácený sTNFR/Ck) a chiméra zkráceného sTNFR/lidský gama-1 těžký řetězec (zkrácený sTNFR/Cg-1). Po transkripci a translaci dvou chimerických genů, jak je popsáno dále, může být genový produkt složen do jedné chimerické molekuly, kde je zkrácený sTNFR bivalentní. Další podrobnosti vztahující se ke konstrukci takovýchto chimerických

molekul jsou uvedeny v United States Patent 5 116 964, PCT Publication No. WO 89/09622, PCT Publication No. WO 89/16437 a EP 315062, jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

V dalším aspektu můžou být připraveny rekombinantní fůzní proteiny se zkráceným sTNFR, kde každá rekombinantní chimerická molekula má sTNFR sekvenci popsanou výše a alespoň část regionu 186-401 osteoprotegerinu (OPG - osteoprotegerin), jak je popsáno v European Patent Application No. 96309363.8.

Polynukleotidy

Předkládaný vynález také poskytuje polynukleotidy, které kódují zkrácené sTNFR. Na základě uvedeného výkladu s použitím tabulky kodónů, může průměrný odborník snadno určit všechny nukletotidové sekvence, které kódují aminokyselinové sekvence zkrácených sTNFR. V současnosti preferované sekvence nukleových kyselin zahrnují polynukleotidové sekvence kódující 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. Příklady rozličných polynukleotidů jsou uvedené na obrázcích 2, 3, 4, 5, 6 a 7.

Pro přípravu těchto polynukleotidů a pro expresi kódovaných proteinů se můžou použít techniky rekombinantní exprese provedené ve shodě s popisy vysvětlenými dále. Například vložením sekvence nukleových kyselin, které kódují zkrácené sTNFR, do vhodného vektora, může odborník snadno vytvořit velké množství požadovaných nukleotidových sekvencí. Tyto sekvence můžou být dále použité pro přípravu detekčních sond nebo amplifikačních primerů. Poynukleotidy kódující zkrácené sTNFR můžou být také včleněny do expresních vektorů. Vpravením expresních vektorů do vhodného hostitele se může produkovat požadovaný zkrácený sTNFR ve velkých množstvích.

Jak je zde dále popsáno, existuje pro zmnožení požadované sekvence nukleových kyselin a/nebo produkci zkrácených sTNFR řada dostupných systémů hostitel/vektor. Patří mezi ně mimo jiné plasmidy, virové a inserční vektory a prokaryontní a eukaryontní hostitelé. Odborník může upravit systém hostitel/vektor, který je schopný propagace nebo exprese heterologní DNA pro produkci nebo expresi sekvencí předkládaného vynálezu.

11.10.99

Kromě toho odborníci ocení, vzhledem k předkládanému popisu, nové sekvence nukleových kyselin včetně degenerovaných sekvencí nukleových kyselin kódujících zkrácené sTNFR se sekvencemi uvedenými v sekci Obrázky a ty sekvence nukleových kyselin, které hybridizují (přednostně za stringentních hybridizačních podmínek) s doplňky těchto sekvencí nukleových kyselin (Maniatis et al. (1982), Molecular cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, strany 387-389). Vzorové stringentní hybridizační podmínky jsou hybridizace v 4x SSC při 62-67 °C, s následným odmýváním po dobu asi jedné hodiny v 0,1x SSC při 62-67 °C. Jinými vzorovými stringentními hybridizačními podmínkami je hybridizace v 45-55% formamidu, 4x SSC při 40-45 °C. Zahrnuté jsou také DNA sekvence, které hybridizují k sekvencím nukleových kyselin vyznačených na obrázcích 1 a 9 za mírnějších hybridizačních podmínek a které kódují zkrácené sTNFR. Příklady takovýchto méně stringentních hybridizačních podmínek jsou 4xSSC při 45-55 °C nebo hybridizace s 30-40% formamidem při 40-45 C.

Předkládaný vynález také poskytuje rekombinantní DNA konstrukty obsahující vektorové DNA s DNA sekvencemi kódujícími zkrácené sTNFR. V každém takovémto DNA konstruktu je sekvence nukleových kyselin kódující zkrácený sTNFR (s nebo bez signálních peptidů) operačně spojena (in operative association) s vhodnou expresi řídící nebo regulační sekvencí schopnou řídit replikaci a/nebo expresi zkráceného sTNFR ve vybraném hostiteli.

Rekombinantní exprese

Příprava polynukleotidů

Sekvence nukleových kyselin kódující zkrácené sTNFR můžou být snadno získány řadou způsobů, mezi které například patří chemická syntéza, testování cDNA nebo genomové knihovny, testování expresní knihovny a/nebo PCR amplifikace cDNA. Tyto a ostatní metody, které jsou užitečné pro izolaci sekvencí nukleových kyselin, jsou uvedeny v Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989); v Ausubel et al., eds Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols Press, (1994); a v Berger and Kimmel, Methods in

Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques, Vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA, (1987), jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

Chemická syntéza sekvencí nukleových kyselin, které kódují zkrácené sTNFR se může provést například použitím metod dobře známých odborníkům, které uvádí například Engels et al., (1989) Angew. Chem. Intl. Ed., 28:716-734 a Wells et al., (1985), Gene, 34:315, jejichž popis je zde zahrnut odkazem. Tyto metody zahrnují mezi jinými fosfotriesterovou, fosforamiditovou a H-fosfonátovou (phosphotriester, phosphoramidite and H-phosphonate) metodu syntézy sekvence nukleových kyselin. Velké sekvence nukleových kyselin, například delší než asi 100 nukleotidů, můžou být syntetizovány jako několik fragmentů. Fragmenty můžou potom být spojeny ligací tak, aby vytvořily sekvenci nukleových kyselin kódující zkrácené sTNFR. Preferovanou metodou je syntéza na polymerech (polymer-supported) s použitím standardní fosforamiditové chemie.

Příslušné sekvence nukleových kyselin můžou být také získány testováním vhodných cDNA knihoven (tj. knihoven připravených z jednoho nebo více pletiv, kde se předpokládá exprese proteinu) nebo genomových knihoven (knihovna připravená z celkové genomové DNA). Zdroj pro cDNA knihovnu je typicky pletivo jakéhokoliv druhu, kde se předpokládá exprese požadovaného proteinu v rozumných množstvích. Zdroj pro genomovou knihovnu může být jakékoliv pletivo nebo pletivo z jakéhokoliv savce nebo jiného druhu, kde se předpokládá gen kódující zkrácený sTNFR.

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

Hybridizace se typicky provádí přichycením (annealing) oligonukleotidové sekvence nebo cDNA ke klonům za tak stringentních podmínek, které vyloučí nespecifické navazování, ale umožní navázání

těch klonů, které mají významnou hladinu homologie se sondou nebo primerem. Typické stringentní hybridizační a promývací podmínky záleží částečně na velikosti cDNA nebo oligonukleotidové sondy (tj. na počtu nukleotidů) a na tom, jestli je sonda degenerovaná. Při navrhování hybridizačního média se také bere do úvahy pravděpodobnost identifikace klonu (tj. jestli se testuje genomová nebo cDNA knihovna).

Když je použit DNA fragment (jako např. cDNA) jako sonda, typické hybridizační podmínky zahrnují ty, které jsou popsané v Aubel et al. (1994), eds., supra. Po hybridizaci se hybridizační médium odmyje za vhodných stringentních podmínek. Ty se volí v závislosti na několika faktorech, jako je velikost sondy, očekávaná homologie sondy a klonu, testovaném hybridizačním mediu, počtu testovaných klonů atd. Příklady stringentních promývacích rozktoků (které mají zpravidla nízkou iontovou sílu a jsou používány při relativně vysokých teplotách) jsou následující: 0,015 M NaCl, 0,05 M Na citrát a 0,1% SDS při 55-65 °C nebo jiný - 1mM Na_2EDTA, 40 mM $NaHPO_4$, pH 7,2 a 1 % SDS při asi 40-50 °C nebo ještě jiný 0,2x SSC a 0,1% SDS při asi 50-65 C.

Existují také ukázkové protokoly pro stringentní promývací podmínky, kde jsou pro testování hybridizačních médií použity oligonukleotidové sondy. Například první protokol používá 6x SSC s 0.05% pyrofosfátu sodného při teplotě zhruba mezi 35-63 °C v závislosti na délce sondy. Například sonda o délce 14 bazí je promývána při 35-40 °C, o délce 17 bazí při 45-50 °C, o délce 20 basí při 52-57 °C a o délce 23 bazí při 57-63 °C. Teplota může být zvýšena o 2-3 °C, jestliže je pozadí dané nespecifickým navazováním sondy vysoké. Druhý protokol používá pro promývání tetrametyl amonium chlorid (TMAC). Stringentní promývací roztok tak může mít následující složení: 3M TMAC, 50mM Tris-HCl, pH 8 a 0,2% SDS.

Jinou vhodnou metodou pro získání vhodných sekvencí nukleových kyselin je polymerázová řetězová reakce (PCR). Při použití této metody se připraví cDNA z poly(A)+RNA nebo celkové RNA použitím enzymu reverzní transkriptáza. Dva primery (oligonukleotidy), typicky komplementární ke dvěma odděleným oblastem cDNA kódující zkrácený sTNFR, jsou přidány k cDNA společně s polymerázou (jako je

např. Taq polymeráza) a ta amplifikuje oblast cDNA mezi dvěma primery.

Oligonukleotidové sekvence vybrané jako sondy nebo primery by měly být odpovídající délky a dostatečně jednoznačné tak, aby se minimalizovalo nespecifické navazování během testování nebo PCR amplifikace. Konkrétní sekvence sondy nebo primerů je zpravidla založená na konzervovaných nebo vysoce homologních sekvencích nebo oblastech. Sondy nebo primery můžou být případně zcela nebo částečně degenerované, tj. mohou obsahovat směs sond/primerů, kde všechny kódují stejnou aminokyselinovou sekvenci, ale s použitím různých kodonů. Alternativou degenerovaných sond je použití inosinu na některých nebo všech kodónových pozicích, které se liší podle druhu. Oligonukleotidové sondy nebo primery můžou být připravené metodami chemické syntézy DNA, jak bylo popsáno výše.

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

Vektory

DNA kódující zkrácené sTNFR může být pro další klonování (amplifikaci DNA) nebo expresi včleněna do vektorů. Vhodné vektory jsou komerčně dostupné nebo se můžou speciálně připravit. Výběr nebo konstrukce vhodného vektoru bude záviset (1) na tom jestli bude použit pro amplifikace DNA nebo expresi DNA (2) na velikosti DNA, která má být včleněna do vektora (3) na zamýšlené hostitelské buňce, která bude transformovaná vektorem.

Každý z vektorů obsahuje sekvenci nukleových kyselin, která kóduje požadovaný protein, funkčně spojenou s jednou nebo více expresi řídících nebo regulačních sekvencí schopných 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 vektora zpravidla zahrnují (ale nejsou omezeny pouze na ně): signální sekvence, počátek replikace, jeden nebo více signálních (marker) genů, promotory, zesilovací elementy, sekvenci ukončující transkripci atd. Tyto komponenty se můžou získat z přirozených zdrojů nebo můžou být syntetizovány známými postupy.

Příkladem vhodných prokaryotických klonovacích vektorů můžou být bakteriofágy (např odvozené od lambdy), nebo plasmidy z *E. coli*. (např. pBR322, colE1, pUC, F-faktor, odvozeniny Bluescript® (Stratagene, LaJolla, CA)). Pro uvedené účely může být použita řada dalších vhodných expresních vektorů, které jsou odborníkům známé.

Signální sekvence

Nukleová kyselina kódující signální sekvenci může být vložena na 5' konci sekvence kódující zkrácený sNTFR. Může být např. složkou vektora, nebo může být částí nukleové kyseliny kódující zkrácený sTNFR. Nukleové kyseliny kódující původní signální sekvence sTNFR-I a sTNFR-II jsou známé (EP 393 438 a EP 422 339).

Počátek replikace

Jak expresní, tak klonovací vektory obecně zahrnují sekvenci nukleových kyselin, která umožňuje vektoru replikovat se v jedné nebo více vybraných hostitelských buňkách. V klonovacím vektoru je tato sekvence typicky ta, která umožňuje vektoru replikovat se nezávisle na hostitelské chromozomální DNA a zahrnuje počátek replikace nebo autonomně se replikující sekvence. Takovéto sekvence jsou dobře známé. Počátek replikace z plasmidu pBR322 je vhodný pro většinu Gram-negativních bakterií. Různé počátky (např. SV40, polyoma, adenovirus, VSV nebo BVP) jsou vhodné pro klonování vektorů v savčích buňkách. Obecně, počátek replikace není nutný pro savčí expresní vektory (např. počátek SV40 se často používá pouze proto, že obsahuje časný promotor).

Selekční gen

Jak expresní, tak klonovací vektory typicky obsahují selekční gen. Tento gen kóduje „značkový" (marker) protein nezbytný pro

přežití nebo růst transformovaných hostitelských buněk, rostou-li v selekčním kultivačním médiu. Hostitelské buňky, které nejsou transformované vektorem, nebudou obsahovat selekční gen a proto nepřežijí v kultivačním médiu. Typické selekční geny kódují proteiny, které: (a) udělují rezistenci k antibiotikům nebo jiným toxinům, např. k ampicilinu, neomycinu, metotrexátu (metothrexate) nebo tetracyklinu, (b) doplní auxotrofní nedostatek nebo (c) poskytnou nezbytné živiny, které nejsou v živném médiu

Pro amplifikaci genů, které se mají exprimovat, se můžou použít i jiné selekční geny. Amplifikace je proces, kde geny, které jsou důležitější pro produkci proteinů nezbytných pro růst, se tandemově opakují uvnitř chromosomů následujících generací rekombinantních buněk. Příklady vhodných selekčních markerů pro savčí buňky zahrnují např. dihydrofolát reduktázu (dihydrofolate reductase - DHFR) a thimidin kinázu. Buněčné transformanty jsou vystavené selekčnímu tlaku, kde pouze transformanti jsou schopni se adaptovat a přežít díky markerům přítomným ve vektoru. Selekční tlak je vyvolán pěstováním transformovaných buněk za podmínek, kdy koncentrace selekčního činidla v médiu je postupně měněna a tím dochází k amplifikaci jak selekčního genu tak DNA, která kóduje zkrácené sTNFR. Výsledkem je zvýšené množství zkrácených sTNFR, které jsou syntetiovány z amplifikovné DNA.

Například buňky transformované selekčním genem pro DHFR jsou nejdřív identifikované pěstováním všech transformantů v živném médiu, které obsahuje metotrexát (kompetitivní analog DHFR). Při použití divokého typu DHFR je vhodnou hostitelskou buňkou buněčná linie z vaječníků křečka (Chinese hamster ovary cell line) postrádající DHFR aktivitu (Urlaub a Chasin (198), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77:(7):4216-4220, jehož popis je zde zahrnut odkazem). Transformované buňky jsou potom vystaveny zvýšené hladině metotrexátu. To vede k syntéze více kopií genu DHFR a průvodně více kopiím jiných genů obsažených v expresím vektoru, jako je DNA kódující zkrácenou sTNFR.

Promotory

Jak expresní, tak klonovací vektory typicky obsahují promotor, který je rozeznán hostitelským organismem a je operačně spojen se

sekvencí nukleové kyseliny kódující zkrácený sTNFR. Promotor je netranslatovaná sekvence umístěná před (5') startovacím kodonem strukturního genu (zpravidla v rámci 100 až 1000 pb), která řídí transkripci a translaci určité sekvence nukleových kyselin, které například kódují zkrácené sTNFR. Promotor může být vhodně zařazen do jedné ze dvou tříd - inducibilní promotory a konstitutivní promotory. Inducibilní promotory iniciují zvýšení transkripce z DNA pod svým řízením jako odpověď na některé výživové změny nebo změny v teplotě. Je známá celá řada promotorů rozeznávaná řadou potenciálních hostitelských buněk. Promotor může být operačně připojen k DNA kódující zkrácený sTNFR tak, že se restrikčními enzymy odstraní promotor ze zdrojové DNA a včlení se požadovaná promotorová sekvence. Původní promotorová sekvence sTNFR-I nebo promotorová sekvence sTNFR-II se může použít pro přímou amplifikaci a/nebo expresi DNA kódující zkrácený sTNFR. Preferuje se ale heterologní promotor, jestliž to vede k větší transkripci a vyššímu výtěžku exprimovaného proteinu v porovnání s původním promotorem a jetliže je kompatibilní s hostitelským buněčným systémem, který byl vybrán k použití. Například pro přímou amplifikaci a/nebo expresi DNA kódující zkrácený sTNFR se může použít kterákoliv z původních promotorových sekvencí ostatních členů rodiny NGF/TNF.

Promotory vhodné pro použití u prokaryontních hostitelů zahrnují beta-laktamázový a laktózový promotorový systém; promotor alkalické fosfatázy; tryptofanový (trp) promotorový systém; systém bakteriálního luminescenčního (luxR) genu a hybridní promotory, jako je tac promotor. Vhodné jsou také jiné známé bakteriální promotory. Jejich nukleotidové sekvence byly publikovány a tím je umožněno odborníkům připojit je k požadované DNA sekvenci (sekvencím) s použitím spojek (linkers) a adaptorů (adaptors), když je nutné doplnit požadované restrikční místo.

Vhodné promotorové sekvence pro použití u savčích hostitelských buněk jsou také dobře známé a patří mezi ně promotory získané z genomů virů, jako je polyoma virus, virus drůbežích neštovic (fowlpox virus), adenovirus (jako např. Adenovirus 2), hovězí papiloma virus (bovine papilloma virus), ptačí sarkomový virus (avian sarcoma virus), cytomegalovirus, retrovirus, virus žloutenky B a zejména opičí virus 40 (SV40). Další vhodné savčí promotory

zahrnují heterologní savčí promotory,např. „heat-shock" promotory a aktinový promoter.

Zesilovací prvky (Enhancer Element)

Jak expresní, tak klonovací vektory budou zpravidla obsahovat zesilovací sekvence pro zvýšení transkripce DNA sekvence kódující zkrácený sTNFR ve vyšší eukaryontech. Zesilovače jsou cis-působící (cis-acting) komponenty DNA o délce zpravidla 10-300 pb, které působením na promotor zvyšují jeho transkripci. Zesilovače jsou relativně orientačně a pozičně nezávislé. Nacházejí se jak na 5′ tak na 3′ konci transkripční jednotky. Kvasniční zesilovač je výhodně spojen s kvasničními promotory. Je známo několik zesilovacích sekvencí dostupných ze savčích genů (např. globin, elastáza, albumin, alfa fetoprotein, a insulin). Navíc virové zesilovače, jako např. SV40 zesilovač, zesilovač časného promotoru cytomegaloviru, polyoma zesilovač a zesilovače adenovirů jsou příklady zesilovacích prvků pro aktivaci eukaryontních promotorů. I když zesilovač může být jak na 3′, tak na 5′ konci DNA kódující zkrácený sTNFR, typicky je na 5′ pozici od promotoru.

Ukončení transkripce

Všechny expresní vektory použité v eukaryontních hostitelských buňkách typicky obsahují sekvence nezbytné pro ukončení transkripce a pro stabilizaci mRNA. Takovéto sekvence jsou běžně dostupné z 5′ a někdy z 3′ oblastí, kde nedochází k translaci eukaryontních DNA nebo cDNA. Tyto oblasti obsahují nukleotidové segmenty transkribované jako polyadenylované fragmenty na oblastech mRNA kódující zkrácený sTNFR, kde nedochází k translaci.

Konstrukce vektora

Konstrukce vhodného vektora, obsahujícího jednu nebo více z dříve zmíněných složek (společně se sekvencí kódující zkrácený sTNFR), se dosáhne standardní ligační technikou. Izolované plazmidy nebo DNA fragmenty jsou rozštěpeny, upraveny a znova spojeny v požadovaném pořadí tak, aby se vytvořil požadovaný vektor. Aby se ověřila správnost sekvence konstruktu, ligační směs je možné použít pro transformaci *E.coli* a úspěšné transformanty se můžou vybrat

technikami popsanými výše. Pak se připraví vektor z transformantů ve větších množstvích a vektor je analyzován rozštěpením restrikčními endonukleázami a/nebo sekvenováním, aby se ptvrdila přítomnost požadovaného konstruktu.

Také se může použít vektor, který v savčích buňkách zajistí přechodnou (transient) expresi DNA kódující zkrácený sTNFR. Obecně přechodná exprese zahrnuje použití expresního vektora, který je schopen účinně se replikovat v hostitelské buňce, takže hostitelská buňka akumuluje mnoho kopií expresního vektora a následně syntetizuje vysoké hladiny požadovaného proteinu kódovaného expresním vektorem. Každý přechodný expresní systém, skládající se z expresního vektora a hostitelské buňky, je vhodný pro pozitivní identifikaci proteinů kódovaných klonovanými DNA a také pro rychlé testování takovýchto proteinů na požadované biologické nebo fyziologické vlastnosti, tj. na identifikaci biologicky aktivních zkrácených sTNFR.

Hostitelské buňky

Předkládaný vynález také poskytuje všechny rekombinantní hostitelské bunky, které obsahují sekvence nukleových kyselin použitelných při expresi požadovaného proteinu. Vzorové prokaryontní a eukaryontní hostitelské buňky zahrnují buňky bakteriální, savčí, hmyzí, buňky hub a kvasinek a buňky rostlinné.

Prokaryotické hostitelské buňky zahrnují (ale nejsou omezeny pouze na ně) eubakterie, jako například Gram-pozitivní nebo Gram negativní organizmy (např. *E. coli* (HB101, DH5a, DH10 a MC1061) bacily jako *B. subtilis*; druh *Pseudomans* jako *P. aeruginosa*; poddruhy *Streptomyces*; *Salmonella typhimurium* nebo *Serratia marcescans*. Ve specifickém případě může být požadovaný protein exprimován v *E. coli*.

Navíc kromě prokaryontních hostitelských buněk můžou být vhodnými hostiteli pro expresi zkrácených sTNFR eukaryontní mikroby, jako např. vláknité houby nebo kvasnice. Mezi nižšími eukaryontními hostitelskými organismy se nejčastěji používá *Sacharomyces cerevisiae* nebo běžné droždí, ale dobře známá a běžně dostupná je řada dalších tříd, druhů a kmenů.

Zkrácené sTNFR můžou být exprimované v glykosilované formě kteroukoliv z řady vhodných hostitelských buněk odvozených z vícebuněčného organismu. Takovéto hostitelské buňky jsou schopné komplexního zpracování a glykosilačních aktivit. Většinou může být použita jakékoliv eukaryontní buněčná kultura, ať už z buněk obratlovců nebo bezobratlých včetně buněk rostlinných a hmyzích. Ve zvláštním případě může být požadovaný protein exprimován v buňkách baculovirů.

Můžou se použít buňky obratlovců, protože jejich množení v kultuře (tkáňové kultury) je dobře známé. Příklady vhodných linií savčích hostitelských buněk zahrnují například linii 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. Mezi ostatní vhodné savčí buněčné linie patří např. HeLa, myší L-929 buňky, 3T3 linie odvozené ze Swiss, Balb-c nebo NIH myší a buněčné linie BHK nebo HaK z křečka. V určitém případě může být požadovaný protein exprimován v COS buňkách.

Hostitelská buňka může být transfekovaná nebo lépe transformovaná požadovanou nukleovou kyselinou za vhodných odmínek, kdy dochází k expresi nukleové kyseliny. Výběr vhodných hostitelských buněk, metody pro transformaci, pěstování, amplifikaci, testování a produkci produktu a jeho purifikaci je odborníkům dobře známý (Gething a Sambrook (1981), Nature, 293:620-625 nebo Kaufman et al. (1985), Mol. Cell. Biol., 5(7):1750-1759, nebo U.S. Pat. No. 4 419 446, jejichž popisy jsou zde zahrnuty odkazem. Například pro savčí buňky bez buněčné stěny se může použít precipitační metoda s fosfátem vápenatým (calcium phosphate). Dále se může použít elektroporace, mikro injekce a ostatní známé techniky.

Je také možné produkovat zkrácené sTNFR homologní rekombinací nebo metodami rekombinantní produkce využívajícími řídících elementů vnesených do buněk, které už obsahují DNA kódující zkrácené sTNFR. Homologní rekombinace je technika původně vyvinutá pro zaměření genů k indukci nebo opravě mutací v transkripčně aktivních genech (Kucherlapati (1989), Prog. In Nucl. Acid Res. And Mol. Biol., 36:301, jehož popis je zde zahrnut odkazem"). Základní technika byla vyvinutá jako metoda pro vnesení 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 chybného genu (Doetschman et al. (1987), Nature, 330:576-578, jehož popis je zde zahrnut odkazem). Vzorové techniky jsou popsané v U.S. Patent No. 5 272 071; WO92/01069; WO93/03183; WO 94/12650 a WO 94/31560, jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

Díky homologní rekombinaci může být DNA sekvence určená k včlenění do genomu umístěná do určité oblasti příslušného genu jejím přichycením k cílové DNA. Cílová DNA je DNA, která je komplementární (homologní) k oblasti genomové DNA. Malé úseky cílové DNA, které jsou komplementární k specifické oblasti genomu, se dostanu do kontaktu s rodičovským pramenem během procesu replikace DNA. DNA, která byla vnesena do buňky obecně hybridizuje a tudíž rekombinuje s jinými úseky endogenní DNA sdílením homologních oblastí. Jestliže je tento komplementární pramen připojen k oligonukleotidu, který obsahuje mutaci nebo odlišnou sekvenci DNA, je také zainkorporována do nově syntetizovaného pramene (jako výsledek rekombinace). Díky proofreadingové funkci je možné, že tato nová sekvence slouží jako templát. Takto je přenesená DNA inkoroporovaná do genomu.

Jestliže je známá sekvence určitého genu (například sekvence nukleových kyselin zkráceného sTNFR), může být syntetizovaná nebo jinak získaná (například vhodným restrikčním štěpením původní DNA v místech okolo oblasti, která nás zajímá) sekvence řídící expresi (úsek DNA, který je komplemetární k vybrané oblsti genu). Tento úsek slouží jako cílová sekvence pro vložení do buňky a bude hybridizovat ke své homologní oblasti uvnitř genomu. Jestliže k této hybridizaci dojde během replikace DNA, tento úsek DNA (a jakákoliv další sekvence takto připojená) bude sloužit jako Okazakiho fragment a bude vsazen do nově syntetizovaného dceřinného řetězce DNA.

K těmto úsekům cílové DNA jsou připojeny oblasti DNA, se které můžou vzájemně ovlivňovat s expresí zkráceného sTNFR. Například se vloží do genomu určené hostitelské buňky v dostatečné blízkosti a ve správné orientaci promotor/zesilovač, supresor nebo exogenní transkripční modulační element, aby se ovlivnila transkripce DNA

kódující požadovaný zkrácený sTNFR. Řídící element nekóduje zkrácený sTNFR, ale místo toho řídí část DNA přítomné v genomu hostitelské buňky. Exprese zkráceného sTNFR se tak může dosáhnout nikoliv transfekcí DNA, která kóduje zkrácený sTNFR ale spíše použitím cílové DNA (obsahující homologní oblasti s endogenním genem, který nás zajímá) spojené s DNA regulačním úsekem, který poskytne endogenní genová sekvence s rozeznatelným signálem pro transkripci zkráceného sTNFR.

Pěstování hostitelských buněk

Metody pro kultivaci všech (jedné nebo více) rekombinantních hostitelských buněk pro produkci požadovaného proteinu závisí na mnoha faktorech a úvahách; optimální výrobní postup pro danou situaci bude zřejmý odborníkům po několika experimentech. Rekombinantní hostitelské buňky jsou pěstovány ve vhodném médiu a exprimují zkrácený sTNFR, který je případně izolován a purifikován z živného média (nebo z buněk, je-li exprimován intracelulárně) vhodnými, odborníkům známými postupy.

Konkrétně každá z rekombinantních buněk použitých k produkci požadovaného zkráceného sTNFR může být pěstována v médiu vhodném pro indukci promotorů, pro výběr vhodných rekombinantních hostitelských buněk nebo pro amplifikaci genů kódujících požadovaný zkrácený sTNFR. Médium může být doplněno (je-li to nezbytné) hormony a/nebo ostatními růstovými faktory (jako je insulin, transferin nebo epidermální růstový faktor), solemi (chlorid sodný, vápník, hořčík a fosfát) pufry (jako je HEPES), nukleotidy (jako je adenosin a thymidin), antibiotiky (jako je gentamicin), stopovými prvky (jsou definované jako anorganické sloučeniny zpravidla přítomné v konečných koncentracích v řádu mikromolů) a glukózou nebo jiným zdrojem energie. Také se můžou doplnit jiné doplňky ve vhodných koncentracích, podle názoru odborníků. Vhodné podmínky pěstování, jako např. teplota, pH a podobně jsou odborníkům sběhlým v práci s vybranými hostiteli dobře známé.

Farmaceutické složení

Každá farmaceutická směs obecně obsahuje terapeuticky účinné množství zkrácených sTNFR a chemicky modifikované deriváty

zkrácených sTNFR (společně „zkrácený(é) sTNFR produkt(y)") s přísadou nosiče. Nosič přednostně obsahuje jeden nebo více farmaceuticky a fyziologicky přijatelný materiál s přísadou zkráceného sTNFR produktu(ů) a řízenou uvolňovanou látku.

Primární rozpouštědlo v nosiči může být buď vodné nebo nevodné povahy. Nosič může navíc obsahovat další farmaceuticky přijatelné substance pro úpravu nebo udržení pH mezi 5-6,5, nebo ještě lépe mezi 5,5-6 (například pufry, jako citrátový, fosfátový a aminokyseliny jako je glycin); látky zvětšující objem lyofilizovaného praparátu (např. manitol a glycin); osmomolarity (např. manitol nebo chlorid sodný); povrchově aktivní látky (např. polysorbát 20, polysorbát 80, triton a pluronika (pluronics)); viskozity; jasnosti; barvy; sterility; stability (např. sacharóza a sorbitol); antioxidanty (např. sulfát sodný a hydrogensulfit sodný), konzervační látky (např. kyselina benzoová a kyselina salicylová); vůně preparátu; látky ovlivňující chuť a ředící činidla; rychlosti rozpouštění (např. rozpouštědla a rozpouštěcí činidla jako alkohol, polyetylen glykol a chlorid sodný); rychlosti uvolňování; emulsifikační látky; suspenzní činidla; rozpouštědla; plniva; prostředky pro transport (delivery vehicles); ředidla; inertní substance a/nebo farmaceutické zesilovače. Dají se také předvídat další účinné formy administrace jako např. parenterální pomalu se uvolňující přípravek (parenteral slow-release formulation), inhalační mlhy, orálně aktivní přípravky (orally-active formulations) nebo čípky. Směs může také obsahovat jednotlivé přípravky polymerních sloučenin, jako např. značně narušené polymery (bulk erosion polymers) (např. tyto látky - kopolymery poly(kyselina lactic-co-glycolic (PLGA), směsi PLGA polymeru, blokující kopolymery PEGu, a kyselina mléčná a glykolová, poly(kyanoakryláty)); povrchově erozní polymery (např., poly(anhydridy) a poly(ortho estery)); hydrogel estery (např., pluronic polyoly, poly(vinyl alkohol), poly(vinylpyrrolidon), kopolymery maleic anhydrid-alkyl vinyl ether, celulóza, deriváty kyseliny hyaluronové, alginát, kolagen, želatina, albumin, a škroby a dextrany) a jejich kompozitní formy; nebo přípravky liposomů nebo mikrokuliček (liposomes or microspheres). Takovéto přípravky mohou ovlivnit fyziologický stav, stabilitu, rychlost uvolňování *in vivo* a rychlost odbourávání přítomných

proteinů a derivátů *in vivo*. Optimální farmaceutické složení pro požadovaný protein bude určené odborníkem v zásvislosti na způsobu podávání a požadované dávce. Příklady farmaceutických složení 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 94121235, jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

Specifické postupně se uvolňující směsi jsou dostupné od následujících výrobců: Depotech (Depofoam™, multivesikulární liposom - multivesicular liposome) : Alkermes (ProLease™, PLGA mikrokuličky (microsphere)). Jak je zde uvedeno, hyaluronanem (hyaluronan) se míní hyaluronan, kyselina hyaluronová (hyaluronan, hyaluronic acid) a její soli (např. hyluronát sodný - sodium hyaluronate), estery, etery, enzymatické deriváty a křížově spojené gely kyseliny hyaluronové (cross-linked gels of hyaluronic acid), jako je hylan (hylan). Příklady forem hyaluronanu jsou uvedené v Peyron and Balazs (1974), Path. Biol., 22(8):731-736; Isdale et al. (1991), J. Drug Dev., 4(2):93-99; Larsen et al. (1993), Journal of Biomedical Materials Research, 27:1129-1134; Namiki, et al. (1982), International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology, 20(11):501-507; Meyer et al. (1 995), Journal of Controlled Release, 35:67-72; Kikuchi et al. (1996), Osteoarthritis and Cartilage, 4:99-110; Sakakibara et al. (1994), Clinical Orthopaedics and Related Research, 299:282-292; Meyers a Brandt (1995), 22(9):1732-1739; Laurent et al. (1995), Acta Orthop Scand, 66(266):116-120; Cascone et al. (1995), Biomaterials, 16 (7):569-574; Yerashalmi et al. (1994), Archives of Biochemistry and Biophysics, 313(2):267-273; Bernatchez et al. (1993), Journal of Biomedical Materials Research, 27(5): 677-681; Tan et al. (1990), Australian Journal of Biotechnology, 4(1):38-43; Gombotz a Pettit (1995), *Bioconjugate Chem.*, 6: 332-351; U. S . Patent Nos. 4 582 865, 4 605 691, 4 636 524, 4 713 448, 4 716 154, 4 716 224, 4 772 419, 4 851 521, 4 957 774, 4 863 907, 5 128 326, 5 202 431, 5 336 767, 5 356 883; European Patent Application Nos. 0 507 604 A2

a 0 718 312 A2; a WO 96/05845, jejichž popis je zde zahrnut odkazem. Určité hyaluronanové směsi jsou dostupné od následujících dodavatelů: BioMatrix, Inc. Ridgefield, NJ (Synvisc™, směs 90:10 hylan tekutiny a hylan gelu (mixture of a hylan fluid and hylan gel)); Fidia S.p.A., Abano Terme, Italy (Hyalgan™, sodná sůl rozčleněné kyseliny hyaluronové (sodium salt of a rooster comb-derived hyaluronic acid) (molekulová hmotnost asi 500 000 až asi 700 000)); Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan (Artz™, 1% roztok rozčleněné kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti asi 700 000); Pharmacia AB, Stockholm, Sweden (Healon™, rozčleněná kyselina hyaluronová o molekulové hmotnosti asi $4x10^6$); Genzyme Corporation, Cambridge, MA (Surgicoat™, rekombinantní hyaluronová kyselina); Pronova Biopolymer, Inc. Portsmouth, NH (Hyaluronic Acid FCH, vysoká molekulová hmotnost, (např., okolo 1.5-2.2 x 10^6) hyaluronová kyselina připravená z kultury *Streptococcus zoaepidemicus*; Sodium Hyaluronate MV (mol. hmotnost okolo 1,0-1.6 x 10^6) a Sodium Hyaluronate LV (mol. hmotnost okolo 1,5-2,2x10^6); Calbiochem-Novabiochem AB, Lautelfingen, Switzerland (sodná sůl kyseliny hyaluronové) (Hyaluronic Acid, sodium salt) (katalogové číslo v katalogu z roku 1997 385908) připravené z druhu *Streptococcus*); Intergen Company, Purchase, NY rozčleněná kyselina hyaluronová o molekulové hmotnosti asi 1 x 10^6); Diosynth Inc., Chicago, IL; Amerchol Corp., Edison, NJ and Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan.

Jakmile je dané farmaceutické složení, může se skladovat ve sterilních ampulích jako roztok, suspenze, gel, pevná nebo dehydratovaná emulze nebo lyofilizovaný prášek. Takovéto složení se může skladovat buď ve formě připravené pro použití nebo ve formě vyžadující před použitím rekonstituci (např. lyofilizované).

Ve specifickém případě je předkládaný vynález zaměřený na soupravy pro produkci jednodávkových aplikačních jednotek. Soupravy mohou obsahovat nádobku se sušeným proteinem a nádobku s vodným přípravkem. Soupravy v rámci tohoto vynálezu zahrnují jedno nebo více komorové předplněné injekční stříkačky; ukázkově předplněné injekční stříkačky (např. tekuté injekční stříkačky (liquid syringes), lyo-inječní stříkačky (lyosyringes) (jako např. Lyo-Ject,

dvoukomorové předplněné lyo-injekční stříkačky) které jsou dostupné od Vetter GmbH, Ravensburg, Německo.

Použití

Zkrácené sTNFR produkty můžou být užitečné jako látky pro výzkum nebo jako terapeutické a diagnostické látky. Zkrácené sTNFR se můžou použít v *in vitro* a/nebo *in vivo* diagnostických testech pro kvantifikaci množství přirozeného sTNFR-I nebo sTNFR-II v pletivech nebo vzorcích orgánu nebo k určení a/nebo izolování buněk, které exprimují TNF (Scallon et al. (1995)), testech pro kvantifikaci množství přirozeného sTNFR-I nebo sTNFR-II v pletivech nebo vzorcích orgánu nebo k určení a/nebo izolování buněk, které exprimují TNF (Scallon et al. (1995), viz výše). V testech pletiv nebo orgánů bude (ve srovnání se standardní vazebnou křivkou ^{125}I-zkrácených sTNFR) méně ^{125}I radioaktivity ze zkrácených sTNFR vázajících se na TNF díky neznačenému přirozenému sTNFR-I nebo sTNFR-II vázajícímu se na TNF. Podobně ^{125}I-zkrácená sTNFR se můžou použít pro detekci přítomnosti TNF v různých typech buněk.

Tento vynález ředpokládá také použití zkrácených sTNFR produktů pro tvorbu protilátek a výsledné protilátky (konkrétně včetně těch, které se budou vázat také na původní sTNFR-I nebo sTNFR-II). Můžou se připravit protilátky, které se budou vázat k zkráceným sTNFR, například k epitopu uvnitř aminokyselinové sekvence R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 nebo uvnitř aminokyselinové sekvence R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5. Pracovník s běžnými dovednostmi může použít dobře známé a publikované postupy k získání monoklonálních a polyklonálních protilátek nebo rekombinantních protilátek, které specificky rozeznají a vážou se na různé proteiny kódované aminokyselinovými sekvencemi předkládaného vynálezu. Takovéto protilátky se potom můžou použít k purifikaci a charakterizaci hotového, 30 kDa TNF inhibitoru plné délky a hotového 40 kDa TNF inhibitoru plné délky.

Předkládaný vynález se také vztahuje k metodám léčení určitých nemocí a lékařských stavů (mnoho z nich může být charakterizováno jako zánětlivá onemocnění), které jsou zprostředkovány TNF (mediated by TNF). Nemoc nebo lékařský stav se pokládá za „TNF zprostředkované onemocnění", jestliže je spontánní nebo experimentální nemoc spojená se zvýšenými hladinami TNF v tělních tekutinách nebo pletivech

přilehlých ohnisku onemocnění nebo se objevuje v organismu. TNF zprostředkovaná onemocnění můžou být také rozlišena pomocí následujících dvou podmínek: (1) patologické nálezy spojené s chorobou můžou být vyvolány experimentálně na zvířatech podáváním TNF a (2) patologie indukovaná na experimentálních zvířecích modelech onemocnění může být inhibována nebo odstraněna použitím látek, které inhibují působení TNF. Mnoho onemocnění zprostředkovaných TNF splňuje dvě z těchto tří podmínek, ostatní splní všechny tři. Neúplný seznam chorob zprostředkovaných TNF spolu s odpovídajícími následnými onemocněními a symptomy, které všechny můžou být léčeny metodami předkládaného vynálezu jsou: syndrom respiračních potíží u dospělých (adult respiratory distress syndrome); kachexie/anorexie (cachexia/anorexia); rakovina (např. leukemie); syndrom chronické únavy (chronic fatigue syndrom); odmítnutí štěpu hostitelem; hyperalgesie (hyperalgesia); zánětlivé onemocnění střev (bowel inflammatory disease); zánětlivá neuro onemocnění (neuroinflammatory disease); ischemické/reperfuzní poškození (ischemic/reperfusion injury) včetně mozkové ischemie (poškození mozku jako výsledku traumatu, epilepsie, krvácení nebo mrtvice, což ve všech případech může vést k neurodegeneracím); diabetes (např. počátek dětské diabetes mellitus typu 1); násobná skleroza; oční onemocnění; bolest; pankreatitida; plicní fibróza (pulmonary fibrosis); revmatická onemocnění (např. revmatická artritida, osteoartritida (osteoarthritis), dětská (revmatoidní) artritida, seronegativní polyartrtida, ankylózní spondilitida (ankylosing spondylitis), Reiterův syndrom a reaktivní artritida (Reither's syndrom and reactive arthritis), lupénková artritida, enteropatická artritida (enteropatic arthritis), polymyozitida (polymyosithis), dermatomyozitida (dermatomyositis), sklerodermie (sclerodema), systematická skleróza (systemic sclerosis), vaskulitida (vasculitis), mozková vaskulitida, Sjögrenův syndrom, revmatická horečka, polychondritida (polychondritis) a revmatická polymyalgie (polymyalgia rheumatica) a arteritida velkých buněk (giant cell arteritis)); septický šok, vedlejší účinky radiační terapie; systémová lupus erytheumatous; dočasné mandibulární kloubní onemocnění; thyroitida a transplantace pletiv.

Zkrácené sTNFR produkty můžou být podávány pacientům v terapeuticky účinných množstvích pro léčení TNF zprostředkovaných onemocnění (jak jsou definovány výše) včetně například revmatických onemocnění (např. Lymské onemocnění, dětská (revmatoidní) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatická artritida a stafylokoky vyvolaná („septická") artritida). Termínem „pacient" jsou myšlena jak zvířata (např. kočky, psi, koně) tak lidé.

Zkrácený sTNFR produkt může být podáván lokálně, enterálně a parenterálně včetně (a nikoliv pouze) intravenózní, intramuskulární, intraarteriální, intratekální, do pouzdra (intracapsular), intraorbitální (intraorbital), intrakardiální (intracardiac), intradermální, intraperitoneální, transtracheální, subkutánní, subkutikulární (subcuticular), introartikulární (intra-articular), subkapsulární (subcapsular), do mozkové pleny (subarachnoid), intraspinální, intraventrikulární a intrasternální injekce a infuse. Zkrácený sTNFR produkt může být také podáván ústně nebo přes mukózní mebránu (through mucus membranes), tj. intranasálně, sublingválně, bukálně nebo rektálně; vždy se jedná o systémovou aplikaci.

Preferuje se, když jsou zkrácené sTNFR produkty aplikovány intraartikulární, subkutánní, intramuskulární nebo intravenózní injekcí. Zkrácené sTNFR produkty můžou být také podávány nepřetržitou infusí (například implantovaný nebo externí infusní zařízení měnící stálý nebo přerušovaný průtok) a tak se zajití plynule požadovaná úroveň zkrácených sTNFR v krvi po dobu podávání. Přednostně se toho dosahuje prostředky kontinuální infuse , např. minipumpou, jako je osmotická minipumpa. Při těchto způsobech je jistota, že množství léčiva je udržováno na požadované úrovni a že je možné odebrat vzorky krve a sledovat množství léčiva v krevním oběhu. Komerčně jsou dostupné různé pumpy od dodavatelů jako MiniMed Inc, Sylmar, CA (např. MT507) a AlzaCorp., Palo Alto, CA (např. osmotická pumpa Alzet, mdel 2MLI).

Také se uvažuje o jiných způsobech kontinuálního nebo téměř-kontinuálního dávkování. Například chemické úpravy můžou vést k formám s ustáleným uvolňováním proteinu, což také vede k jejich stálé přítomnosti v krevním oběhu v předvídaném množství založeném na určeném dávkovém režimu.

Způsoby použití zkrácených sTNFR produktů pro léčení onemocnění zprostředkovaných TNF (včetně zánětlivých stavů kloubů (např. osteoartritida, lupénková artritida a revmatická artritida) jsou vysvětleny v European Patent Appliction 567566, jehož obsah je zde uveden odkazem. Ve specifickém případě můžou být zkrácené sTNFR produkty (například při léčení revmatické artritidy a osteoartritidy) podávány intraartikulárně. V jiném specifickém případě (při léčení revmatoidní artritidy, zánětlivém onemocnění střev (inflammatory bowel disease), kachexii/anorexii nebo násobné skleróze) můžou být zkrácené sTNFR produkty aplikovány subkutánně nebo intramuskulárně. V dalším specifickém případě můžou být zkrácené sTNFR podávány intravenózně - při léčení poškození mozku jako výsledku traumatu, epilepsie, krvácení nebo mrtvice. Mezi preferované způsoby při léčení artritidy patří: (1) jednotlivé intraartikulární injekce zkrácených sTNFR produktů podávaných opakovaně podle potřeby pro prevenci nebo pro léčení vypuknuvší artritidy a (2) opakované subkutánní injekce zkrácených sTNFR produktů. Zahájení léčby při septickém šoku by mělo začít co možná nejdříve po otravě krve (septicemia) nebo když je diagnostikováno nebezpečí otravy krve. Léčení může například začít ihned po chirurgickém zákroku nebo nehodě nebo jakékoliv jiné události, se kterou je spojené riziko septického šoku. Mezi preferované způsoby léčení při syndromu dýchacích potíží u dospělých (adult respiratory distress syndrome) patří: (1) jednotlivá nebo vícenásobná intratracheální aplikace zkrácených sTNFR produktů a (2) bolus (bolus) nebo nepřetržitá intravenózní infuse zkrácených sTNFR produktů.

V jiném případě se uvažuje o buněčné terapii, např. implantaci buněk produkujících zkrácené sTNFR. Tento případ předkládaného vynálezu může zahrnovat implantaci buněk, které jsou schopné syntetizovat a vylučovat biologicky aktivní formy zkrácených sTNFR pacientovi. Takovýmito buňkami produkujícími zkrácené sTNFR můžou být buňky, které neprodukují normálně sTNFR, ale které byly modifikovány pro produkci zkrácených sTNFR, nebo to mohou být buňky, jejichž schopnost produkovat zkrácené sTNFR byla zvýšena transformací polynukleotidem vhodným pro expresi a sekreci zkráceného sTNFR. Aby se minimalizovala potenciální imunologická

reakce pacientů podáváním zkrácených sTNFR odlišných druhů, preferuje se, když jsou buňky ze stejného druhu jako pacient (například člověk), nebo když buňka může být opouzdřena materiálem, který poskytne zábranu proti rozpoznání imunitním systémem, nebo když můžou být buňky umístěny do imunologicky zvláštní anatomické polohy, jako například do varlat, oka nebo centrálního nervového systému.

Lidské nebo jiné buňky můžou být implantované do pacientů v biokompatibilních, semipermeabilních polymerních obalech (enclosures) nebo membránách, které uvolňují zkrácené sTNFR, ale zabrání destrukci buněk pacientovým imunitním systémem nebo jinými škodlivými faktory z okolních pletiv. Nebo se můžou vlastní buňky pacienta, transformované mimo organismus (*ex vivo*) aby produkovaly zkrácené sTNFR, implantovat přímo pacientovi bez takovýchto obalů. Metodologie obalení živých buněk membránou je odborníkům známá, takže se může provést příprava opouzdřených buněk a jejich implantace pacientům.

V jiném případě je možné předvídat *in vivo* genovou terapii, kdy se sekvence nukleové kyseliny kódující zkrácený sTNFR vnese přímo do pacienta. Například sekvence nukleové kyseliny, kódující zkrácený sTNFR, je vnesena do cílové buňky místní injekcí konstruktu nukleové kyseliny (s nebo bez vhodného vektora, například adeno-virového vektora). Dalšími vektory můžou být (mezi jinými) retroviry, adenoviry, herpes simplex virus vektor a papiloma virus vektor. Fyzického přenosu se může dosáhnout *in vivo* lokální injekcí konstruktu požadované nukleové kyseliny nebo jiného vhodného transportního vektora obsahujícího požadovanou sekvenci nukleových kyselin, liposomy zprostředkovaným přenosem, přímou injekcí (obnažená DNA), receptorem zprostředkovaným přenosem (komplex ligand-DNA) nebo bombardováním mikročásticemi (genové dělo).

Příklady technik buněčné a genové terapie jsou uvedeny v U.S. Patent No. 4 892 538; v U.S. Patent No. 5 011 472; v U.S. Patent No. 5 106 627; v DE 4219626, WO 94/20517 a 96/22793, jejichž popis je zde zahrnut odkazem.

Bez ohledu na způsob aplikace vyžaduje léčení TNF zprostředkovaných chorob dávkový nebo celkový dávkový (dose or total dose) režim zkrácených sTNFR účinný pro omezení či zmírnění symptomů

onemocnění. Ostatní faktory při určení vhodné dávky můžou zahrnovat onemocnění nebo stav který má být léčen nebo kterému se má předejít, vážnost onemocnění, způsob podávání, věk, pohlaví a lékařský stav pacienta. Další zpřesnění výpočtů nezbytných pro určení vhodné dávky pro léčení se rutinně provádí odborníky, zejména ve světle informací o dávkování „ad assays" zde obsažených. Dávka může být také určena použitím známých zkoušek pro určení dávek použitých ve spojení s vhodnými daty o odpovědi na dávky. Určitá dávka je kalkulována podle přibližné tělesné váhy nebo tělesného povrchu pacienta.

Frekvence dávkování závisí na farmakokinetických parametrech zkráceného sTNFR v použitém přípravku. Zkrácené sTNFR můžou být podány jedenkrát, nebo v případě vážných a dlouhotrvajících potíží podávány denně v méně frekventovaných dávkách nebo podávány s počátečním bolusem následovaným nepřetržitými nebo udržovacími dávkami. Při parenterálním podáváním může mít každá dávka například až 10 mg nebo spíše až 15 mg nebo ještě spíše až 20 mg. Při podání do kloubní dutiny (articular cavity) je farmaceutické složení přednostně aplikováno jako jedna injekce (například 3-10 ml injekční stříkačka obsahující dávku mezi 5 mg/ml a 10 mg/ml) zkrácených sTNFR rozpuštěných v roztoku isotonické, fosfátem pufrované soli. Přípravek může být aplikován do kloubní dutiny například jednou za 7 až 10 dní. Takovýmto způsobem se provádí aplikace například 4-5x, přičemž dávka se může (je-li to nezbytné) upravit.

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

Zkrácené sTNFR produkty (např. proteiny R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) a jakákoliv z doplňkových protizánětlivých látek (nebo více těchto látek) můžou být podávány samostatně nebo v kombinaci. Informaci o následujících sloučeninách je možné nalézt v The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Sixteen Editon, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, NJ (1992) a v Pharmaprojects, PJB Publications Ltd.

Nynější léčení TNF zprostředkovaných chorob (jak jsou definovány výše) včetně akutních a chronických zánětů jako jsou revmatická

onemocnění (např. Lymské onemocnění, dětská (revmatická) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatická artritida a stafylokoky indukovaná („septická") artritida) zahrnuje nejdříve použití léčiv pro ovlivnění bolesti a zánětu, klasifikovaných jako nesteroidní, protizánětlivá léčiva (NSAIDs - non-steroidal anti-inflammatory). Druhotné léčení zahrnuje kortikosteroidy, pomalu působící antirevmatická léčiva (SAARDs - slow acting antirheumatic drugs) nebo onemocnění upravující (DM - disease modifying) léčiva.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález zaměřený na použití zkráceného sTNFR produktu (např. proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) a jakéhokoliv (jednoho nebo více) NSAID pro léčení TNF zprostředkovaných onemocnění, jak jsou definovány výše, včetně akutních a chronických zánětů jako revmatických onemocnění (např. Lymské onemocnění, dětská (revmatická) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatická artritida a stafylokoky indukovaná („septická") artritida); a onemocnění vyvolané vztahem transplantát versus hostitel. NSAID vděčí svým protizánětlivým účinkům alespoň částečně za inhibici syntézy prostagaldinů (Goodman a Gilman v „The Pharmaceutical Basis of Therapeutics," MacMillan, 7th Edition (1985)). NSAID můžou 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 butyrové (7) oxikamy (oxicams) (8) pyrazoly (pyrazoles) (9) pyrazolony (pyrazolones)

Ve specifickém případě je předkládaný vynález orientovaný na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více deriváty kyseliny salicylové, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi. Mezi tyto deriváty kyseliny salicylové, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelné soli patří (názvy nejsou překládané): acetaminosalol, aloxiprin, aspirin, benorylate, bromosaligenin, calcium acetylsalicylate, choline magnesium trisalicylate diflusinal, etersalate, fendosal, gentisic acid, glycol salicylate, imidazole salicylate, lysine acetylsalicylate, mesalamine, morpholine salicylate, 1-naphthyl salicylate, olsalazine,

parsalmide, phenyl acetylsalicylate, phenyl salicylate, salacetamide, salicylamide O-acetic acid, salsalate a sulfasalazine. Strukturálně podobné deriváty kyseliny salicylové s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález orientovaný na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více deriváty kyseliny propionové, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi. Mezi tyto deriváty kyseliny propionové, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelné soli patří (názvy nejsou překládané): alminoprofen, benoxaprofen, bucloxic acid, carprofen, dexindoprofen, fenoprofen, flunoxaprofen, fluprofen, flurbiprofen, furcloprofen, ibuprofen, ibuprofen aluminum, ibuproxam, indoprofen, isoprofen, ketoprofen, loxoprofen, miroprofen, naproxen, oxaprozin, piketoprofen, pimeprofen, pirprofen, pranoprofen, protizinic acid, pyridoxiprofen, suprofen, tiaprofenic acid a tioxaprofen. Strukturálně podobné deriváty kyseliny propionové s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález orientovaný na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více deriváty kyseliny octové, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi. Mezi tyto deriváty kyseliny octové, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelné soli patří (názvy nejsou překládané): acemetacin; alclofenac, amfenac, bufexamac, cinmetacin, clopirac, delmetacin, díclofenac sodium, etodolac, felbinac, fenclofenac, fenclorac, fenclozic acid, fentiazac, furofenac, glucametacin, ibufenac, indomethacin, isofezolac, isoxepac, lonazolac, metiazinic acid, oxametacin, oxpinac, pimetacin, progiumetacín, sulindac, talmetacin, tiaramide, tivpinac, tolmetin, zidometacin a zomepirac. Strukturálně podobné deriváty kyseliny octové s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález orientovaný na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více deriváty kyseliny fenamové (fenamic acid), prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi. Mezi tyto deriváty kyseliny fenamové, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelné soli patří (názvy nejsou překládané): enfenamic acid, etofenamate, flufenamic acid, isonixin, meclofenamic acid, meclofenamate sodium, medofenamic acid, mefanamic acid, niflumic acid, talniflumate, terofenamate, tolfenamic acid and ufenamate. Strukturálně podobné deriváty kyseliny fenamové s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález orientovaný na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více deriváty kyseliny karboxylové, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi. Mezi tyto deriváty kyseliny karboxylové, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelné soli patří (názvy nejsou překládané): clidanac, diflunisal, flufenisal, inoridine, ketorolac a tinoridine. Strukturálně podobné deriváty kyseliny karboxylové s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález orientovaný na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více deriváty kyseliny máselné, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi. Mezi tyto deriváty kyseliny máselné, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelné soli patří (názvy nejsou překládané): bumadizon, butibufen, fenbufen a xenbucin. Strukturálně podobné deriváty kyseliny máselné s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález orientovaný na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou)

s jedním nebo více oxikamy (oxicams), prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi. Mezi oxikamy, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelné soli patří (názvy nejsou překládané): droxicam, enolicam, isoxicam, piroxicam, sudoxicam, tenoxicam a 4-hydroxyl-1,2-benzothiazine 1,1-dioxide 4-(N-phenyl) carboxamide. Strukturálně podobné oxikamy s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález orientovaný na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více pyrazoly (pyrazoles), prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi. Mezi pyrazoly, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelné soli patří (názvy nejsou překládané): difenamizole a epirizole. Strukturálně podobné pyrazoly s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález orientovaný na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více pyrazolony (pyrazolones), prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi. Mezi pyrazolony, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelné soli patří (názvy nejsou překládané): apazone, azapropazone, benzpiperylon, feprazone, mofebutazone, morazone, oxyphenbutazone, phenylbutazone, pipebuzone, propylphenazone, ramifenazone, suxibuzone a thiazolinobutazone. Strukturálně podobné pyrazolony s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález zaměřený na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více NSAID (názvy nejsou překládané): ε-acetamidocaproic acid, S-adenosylmethionine, 3-amino-4-hydroxybutyric acid, amixetrine, anitrazafen, antrafenine, bendazac, bendazac lysinate, benzydamine, beprozin, broperamole, bucolome, bufezolac, ciproquazone, cloximate, dazidamine, deboxamet, detomidine, difenpiramide, difenpyramide,

difisalamine, ditazol, emorfazone, fanetizole mesylate, fenflumizole, floctafenine, flumizole, flunixin, fluproquazone, fopirtoline, fosfosal, guaimesal, guaiazolene, isonixirn, lefetamine HC1, leflunomide, lofemizole, lotifazole, lysin clonixinate, meseclazone, nabumetone, nictindole, nimesulide, orgotein, orpanoxin, oxaceprolm, oxapadol, paranyline, perisoxal, perisoxal citrate, pifoxime, piproxen, pirazolac, pirfenidone, proquazone, proxazole, thielavin B, tiflamizole, timegadine, tolectin, tolpadol, tryptamid a látky označené firemními kódy jako 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, EK-506, GV3658, ITF182, KCNTEI6090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (4-benzoyl-1-indancarboxylic acid), TVX2706, U60257, UR2301 a WY41770. Strukturně podobné NSAID s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jako výše zmíněné NSAID jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález zaměřený na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více kortikosteroidy, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi pro léčbu TNF zprostředkovaných onemocnění (jak jsou definované výše), včetně akutního a chronického zánětu, jako jsou revmatická onemocnění (např. Lymská nemoc, dětská (revmatická) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatická artritida a stafylokoky vyvolaná („septická") artritida); a vícenásobná skleróza (multiple sclerosis). Kortikosteroidy, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelné soli zahrnují hydrokortison a sloučeniny, které jsou odvozené od hydrokortizonu, jako například (názvy nejsou překládané): 21-acetoxypregnenolone, alclomerasone, algestone, amcinonide, beclomethasone, betamethasone, betamethasone valerate, budesonide, chloroprednisone, clobetasol, clobetasol propionate, clobetasone, clobetasone butyrate, clocortolone, cloprednol, corticosterone, cortisone, cortivazol, deflazacon, desonide, desoximerasone, dexamethasone, diflorasone, diflucortolone, difluprednate, enoxolone, fluazacort, flucloronide,

flumethasone, flumethasone pivalate, flunisolide, flucinolone acetonide, fluocinonide, fluorocinolone acetonide, fluocortin butyl, fluocortolone, fluorocortolone hexanoate, díflucortolone valerate, fluorometholone, fluperolone acetate, fluprednidene acetate, fluprednisolone, flurandenolide, formocortal, halcinonide, halometasone, halopredone acetate, hydrocortamate, hydrocortisone, hydrocortisone acetate, hydrocortisone butyrate, hydrocortisone phosphate, hydrocortisone 21-sodium succinate, hydrocortisone tebutate, mazipredone, medrysone, meprednisone, methylprednicolone, mometasone furoate, paramethasone, prednicarbate, prednisolone, prednisolone 21-diedryaminoacetate, prednisolone sodium phosphate, prednisolone sodium succinate, prednisolone sodium 21-m-sulfobenzoate, prednisolone sodium 21-stearoglycolate, prednisolone tebutate, prednisolone 21-trimethylacetate, prednisone, prednival, prednylidene, prednylidene 21-diethylaminoacetate, tixocortol, triamcinolone, triamcinolone acetonide, triamcinolone benetonide a triamcinolone hexacetonide. Strukturálně podobné kortikosteroidy s podobnými analgetickými a protizánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález zaměřený na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více pomalu působícími antirevmatickými léky (SAARD) nebo nemoc ovlivňujícími antirevmatickými léky (DMARDS), prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi pro léčbu TNF zprostředkovaných onemocnění (jak jsou definované výše), včetně akutního a chronického zánětu jako jsou revmatická onemocnění (např. Lymská nemoc, dětská (revmatická) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatická artritida a stafylokoky vyvolaná („septická") artritida); a vícenásobná skleróza (multiple sclerosis). SAARD a DMARDS, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelné soli zahrnují (názvy nejsou překládané): allocupreide sodium, auranof in, aurothioglucose, aurothioglycanide, azathioprine, brequinar sodium, bucillamine, calcium 3-aurothio-2-propanol-1-sulfonate, chlorambucil, chloroquine, clobuzarit, cuproxoline, cyclophosphamide, cyclosporin, dapsone, 15-deoxyspergualin, diacerein, glucosamine, soli zlata

(např. cycloquine gold salt, gold sodium thiomalate, gold sodium thiosulfate), hydroxychloroquine, hydroxyurea, kebuzone, levamisole, lobenzarit, melittin, 6-mercaptopurine, methotrexate, mizoribine, mycophenolate mofetil, myoral, nitrogen mustard, D-penicillamine, pyridinol imidazoles jako SKNF86002 a SB203580, rapamycin, thiols, thymopoietin a vincristine. Strukturálně podobné SAARD nebo DMARD s podobnými analgetickými a protizánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález zaměřený na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více COX2 inhibitory, prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi pro léčbu TNF zprostředkovaných onemocnění (jak jsou definované výše), včetně akutního a chronického zánětu. Příklad inhibitorů COX2, prekursoru jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelných solí zahrnuje celocoxib (název není překládaný). Strukturálně podobné COX2 inhibitory s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález zaměřený na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více bakteriostatiky (antimicrobials), prekursory jejich esterů nebo farmaceuticky akceptovatelnými solemi pro léčbu TNF zprostředkovaných onemocnění (jak jsou definované výše), včetně akutního a chronického zánětu. Bakteriostatika zahrnují například (názvy nejsou překládané): ampicillin, amoxycillin, aureomicin, hacitracin, ceftazidime, ceftriaxone, cefotaxime, cephachlor, cephalexin, cephradine, ciprofloxacin, clavulanic acid, cloxacillin, dicloxacillan, erythromycin, flucloxacillan, gentamicin, gramicidin, methicillan, neomycin, oxacillan, penicillin a vancomycin. Strukturálně podobná bakteriostatika s podobnými analgetickými a proti zánětlivými vlastnostmi jsou také zahrnuté v této skupině.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález zaměřený na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jednou nebo více následujících sloučenin pro léčení TNF zprostředkovaných

onemocnění (jak jsou definovány výše), včetně akutního a chronického zánětu (některé názvy nejsou překládané): faktor stimulující kolonie granulocytů (granulocyte colony stimulating factor); thalidone; BN 50730; tenidap; E 5531; tiapafant PCA 4248; nimesulide; panavir; rolipram; RP 73401; peptide T; MDL 201 449A; (1R, 3S)-Cis-1-[9-(2,6-diaminopurinyl)]-3-hydroxy-4-cyclopentene hydrochloride; (1R, 3R)-trans-1-[9-(2,6-diamino)purine]-3-acetoxycyclopentane; (1R,3R)-trans-1-[9-adenyl)-3-azidocyclopentane hydrochloride a (1R,3R)-trans-1-(6-hydroxy-purin-9-yl)-3-azidocyclopentane.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález zaměřený na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více dalšími inhibitory TNF, pro léčbu TNF zprostředkovaných onemocnění (jak jsou definované výše), včetně akutního a chronického zánětu. Inhibitory TNF zahrnují sloučeniny a proteiny, které blokují syntézu *in vivo* nebo extracelulární uvolňování TNF, včetně následujících sloučenin.

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

Ve specifickém případě je předkládaný vynález zaměřený na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s rozpustným rekombinantním lidským Fas antigenem nebo s jeho rekombinantními verzemi (WO 96/20206 a Mountz et al., J. Immunology, 155:4829-4837 a EP 510 691), jejichž popis je zde zahrnut odkazem. WO 96/20206 popisuje sekretovaný lidský Fas Antigen (přirozený a rekombinantní, včetně Ig fůzního proteinu), metody pro isolaci genů

zodpovědných za kódování rozpustného rekombinantního lidského Fas antigenu, metody pro klonování genu ve vhodném vektoru a vhodných typech buněk a metody pro produkci inhibitorů expresí genu. EP 510 691 popisuje DNA kódující lidský Fas antigen včetně rozpustného Fas antigenu, vektory exprimující dané DNA a transformanty transfekované vektorem. Při parenterální administraci se dávky fůzního proteinu Fas antigenu pohybují mezi 1 ug/kg až 100 ug/kg.

Ve specifickém případě je předkládaný vynález orientovaný na použití zkrácených sTNFR produktů (například proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s jedním nebo více inhibitory interleukinu-1 pro léčení TNF zprostředkovaných onemocnění (jak jsou definovány výše) včetně akutního a chronického zánětu jako jsou revmatická onemocnění (např. Lymská nemoc, dětská (revmatická) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatická artritida a stafylokoky vyvolaná („septická") artritida); poškození mozku jako následek traumatu, epilepsie, krvácení nebo mrtvice; a vícenásobná skleróza (multiple sclerosis). Třídy interleukin-1 inhibitorů zahrnují antagonisty receptoru interleukinu 1 (jakákoliv sloučenina specificky zabraňující aktivaci buněčných receptorů IL-1), jako IL-1ra, jak je popsáno dále; monoklonální protilátku proti anti-IL-1 (např. EP 623674, jehož popis je zde zahrnut odkazem); IL-1 vazebné proteiny jako např. rozpustné IL-1 receptory (např. U.S.P. 5 492 888, U.S.P. 5 488 032, U.S.P. 5 464 937, U.S.P. 5 319 071 a U.S.P. 5 180 812, jejichž popis je zde zahrnut odkazem); anti-IL-1 monoklonální protiátky (např. WO 9501997, WO 9402627, WO9006371, U.S.P. 4935343, EP 364778, EP 267611 a EP 220063, jejichž popis je zde zahrnut odkazem); doplňkové proteiny IL-1 receptoru, 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 přirozený inhibitor intereukinu-1. Preferovaní antagonisté receptorů spolu s metodou jejich přípravy a použití jsou popsané v U.S. Patent No. 5 075 222 (zde odkazovaný jako '222 patent); WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; WO 92/16221;

WO93/21946; PCT International Application No. US97/02131, který uvádí farmaceutické složení zahrnující (a) účinné množství kontrolovaně uvolňovaného polymeru (např. kyseliny hyaluronové) 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 glykosilované a neglykosilované antagonisty IL-1 receptoru.

V U.S. Patent No. 5 075 222, (Hannum et al. nazvaném „Interleukin-1 Inhibitors") jsou konkrétně uvedené a popsané tři preferované formy IL-1ra (IL-1raα, IL-1raβ a IL-1rax), z nichž každý je odvozen ze stejné DNA kódující sekvence. Tento U.S. Patent (uváděný zde jako '222 patent) je zde konkrétně uvedený odkazem. Všechny tři interleukin-1 inhibitory mají podobné funkční a imunologické aktivity. V '222 patentu jsou také uvedeny metody pro produkci IL-1 inhibitorů, zejména IL-1ras. Jedna uvedená metoda zahrnuje izolaci inhibitorů z lidských monocytů (kde jsou přirozeně produkovány). Druhá uvedená metoda zahrnuje izolaci genu odpovědného za kódování IL-1ras, klonování genu ve vhodných typech vektorů a buněk, expresi genu vedoucí k produkci IL-1ras a získání IL-1ras. Preferovanou metodou tohoto vynálezu je druhá metoda, která je obecným příkladem rekombinantních DNA metod. Ve specifickém případě 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 (muteins) takovýchto inhibitorů, kde je cysteinový zbytek nahrazen za aminokyselinu na jedné nebo více pozicích aminokyselinové sekvence přirozeně se vyskytujícího inhibitoru. Takovéto muteiny můžou potom selektivně místně reagovat s funkčními jednotkami polyetylen glykolu (PEG) nebo jinými polyetery obsahujícími sulfhydryl (sulfhydryl-containing polyethers) a tak vzniknou IL-1ra PEG druhy. PCT Publication No. WO 92/16221 uvádí řadu modifikovaných IL-1ra druhů a metody přípravy těchto PEGem modifikovaných inhibitorů.

Další třída interleukin-1 inhibitorů zahrnuje sloučeniny schopné specificky zabránit aktivaci buněčných rexeptorů IL-1. Mezi takovéto sloučeniny patří IL-1 vazebné proteiny, například rozpustné receptory a monoklonální protilátky. Také sem patří monoklonální protilátky vůči 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 ovlivňují transkripci genu IL-1 nebo úpravu nehotového pre-proteinu IL-1.

Výše uvedené příklady nevylučují předem jiné léčení souběžně s těmito protizánětlivými sloučeninami, které jsou známé odborníkům a které by mohly být získány odborníky s použitím směrnic uvedených v tomto popisu.

Pro snadnější podávání a rovnoměrnost dávkování je zvláště výhodné vyrábět (to formulate) směsi doplňkových protizánětlivých sloučenin ve formě dávkových jednotek (dosage unit). „Forma dávkové jednotky" se zde vztahuje k fyzicky oddělené jednotce vhodné pro jednotkové dávkování léčených savčích subjektů, přičemž každá jednotka obsahuje předem určené množství doplňkových protizánětlivých sloučenin určených tak, aby se dosáhlo (ve spojení s požadovaným farmaceutickým nosičem) požadovaného terapeutického účinku. „Farmaceuticky akceptovatelný nosič" zahrnuje všechna rozpouštědela, disperzní média, obalová, antimikrobiální a protihoubová činidla, isotonické a absorpci zpomalující činidla atp., které jsou kompatibilní s aktivními látkami, se způsobem administrace a dalšími složkami dané směsi a které nejsou škodlivé příjemci. Použití takovýchto agens a médií je odborníkům známé (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 směsi se také můžou včlenit dodatečné aktivní složky.

Pro orální terapeutické podávání můžou být dodatečné protizánětlivé sloučeniny zahrnuté s excipienty (inertními nosiči) a použité ve formě tablet k polknutí, bukálních (ústních) tablet, pastilek, kapsulí, suspenzí, syrupů, oplatek a podobně, nebo můžou být zainkorporovány přímo do potravy. Tablety, pastilky, pilulky, kapsle a další formy můžou také obsahovat: pojivo (binder), jako např. 'žvýkačku' z kozince, akátu (gum tragacants, acacia), obilní škrob nebo želatinu; inertní nosiče (excipients) jako například fosforečnan vápenatý (dicalcium phosphate); rozmělňující látky jako obilný škrob, kyselinu alginovou (alginic acid) a podobně; lubrikant jako je magnesium stearát; sladidlo, jako je sacharóza, laktóza nebo

sacharin; příchuťové látky jako peprmint, libavkový olej, třešňovou nebo pomerančovou příchuť. Je-li dávkovací jednotkou kapsule, může obsahovat kromě výše zmíněných látek tekutý nosič. Může se použít i řada dalších materiálů, které modifikují obal nebo fyzickou formu dávkovací jednotky. Například tablety, pilulky nebo kapsule můžou být potažené šelakem, cukrem nebo oběma látkami. Všechny materiály použité pro přípravu jakékoliv dávkovací jednotky musí být pochopitelně farmaceuticky čisté a v použitých množstvích netoxické. Navíc můžou být do postupně uvolňovaných přípravků a složení přidány doplňkové protizánětlivé sloučeniny. Množství těchto doplňkových protizánětlivých sloučenin v dané terapeuticky užitečné směsi je volené tak, aby se dosáhlo vhodné dávky.

Pro parenterální terapeutické podávání můžou všechny protizánětlivé sloučeniny obsahovat sterilní roztok vhodný pro injekce. Sterilní roztok vhodný pro injekce může být připraven sloučením požadovaného množství doplňkové protizánětlivé látky ve vhodném, farmaceuticky přijatelném nosiči s různými dalšími přísadami vyjmenovanými níže (požadovanými) a následnou sterilizací filtrací. Všechny disperze můžou být připraveny včleněním protizánětlivé sloučeniny do sterilního nosiče, který obsahuje základní disperzní médium a další požadované ingredience z těch, které jsou vyjmenované výše.Všechny sterilní roztoky vhodné pro injekce můžou být připravené sloučením prášku doplňkové protizánětlivé sloučeniny a (případně) jakékoliv další požadované ingredience z předchozí přípravy jejich sterilního roztoku. Prášek se připraví jakoukoliv vhodnou technikou (např. vakuové sušení a lyofylizování).

Specifická dávka doplňkové protizánětlivé látky se vypočítá podle přibližné tělesné váhy nebo tělesného povrchu pacienta. Při určení vhodné dávky se můžou se zahrnout i další faktory - jedná-li se o akutní nebo chronické zánětlivé onemocnění nebo jestli se jedná o léčbu nebo o prevenci, vážnost onemocnění, způsob aplikace, věk, pohlaví a zdravotní stav pacienta. Odborníci snadno provedou přesnější výpočty nezbytné pro vhodné dávkování při léčbě, při zohlednění všech výše uvedených formulací. Dávkování se také může určit pomocí známých testů pro určení dávky použitých ve spojení s příslušnými údaji o reakci na dávky.

Je například záměrem tohoto vynálezu, že dávky doplňkových protizánětlivých sloučenin vybraných pro léčení určitého akutního nebo chronického onemocnění, jako například revmatických chorob (např. Lymské onemocnění, dětská (revmatoidní) artritida, osteoartritida a stafylokoky indukovaná („septická") artritida) můžou být pro dosažení terapeutického účinky různorodé. Když má jedna z doplňkových protizánětlivých látek vedlejší účinky, může se podávat pacientům během období alternativní léčby kombinační terapie. Například dlouhodobé léčení metotrexátem (chronic methotrexate treatment) je spojené s toxicitou gastrointestinální, jaterní, plicní a toxicitou kostní dřeně (Sandoval et al., (1995) British Jouranal of Rheumatology, 34:49-56, jehož popis je zde zahrnut odkazem.

Testy pro monitorování zlepšení onemocnění můžou zahrnovat specifické testy zaměřené například na určení systémové odpovědi na zánět, což zahrnuje rychlost sedimentace erytrocytů (ESR - erythrocyte sedimentation rate), reaktatnty akutní fáze (APR - acute phase reactant). Pozoruje se oteklina postižené částí těla. Také se může pozorovat zlepšení ztuhlosti a stisku (stiffness and grip) (je-li to možné) a snížení bolesti. Jestliže je pacientův stav stabilní, je mu stejná dávka podávána týdně a je také týdně hodnocen jeho stav. Je-li pacientův stav stabilní, může se v léčbě pokračovat. Po šesti měsících léčby se zjistí radiologickým snímáním (například rentgenem) anatomické změny na kostře.

Na konci každého období je pacient znova hodnocen. Porovnání radiologického zhodnocení před a po léčení, hodnoty ESR a APR ukazují na účinnost léčení. Podle účinnosti léčení a pacientova stavu může být dávkování během doby léčení zvýšeno nebo uchováno na stejné úrovni.

Předkládaný vynález je přednostně zaměřen na metodu (volitelně s jednou z následujících kombinací) pro léčení nebo prevenci akutních nebo chronických zánětlivých onemocnění a stavů (jak jsou definovány výše), jako revmatických onemocnění (např. lymská nemoc, dětská (revmatoidní) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatoidní artritida a stafylokoky indukovaná („septická") artritida): zkrácený sTNFR produkt (např. protein R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) a metotrexát (methotrexate); zkrácený sTNFR produkt (např. protein

R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) methotrexát a inhibitor IL-1, přednostně IL-1ra; zkrácený sTNFR produkt (např. protein R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) a jedna nebo více následujících látek - methotrexát, imunosupresivum (např. cyklosporin), ciproflaxin, Fas antigen a inhibitor IL-1, přednostně IL-1ra; zkrácený sTNFR produkt (např. protein R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) a methotrexát a imunosupresivum (např. cyklosporin); zkrácený sTNFR produkt (např. protein R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) methotrexát a ciprofloxacin; zkrácený sTNFR produkt (např. protein R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2), methotrexát a inhibitor IL-1, přednostně IL-1ra; zkrácený sTNFR produkt (např. protein R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) a jedna nebo více následujících látek - methotrexát, sulfasazin (sulphasazine) a hydroxychlorchinon (hydroxychloroquine); zkrácený sTNFR produkt (např. protein R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) methotrexát a hydroxychlorchinon (hydroxychloroquine); zkrácený sTNFR produkt (např. protein R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2) methotrexát a sulfasazin.

Ve specifickém preferovaném případě metoda zahrnuje podávání (např. do kloubu (intraarticular), subkutánně nebo intramuskulárně) zkrácených sTNFR produktů (např. proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2, volitelně ve formě s postupným uvolňováním (např. hyaluronan)) nebo v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s metotrexátem a/nebo inhibitorem IL-1 (např. IL-1ra) a/nebo rozpustným lidským rekombinantním Fas antigenem pro léčbu revmatických onemocnění, jak je uvedeno výše (např. Lymská nemoc, dětská (revmatická) artritida, osteoartritida, lupénková artritida, revmatická artritida a stafylokoky vyvolaná („septická") artritida) a symptomů s nimi spojených.

Ve specifickém preferovaném případě metoda zahrnuje podávání (např. intravenózní nebo intravertikulární) zkrácených sTNFR produktů (např. proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2, volitelně ve formě s postupným uvolňováním (např. hyaluronan)) a volitelně v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s aktivátorem pletivového plasminogenu a/nebo IL-1 inhibitorem (např. IL-1ra) pro léčbu poškození mozku, jako výsledku traumatu, epilepsie, krvácení nebo mrtvice, které všechny vedou k neurodegeneraci.

Ve specifickém preferovaném případě metoda zahrnuje podávání (např. subkutánní nebo intramuskulární) zkrácených sTNFR produktů (např. proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2, volitelně ve formě s postupným

uvolňováním (např. hyaluronan)) nebo v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s (jednou nebo více látkami) - kortikosteroidem, cyklosporinem, FK-506, nebo interferonem (např. alfa interferon, beta interferon, gama interferon nebo konsensuální (consensus) interferon) a/nebo IL-1ra pro léčbu násobné sklerózy (multiple sclerosois).

Ve specifickém preferovaném případě metoda zahrnuje podávání (např. subkutánní nebo intramuskulární) zkrácených sTNFR produktů (např. proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2, volitelně ve formě s postupným uvolňováním (např. hyaluronan)) nebo v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s G-CSF a/nebo IL-1ra pro léčbu zánětlivého onemocnění střev (inflammatory bowel disease).

Ve specifickém preferovaném případě metoda zahrnuje podávání (např. subkutánní nebo intramuskulární) zkrácených sTNFR produktů (např. proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2, volitelně ve formě s postupným uvolňováním (např. hyaluronan)) nebo v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s leptinem, Marinolem (Marinol™) nebo Megacem (Megace™) pro léčbu kachexie/anorexie.

Ve specifickém preferovaném případě metoda zahrnuje podávání (např. subkutánní, intraventrikulární nebo intratekální) zkrácených sTNFR produktů (např. proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2, volitelně ve formě s postupným uvolňováním (např. hyaluronan)) nebo v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s NSAID (např. indometacinem (indomethacin)) a/nebo inhibitorem IL-1 (např. IL-1ra) pro léčbu Alzheimrovi choroby.

Ve specifickém preferovaném případě metoda zahrnuje podávání (např. subkutánní, intraventrikulární nebo intratekální) zkrácených sTNFR produktů (např. proteinu R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2, volitelně ve formě s postupným uvolňováním (např. hyaluronan)) nebo v kombinaci (před léčbou, po léčbě nebo současně s léčbou) s rozpustným rekombinantním lidským Fas antigenem pro léčbu rakoviny (např. lukémií); dětské dibetes mellitus typu 1; odmítnutí štěpu hostitelem; hepatitida; ischemického/reperfusního (reperfusion) poškození, včetně mozkové ischemie (poškození mozku jako následek traumatu, epilepsie, krvácení nebo mrtvice, které můžou všechny vést k neurodegeneraci); zánětlivá neuro onemocnění; revmatická onemocnění jak jsou vymezena výše (např. Lymská nemoc, dětská (revmatická) artritida,

osteoartritida, lupénková artritida, revmatická artritida a stafylokoky vyvolaná („septická") artritida a transplantace pletiv).

Po zvážení dále uvedených ilustrativních příkladů budou zřejmé další stránky a výhody tohoto vynálezu.

Přehled obrázků na výkresech

Řada aspektů a výhod předkládaného vynálezu bude zřejmá po shlédnutí obrázků, kde:

Obr. 1 zobrazuje sekvenci nukleových kyselin (SEQ ID NO:1) kódující Asp^{1}-Asn^{161} - rekombinantní lidský sTNFR-I plné délky. Zobrazena je také sekvence aminokyselin Asp^{1}-Asn^{161} (SEQ ID NO:2).

Obr. 2 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:3) kódující NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{30}]-FC-COOH (také uváděný jako sTNFR-I 2.6D/C105). Zobrazena je také sekvence aminokyselin NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{30}]-FC-COOH (SEQ ID NO:4).

Obr. 3 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:5) kódující NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (uváděný také jako sTNFR-I 2.6D/C106). Zobrazena je také sekvence aminokyselin NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (SEQ ID NO:6).

Obr. 4 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:7) kódující NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FN-COOH (uváděný také jako sTNFR-I 2.6D/N105). Zobrazena je také sekvence aminokyselin NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FN-COOH (SEQ ID NO:8).

Obr. 5 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:11) kódující NH_2-MYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (uváděný také jako sTNFR-I 2.3D/d8). Zobrazena je také sekvence aminokyselin NH_2-MYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (SEQ ID NO:12).

Obr. 6 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:9) kódující NH_2-M-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (uváděný také jako sTNFR-I

2.3D/d18). Zobrazena je také sekvence aminokyselin NH_2-M-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (SEQ ID NO:10).

Obr. 7 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny (SEQ ID NO:13) kódující NH_2-MSIS-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (uváděný také jako sTNFR-I 2.3D/d15). Zobrazena je také sekvence aminokyselin NH_2-MSIS-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FNCSL-COOH (SEQ ID NO:14).

Obr. 8 zobrazuje sekvenci nukleových kyselin (SEQ ID NO:34) kódující Leu^1-Thr^{179} hotového rekombinantního lidského sTNFR-II. Zobrazena je také sekvence aminokyselin Leu^1-Thr^{179} (SEQ ID NO:35).

Obr. 9 znázorňuje rozsah otoku (amount of swelling) indukovaného u streptokokální buněčnou stěnou indukovaného reaktivačního (reactivation) modelu podle popisu v Příklady II.

Obr. 10 zobrazuje plasmové profily sTNFR-I 4D/C105db u zdravých paviánů po dvou minutách intravenózní infuse 0,2 mg/kg podle popisu v Příklady III.

Obr. 11 zobrazuje plasmové profily sTNFR-I 3D/C105db u zdravých paviánů po dvou minutách intravenózní infuse 0,2 mg/kg podle popisu v Příklady III.

Obr. 12 zobrazuje plasmové profily sTNFR-I 2.6D/C105db u zdravých paviánů po dvou minutách intravenózní infuse 0,2 mg/kg podle popisu v Příklady III.

Obr. 13 zobrazuje vztah mezi dávkou a odbouráváním různých dimerových sTNFR-I konstruktů podle popisu v Příklady III.

Příklady provedení vynálezu

Standardní metody tvořící základ pracovních postupů popsaných v následujících příkladech , anebo jiné vhodné pracovní postupy jsou popsány ve známých molekulárně biologických příručkách, např.

Sambrook et al. (1989), viz výše, a Ausubel et al. (1990), viz výše. Pro větší názornost je užita zkratka „ mL" pro mililitr a „L" pro litr.

Příklad I

Následující příklad popisuje produkci různých forem zkráceného rekombinantního rozpustného TNFR-I: NH_2 -MDSVCPQGKYIHPQNNSIC- [Cys^{19}-Cys^{103}] - FC-COOH (sTNFR-I 2,6D/C105); NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}] - FNCSL- COOH (sTNFR-I 2,6D/C106) ; NH_2-MDSVCPQGKYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}] - FN- COOH (sTNFR-I 2,6D/N105) ; NH_2-MYIHPQNNSIC-[Cys^{19}-Cys^{103}] - FNCSL- COOH (sTNFR-I 2,3D/d8) ; NH_2-M-[Cys^{19}-Cys^{103}] - FNCSL-COOH (sTNFR-I 2,3D/d18) a NH_2-MSIS-[Cys^{19}-Cys^{103}] - FNCSL- COOH (sTNFR-I 2,3D/d15).

A. Příprava DNA:

1. sTNFR-I 2,6D/C106

Klonovaná DNA odvozená z klonu lambda - gt107ctnfbp (EP 422339) slouží jako matrice v PCR amplifikační reakci za použití 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 *NdeI* a *HindIII* místa a hybridizují s 5´ koncem (OLIGO #1) a 3´ koncem (OLIGO #2) zkráceného genu. PCR amplifikační reakce probíhá v 25 cyklech; každý cyklus se skládá ze 30 sekund při 94°C (denaturace), 15 sekund při 55 °C (hybridizace primerů) a 1 minuty při 72 °C (polymerace) [termocykler typ 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)]. PCR produkt je přečištěn pomocí QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) dle návodu výrobce. Přečištěný PCR produkt je štěpen enzymy *NdeI* a *HindIII* a poté izolován z gelu pomocí QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) dle návodu výrobce. PCR produkt izolovaný z gelu je

vložen do vektoru pAMG11 (WO 95/26746) a vnesen transformací do buněk *E. coli* FM 15 (ATCC 55765).

2.sTNFR-I 2,6D/C105

PCR amplifikace sTNFR-I 2,6D/C105 je provedena s použitím plazmidové DNA sTNFR-I 2,6D/C106 jako matrice a 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) následovanou stop kodonem. Primery jsou navrženy tak, aby úplná amplifikace matrice zajistila nové *BamHI* místo vhodné pro ligaci. PCR amplifikační reakce probíhá v 35 cyklech; prvních 10 cyklů se skládá z 10 sekund při 92°C (denaturace), 30 sekund při 55 °C (hybridizace primerů) a 4 minut při 68 °C (polymerace); následuje 25 cyklů složených z 10 sekund při 92°C (denaturace), 30 sekund při 55 °C (hybridizace primerů) a 4 minut + 20 sekund při 68 °C (polymerace) [termocykler typ 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)]. PCR produkt je přečištěn z gelu pomocí QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) dle návodu výrobce, štěpen enzymem *BamHI*, extrahován směsí fenol/chloroform a přesrážen etanolem. Je resuspendován, vložen do vektoru pAMG11 a vnesen transformací do buněk *E. coli* FM 15.

3.sTNFR-I 2,6D/N105

PCR amplifikace sTNFR-I 2,6D/N105 je provedena s použitím plazmidové DNA sTNFR-I 2,6D/C106 jako matrice a následujících PCR primerů:

5′ OLIGO #5: (SEQ ID NO: 72)
5′-GGTTAGCCATATGGACAGCGTTTGCCCCCAA-3′
3′ OLIGO #6: (SEQ ID NO: 73)

5´-CGCGGATCCCTATTAATTGAAGCACTGGAAAAGG-3´

OLIGO #5 a OLIGO #6 obsahují *NdeI* a *BamHI* místa a hybridizují s 5´ koncem (OLIGO #5) a 3´ koncem (OLIGO #6) zkráceného genu. PCR amplifikační reakce probíhá ve 30 cyklech; každý cyklus se skládá ze 45 sekund při 95°C (denaturace), jedné minuty při 65 °C (hybridizace primerů) a dvou minut při 72 °C (polymerace) [termocykler typ 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)].

PCR produkt je přečištěn pomocí Wizard™ Clean-Up Systém (Promega, Madison, WI) dle návodu výrobce. Přečištěný PCR produkt je štěpen enzymy *NdeI* a *BamHI*, extrahován směsí fenol/chloroform a přesrážen etanolem. Poté je resuspendován, vložen do vektoru pAMG11 a vnesen transformací do buněk *E. coli* FM15.

Pracovnící s běžnou znalostí molekulárních technik si jsou vědomi, že na základě popisu tohoto vynálezu mohou lehce být ke zdařilé expresi v hostitelské buňce (např. *E. coli* a jiné bakterie) použity nebo upraveny rozmanité genetické materiály a metody.

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

PCR amplifikace sTNFR-I 2,3D/d18; sTNFR-I 2,3D/d8 a sTNFR-I 2,3D/d15 je pokaždé provedena s použitím plazmidové DNA 2,6D/C106 jako matrice za pomoci následujících PCR primerů:

sTNFR-I 2,3D/d8 PCR primery:

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

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

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

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

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

Každý z primerů OLIGO #7, OLIGO #9 a OLIGO #11 obsahuje *NdeI* místo a každý z primerů OLIGO #á, OLIGO #10 a OLIGO #12 obsahuje *HindII* místo. PCR amplifikační reakce probíhá ve 25 cyklech; každý cyklus se skládá ze 45 sekund při 95°C (denaturace), jedné minuty při 65 °C (hybridizace primerů) a dvou minut při 72 °C (polymerace) [termocykler typ 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)]. PCR produkty jsou přečištěny pomocí Wizard™ Clean-Up Systém (Promega, Madison, WI) dle návodu výrobce. Přečištěné PCR produkty jsou štěpeny enzymy *NdeI* a *BamHI*, extrahovány směsí fenol/chloroform a přesráženy etanolem. Poté jsou resuspendovány, vloženy do vektoru pAMG11 a vneseny transformací do buněk *E. coli* FM15.

B. Produkce v *E. coli*:

Nejprve je pomnoženo čerstvé inokulum 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 sTNFR-I 2,3D/d15. Celý obsah zmražené glycerolové konzervy v zásobní ampuli (asi 1,5 mL) je přenesen do 2 L nádoby, která obsahuje 500 mL půdy dle Lurii (LB). Bakteriální kultura je inkubována při teplotě 37°C v rotační třepačce při 350 ot/min. Hustota kultury je stanovována měřením absorbance při 660 nm (OD_{660}). Inokulum je kultivováno až do hustoty > 2,0 OD_{660}. V tomto okamžiku je 125 mL kultury asepticky přeneseno do produkčního fermentoru o objemu 15 L, který obsahuje 10 L sterilního média.

Produkční médium a podmínky fermentace pro vlastní produkci jsou popsány jako komplexní médium a podmínky fermentace Sniffem (1993) v doktorandské práci nazvané „Chemicky definované médium pro nadprodukci rekombinantních proteinů v *E. coli*", Colorado State

University. Tato práce doporučuje užití komplexního média obsahujícího hydrolyzát kaseinu, solí, glycerol a prostředek proti pěnění (antifoam). Tyto složky média jsou sterilizovány ve fermentoru. Po ochlazení fermentoru na teplotu nižší než 40 °C jsou přidány stopové minerály a thiamin hydrochlorid, sterilizované filtrací.

Po ustálení teploty média na 37 °C je toto médium naočkováno inokulem. Růst kultury je sledován měřením OD_{660}. pH kultury je udržováno na hodnotě 6,0 automatickým přidáváním 5 M hydroxidu sodného a 5 M kyseliny chlorovodíkové. Když dosáhne OD_{660} hodnoty 9,5 až 10,5, je kultura indukována aseptickým přidáním sterilního izopropyl β-D thiogalaktopyranozidu (IPTG) do konečné koncentrace 0,50 mM. Kultura je sklizena po zastavení růstu.

Kultivační médium a podmínky růstu jsou užity v podobě popsané Sniffem (1993), viz výše, s následujícími vyjímkami: do média je přidán síran amonný (2,0 g/L) a L-cystein hydrochlorid monohydrát (1,0 g/L), tetracyklin hydrochlorid je vynechán, pH je udržováno na hodnotě 6,0 pomocí hydroxidu sodného a kyseliny chlorovodíkové namísto hodnoty 7,0 udržované pouze hydroxidem sodným, teplota kultivace je zvýšena na 37 °C, koncentrace induktoru byla zvýšena z 0,15 mM na 0,50 mM IPTG, doba sklizně je určena okamžikem zastavení růstu namísto dobou, která uplynula od indukce.

Po ukončení fermentace jsou bakteriální buňky sklizeny centrifugací v 500 mL kyvetách. Jsou centrifugovány při 10 000 ot/min 30 minut. Kašovitý bakteriální pelet je naředěn na hustotu 15% pevných částic v lytickém pufru složeném z 50 mM Tris a 5 mM EDTA, pH 8,0. Resuspendované buňky jsou poté lyzovány trojnásobným protlačením suspenze homogenizátorem (APV Gaulin, Inc., Everett, MA) při tlaku 57 MPa (8000 liber na čtvereční palec). Centrifugací homogenátu při 10 000 ot/min 30 minut jsou získána inkluzní tělíska (IT). Inkluzní tělíska jsou promyta v lytickém pufru a centrifugována potřetí při 10 000 ot/min 30 minut. Po resuspendování IT v deionizované vodě (v poměru 1:1) jsou naposledy centrifugována při 10 000 ot/min 30 minut. Tento krok představuje druhé promytí. Promytá inkluzní tělíska každého proteinu jsou připravena k rozpouštění, renaturaci a purifikaci. Každá várka dává výtěžek asi 200-250 g IT.

Zkrácený sTNFR-I může být připraven fermentací podle jiného postupu:

Nejprve je pomnoženo čerstvé inokulum vybraného rekombinantního kmene *E.coli* nesoucího požadovaný konstrukt sTNFR-I 2,6D/N105 nebo sTNFR-I 2,6D/C106. Celý obsah zmražené glycerolové konzervy v zásobní ampuli (asi 1,5 mL) je přenesen do 2 L nádoby, která obsahuje 500 mL BBL kvasničného extraktu (10 g/L), pH 7,0. Kultura je inkubována při teplotě 33°C v rotační třepačce při 300 ot/min. Hustota kultury je stanovována měřením absorbance při 600 nm (OD_{600}). Inokulum je kultivováno až do hustoty > 2,0 OD_{600}. V tomto okamžiku je 80 mL kultury asepticky přeneseno do produkčního fermentoru o objemu 15 L, který obsahuje 7 L sterilního růstového média.

Produkční fermentace využívá postup kontinuálního doplňování živin do média. Produkční médium je komplexní médium obsahující kvasničný extrakt, soli a prostředek proti pěnění (antifoam). Tyto složky média jsou sterilizovány ve fermentoru. Po ochlazení fermentační nádoby na teplotu nižší než 40 °C jsou přidány stopové minerály, glukóza, síran hořečnatý a hexametafosfát, sterilizované filtrací. Dvě živiny jsou použity, jedna je zdrojem uhlíku (glukóza/síran hořečnatý), druhá je kvasničný extrakt obsahující dusík.

Po ustálení teploty produkčního média na 33°C je toto médium naočkováno inokulem. Růst kultury je sledován měřením OD_{600}. pH kultury je udržováno na hodnotě 7,0 automatickým přidáváním hydroxidu amonného a kyseliny citronové (48,7%). Po dosažení hodnot OD_{600} 8,0 až 12,0 se začíná přidávat živina I exponenciální rychlostí. Když se hodnoty OD_{600} nalézají v rozmezí 30 až 40, začíná přidávání živiny II konstantní rychlostí. Po dosažení hodnot OD_{600} 67- 83 je kultura indukována aseptickým přidáním sterilního autoinduktoru (lakton homoserinu) do konečné koncentrace 0,6 mg/L. V okamžiku indukce jsou rychlosti přidávání živin I a II změněny na konstantní. Kultura je sklizena 16 hodin (+- 2) po indukci.

Po ukončení fermentace jsou buňky sklizeny centrifugací v 500 mL kyvetách při 10 000 ot/min 30 minut. Kašovitý bakteriální pelet je naředěn na hustotu 15% pevných částic v lytickém pufru složeném z 50 mM Tris a 5 mM EDTA, pH 8,0. Resuspendované buňky jsou poté lyzovány trojnásobným protlačením suspenze homogenizátorem (APV

Gaulin, Inc., Everett, MA) při tlaku 57 MPa (8000 liber na čtvereční palec). Centrifugací homogenátu při 10 000 ot/min 30 minut jsou získána inkluzní tělíska (IT). Inkluzní tělíska jsou promyta v lytickém pufru a centrifugována potřetí při 10 000 ot/min 30 minut. Po resuspendování IT v deionizované vodě (v poměru 1:1) jsou naposledy centrifugována při 10 000 ot/min 30 minut. Tento krok představuje druhé promytí. Promytá inkluzní tělíska každého proteinu jsou připravena k rozpouštění, renaturaci a purifikaci.

C. Rozpouštění/ Renaturace:

Promytá IT z každé 10 L fermentace jsou rozpuštěna v 800 mL solubilizačního pufru (50 mM Tris, 8 M močovina, 160 mM cystein, pH 9,5). pH solubililizační směsi je nastaveno na hodnotu 9,5 pomocí 10 N NaOH, směs je míchána při laboratorní teplotě 2 - 3 hodiny. Každá várka poskytla výtěžek zhruba 200- 250 g IT.

Jednotlivé solubilizační směsi jsou ředěny v poměru1:20 v chladném renaturačním pufru (50 mM Tris, 1,1 M močovina). Konečný objem je asi 16 L. Pak je pH jednotlivých směsí nastaveno na hodnotu 9,7 pomocí 6 N HCl . Směsi jsou zvolna míchány při 4 °C 2 až 3 dny.

Poté je pH jednotlivých směsí nastaveno na hodnotu 5,0 ledovou kyselinou octovou a 6 N HCl. Sraženina, která se v každé směsi vytvoří, je odstraněna centrifugací při 10 000 g na centrifuze Beckman typ J2-HS. Získaný supernatant je pak filtrován na 5 µm a 0,22 µm filtru.

D. Purifikace:

Renaturovaný protein je připraven k purifikaci na koloně IX- 1 SP Sepharose Big Bead™ (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

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

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

11.10.99

Před nanesením renaturovaného materiálu je každá kolona ekvilibrována 4 - 5 objemy kolony pufrem A. Materiál z jednotlivých várek je odděleně nanášen na kolony k přečištění. Na každou kolonu je naneseno maximálně 12 g proteinu na litr polymeru. Pak je každá kolona promyta 3- 4 objemy kolony pufru A (pokud se hodnota UV nevrátí k základní linii). Proteiny jsou eluovány pomocí lineárně rostoucího gradientu soli v rozmezí 50- 375 mM NaCl o celkovém rozsahu 8 objemů kolony. Celá bílkovinná frakce je sbírána dohromady. Jímání bílkovinné frakce na každé koloně začíná, když UV absorbance vzroste ke 20% maxima. Sběr eluátu je zastaven v případě dosažení hodnot 50 % maxima UV absorbance, anebo pokud absorbance přestává klesat.

Rychlost průtoků:
7,5 objemů kolony/hod - ekvilibrace, promývání
15 objemů kolony/hod - nanášení
6 objemů kolony/hod - eluce
Veškerá purifikace na kolonách se provádí při 4°C.

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

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

Pufr A	Ředící pufr	Pufr B
20 mM $NaPO_4$	40 mM $NaPO_4$	Milli Q H_2O
1,8 M NaCl, pH 6,0		4 M NaCl pH 6,0

Před nanesením spojené frakce z kolony IX-1 je HIC kolona ekvilibrována 4-5 objemy kolony pufrem A. Spojené frakce z IX-1 jsou naředěny 1:1 ředícím pufrem a pH je upraveno na hodnotu 6,0. Zředěná spojená frakce z IX-1 je nanesena na kolonu. Na každou kolonu je naneseno maximálně deset gramů proteinu na litr polymeru. Každá kolona je promyta 3 objemy kolony pufru. Proteiny jsou eluovány z kolony pomocí lineárního klesajícího gradientu soli v rozmezí 1,8 M NaCl až H_2O o celkovém rozsahu 8 objemů kolony. Jímání každé

bílkovinné frakce začíná, když UV absorbance vzroste ke 15-20% maxima. Sběr je ukončen v případě dosažení hodnot 50 % maxima UV absorbance, anebo pokud absorbance přestává klesat.

Rychlost průtoků:
6 objemů kolony/hod - ekvilibrace, nanášení a promývání
3 objemy kolony/hod - eluce
Veškerá purifikace na kolonách se provádí při laboratorní teplotě.

Zahuštění/diafiltrace (C/D)

V C/D kroku je užita 1 čtvereční stopa (30,5 cm x 30,5 cm) PLLC regenerované celulozové membrány s M.V.cutoff 5 000 (Milli-Pore, Bedford, MA). Každá spojená frakce z HIC kolony je zahuštěna na objem asi 200 mL a potom diafiltrována proti 6-7 objemům 20 mM $NaPO_4$ pH 6,0 pokud není vodivost < 4 mm/ hod.

Zahuštění/diafiltrace je prováděna při laboratorní teplotě.

Každý vzorek po C/D je 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 Na $NaPO_4$ pH 6,0	20 mM $NaPO_4$ pH 6,3 50 mM NaCl	20 mM $NaPO_4$ pH 6,8

Před nanesením jednotlivých C/D vzorků je každá kolona ekvilibrována 4 objemy kolony ekvilibračního pufru. Každý C/D vzorek je odděleně nanášen na kolonu tak, aby nanesené množství nepřesáhlo osm gramů proteinu na litr polymeru. Pak je každá kolona promyta postupně 3 objemy kolony ekvilibračního pufru a 3 objemy pufru A. Proteiny jsou eluovány pomocí lineárního gradientu pH v rozmezí 6,3 - 6,8 a gradientu soli v rozmezí 0 - 50 mM NaCl (pufr B) o celkovém

rozsahu 8 objemů kolony. Sběr frakcí začíná při hodnotě O.D. 1,0 na počátku a končí při dosažení 50% maxima na konci.

Zkrácený sTNFR-1 může být solubilizován, renaturován a přečištěn i jiným způsobem, jehož popis následuje.

C.1 Rozpouštění/Renaturace :

Promytá inkluzní tělíska (IT) 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 cystein, pH 9,4 a 5 - 10 mg/mL zkráceného sTNFR-1. (Koncentrace sTNFR-1 je stanovena na základě množství sTNFR-1 v promytých IT v g/L.) Roztok je míchán při laboratorní teplotě 90 minut a poté jsou proteiny renaturovány zředěním 1:10 v chladném (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) .

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

D.1 Purifikace

Projasněný supernatant po kyselé precipitaci je nanesen na kolonu SP-Sepharose Big Bead™ (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), která byla ekvilibrována pufrem o složení 20 mM octan sodný, 75 mM NaCl, pH 5,0. Vzorek je nanesen na kolonu v množství nepřesahujícím 15 g zkráceného sTNFR-1 na L objemu náplně. Po nanesení je kolona promyta 3 objemy kolony 20 mM octanu sodného, 75 mM NaCl, pH 5,0 a eluována lineárním 9 kolonovým gradientem v rozmezí 75 mM až 450 mM NaCl ve 20 mM octanu sodném, pH 5,0. Čištění na koloně SP-Sepharose Big Bead™ (SP-BB) je prováděno při teplotě 4°C - 8°C.

Spojené frakce z SP-BB kolony jsou naředěny v poměru 1:1 ve 2 M NaCl, 60 mM octanu, pH 4,5 a pokud je to nutné, je pH upraveno na 4,5. Spojená frakce z SP-BB kolony je nanesena na kolonu Toyopearl™ Butyl 650M (Toso Haas, Philadelphia, PA), ekvilibrovanou pufrem o složení 1M NaCl, 30 mM octan, pH 4,5. Na kolonu je nanesen zkrácený sTNFR-1 v množství ~ 10 - 13 gramů na litr náplně kolony. Po

nanesení vzorku je kolona promyta 3 objemy kolony pufru o složení 1 M NaCl, 30 mM octan,, pH 4,5 a eluována lineárním gradientem (8 objemů kolony) v rozmezí 1 M NaCl - 0 M NaCl ve 30 mM octanu pH 4,5.

Purifikované frakce zkráceného sTNFR-1 z Butyl 650M kolony jsou spojeny, zředěny vodou 1:5 a naneseny na kolonu SP-Sepharose High Performance™ (SP-HP) (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), ekvilibrovanou 30 mM octanem, pH 4,5 (naneseno maximálně ~ 15 g /L objemu náplně). Kolona je potom promyta 3 objemy 30 mM octanu , pH 4,5 a eluována lineárním gradientem (12 objemů kolony) v rozmezí 100 mM až 400 mM NaCl v 30 mM octanu, pH 4,5. Purifikované frakce zkráceného sTNFR-1 jsou spojeny a pH upraveno na 5,0 pomocí NaOH.

C. PEGylace:

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

Do chladného (4°C) roztoku sTNFR-2,6D/N105 (3,5 mg/mL) v 50 mM octanu sodném, pH 4 je přidán za stálého míchání trojnásobný molární nadbytek t-BuPEG (mono-t-butoxy-polyethylenglykol, průměrná m. h.=33 kDa, Shearwater polymers, Inc.). $NaCNBH_3$ je přidán do výsledné koncentrace 20 mM a reakční směs je míchána 18-24 hodin při 7°C.

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

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

sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) je oddělen od zbytku t-BuPEG a jiných vedlejších produktů iontoměničovou chromatografií na SP Sepharose HP 16/10™ (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

Reakční směs je nanesena na kolonu a nezreagovaný t-BuPEG je vymyt 3 objemy kolony startovacího pufru A (20 mM octan sodný, pH 4,0). sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) je eluován lineárním gradientem (20 objemů kolony) v rozmezí 0-30% pufru B (1 M NaCl ve 20 mM octanu, pH 4,0). Eluát je měřen při 280 nm. Každá frakce obsahující sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) je analyzována

pomocí SDS-PAGE na komerčně připravených gradientových gelech 4-20% (Novex, San Diego, CA). Frakce jsou spojeny podle výsledků SDS-PAGE, zahuštěny a sterilně filtrovány. Všechny spojené frakce přečištěného sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) jsou opět analyzovány pomocí SDS-PAGE a SEC HPLC. Protein je převeden do roztoku 10 mM fosforečnan sodný, pH 6,5 a 20 mM NaCl.

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

Do chlazeného (7°C) a míchaného roztoku sTNFR-2,6D/N105 (4mg/ml) je přidávána kyselina octová, dokud hodnota pH nedosáhne 5,0. K tomuto roztoku je přidán 15 mM $NaCNBH_3$ a dvojnásobný molární přebytek t-butoxy PEG (t-butoxy-polyethylenglykol, průměrná m. h.=33 kDa, Shearwater polymers, Inc.). Reakční směs je při této teplotě krátce zamíchána a potom ponechána inkubovat asi 18 hodin.

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

sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (33 kDa) je oddělen od zbytku MePEG a jiných vedlejších produktů iontovou chromatografií na koloně SP Sepharose HP™ (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

Reakční směs je nanesena na kolonu (maximálně 8 mg/ml polymeru) a nezreagovaný MePEG je eluován 3 objemy kolony startovacího pufru A (20 mM citrát sodný, pH 3,0). sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (33 kDa) je eluován lineárním gradientem (16 objemů kolony) v rozmezí 0,1 - 0,5 M NaCl ve 20 mM citrátu, pH 3,0. Eluát je měřen při 280 nm. Každá frakce obsahující sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG(33 kDa) je analyzována pomocí SDS-PAGE na komerčně připravených gradientových gelech 4-20% (Novex, San Diego, CA). Frakce jsou spojeny podle výsledků SDS-PAGE, zahuštěny a sterilně filtrovány. Všechny spojené frakce přečištěného sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG(33 kDa) jsou opět analyzovány pomocí SDS-PAGE . Purifikovaný sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (33 kDa) je zahuštěn na na 5 - 20 mg/mL a převeden do PBS , pH 6,5 (10 mM fosfát sodný, 35-100 mM NaCl), anebo do 20 mM octanu, 100 mM NaCl, pH 5,0.

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

Postup kroku A přípravy sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG(33 kDa) je v podstatě zopakován s tou vyjímkou, že MePEG (mono-metoxy-polyethylenglykol, průměrná m. h.=33 kDa, Shearwater Polymers, Inc.). je nahražen MePEGem(mono-metoxy-polyethylenglykol, průměrná m. h.=20 kDa, Shearwater Polymers, Inc.). Tento protein je převeden do roztoku 10 mM fosforečnan sodný, pH 6,5 a 20 mM NaCl.

4. Příprava dalších konjugátů.

Další konjugáty sTNFR-2,6D/N105 jsou připraveny v podstatě stejně jako sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG(33 kDa) s užitím následujících typů PEG aldehydů (Shearwater Polymers, Inc.)

Lineární monofunkční - m.h. 5 kDa, 6 kDa a 57 kDa
Rozvětvený monofunkční - m.h. 10 kDa, 20 kDa a 40 kDa
Lineární mnofunkční - m.h. 8 kDa a 20 kDa
Rozvětvený trifunkční - m.h. 10 kDa

Tyto proteiny jsou jsou převedeny do roztoku 10 mM fosforečnan sodný, pH 6,5 a 20 mM NaCl.

5. Jiné metody pegylace.

Zkrácené molekuly sTNFR-1 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 moly polyethylenglykolu (např. MePEG anebo t-BuPEG) na mol sTNFR-I 2,6D/N105 (~ 5 gramů t-BuPEG na gram sTNFR-I 2,6D/N105). 10 - 20 mM kyanoborohydrid je přidán po rozpuštění polyethylenglykolu a roztok je inkubován přes noc při 7 - 15°C. Po skončení pegylace (~ 18 hodin) je reakce ukončena přidáním 10 mM glycinu.

Pegylační směs je zředěna 4 objemy 50 mM octanu, pH 4,0, konečné pH je upraveno na 4,0, je-li zapotřebí. Směs je nanesena na SP-HP kolonu ekvilibrovanou 50 mM octanem, pH 4,0. Maximálně 8 gramů sTNFR-2,6D/N105 na litr objemu náplně je naneseno na kolonu. Poté je kolona promyta 3 objemy kolony ekvilibračního pufru a eluována lineárním gradientem 0 - 0,3M NaCl v 50 mM octanu pH 4,0. Monopegylované frakce sTNFR-2,6D/N105-30 kDa jsou

sbírány, pH upraveno na 5,0, jsou dále zahuštěny a diafiltrovány do izotonického pufru. Všechny purifikační kroky jsou prováděny při laboratorní teplotě. Protein je převeden buď do PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35-100 mM NaCl), nebo do 20 mM octanu, 100 mM NaCl, pH 5,0.

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

Polyethylenglykol aktivovaný sulfonovou skupinou (připravený a přečištěný podle patentů United States Patent Application No. 08/473, 809, podaného 7. června 1995 a United States Patent Application No. 08/611,918, podaného 6. března 1996) [PEG 20 000-*bis*-vinylsulfon] je užit k dimerizaci proteinů v podstatě podle metody popsane v PCT Publication No. WO 95/34326, kromě redukce a reakčních podmínek. Proteiny jsou před připojením polyethylenglykolu redukovány 4 moly DTT na jeden mol proteinu při teplotě 5-6°C, pH 7,6. Všechny reakce probíhají v přítomnosti 30% glycerolu. Dimerizovaný protein se nazývá sTNFR-I 2,6D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C106db. Každý protein je převeden do PBS, pH 6,5 (10 mM fosforečnan sodný, 35-100 mM NaCl), nebo do 20 mM octanu, 100 mM NaCl, pH 5,0.

7. Příprava srovnávacích molekul sTNFR-I

(i). sTNFR-I 4D/N105 je připraven podle popisu v EP 422339. sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG (33 kDa) je 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 (33 kDa) je připraven pegylací sTNFR-I 4D/N105 v podstatě podle postupu uvedeného výše pro pegylaci sTNFR-I 2,6D/N105-t-MePEG (33 kDa). Příprava sTNFR-I 4D/C105 a sTNFR-I 4D/C105db je popsána v PCT Publication No. WO 95/34326. Tyto proteiny jsou rozpuštěny v 10 mM fosforečnanu sodném, pH 6,5 a 20 mM NaCl.

(ii). sTNFR-I 4D/C105-33 kDa (MePEG) je připraven pegylací 4D/C105 v podstatě podle postupu uvedeného výše pro pegylaci sTNFR-I 2,6D/C105-33kDa (MePEG) s touto vyjímkou: reakce probíhá při pH 7,5 s 1,3 moly DTT na mol sTNFR-I ~ 5-6 hodin, poté následuje odstranění DTT na koloně SP-Sepharose™ FF a PEGylace s 1,5 - 3 moly PEG na mol proteinu po dobu nejméně 15 hodin při

laboratorní teplotě. Tento protein je 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.

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

5´ OLIGO#13: (SEQ ID NO:80)
5´-GGTTAGCCATATGGACAGCGTTTGCCCCCAA-3´

3´ OLIGO#14 (SEQ ID NO:81)
5´-CCCAAGCTTTTAGGTGCACACGGTGTTCTGTTT-3´

Tento protein je rozpuštěn v 10 mM fosforečnanu sodném, pH 6,5 a 20 mM NaCl.

(iv). sTNFR-I 3D/C105 (sTNFR-I 4D/C105 zkrácený o 34 aminokyselin na C konci) je připraven stejně jako sTNFR-I 3D/N105, jako matrice je však použit sTNFR-I 4D/C105 . sTNFR-I 3D/C105 je 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 je připraven podobně jako sTNFR-I 4D/C105db, jako výchozí látka je však užit sTNFR-I 3D/C105 namísto sTNFR-I 4D/C105. sTNFR-I 3D/C105db je 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

Schopnost inhibovat aktivitu TNF je stanovována u různých forem zkráceného rekombinantního rozpustného TNFR-I.

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 na TNF-α (tzn. TNF-α je cytotoxický). V přítomnosti TNF-α inhibitoru jsou buňky ochráněny před cytotoxickým účinkem a jsou proto schopny proliferace.

Protokol:

Buňky WEHI 164 klon 13, citlivé k TNF (ATCC, Rockville, MD) jsou suspendovány v koncentraci 20 x 10^4 buněk/mL v RPMI médiu (Gibco, Grand Island, NY) doplněném 5% Fetal Calf Serum (Hyclone, Ogden, UT) a penicilin (50 jednotek/mL) : streptomycin (50 mg/mL). Sto mikrolitrů této buněčné suspenze je přeneseno do všech jamek 96 místné mikrotitrační destičky s plochým dnem, buňky jsou ponechány adherovat po dobu 4-6 hodin při 37°C v 5% CO_2. Do každé jamky je přidáno 10 µl aktinomycinu D (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) je přidáno do každé jamky. Dvojková ředící řada různých forem sTNFR (sTNFR-I 2,6D/C106, sTNFR-I 4D/C105 a sTNFR-I 4D/C105db) je naředěna v PBS a potom přidána dvojmo do jamek (10 µL/jamka) s adherovanými buňkami linie WEHI 164, ke kterým byl dříve přidán rekombinantní lidský TNF-α. Buňky WEHI-164 klon 13 jsou inkubovány 18 hodin při 37°C v 5% CO_2. Po skončení inkubace je přidáno 10 mL roztoku (2 mg/mL) organického barviva MTT tetrazolium (3-[4,5-dimethylthiozol-2-yl]2,5-difenyl tetrazolium bromid; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a buňky jsou dále inkubovány 4-6 hodin. Buňky jsou solubilizovány přidáním 50 µl roztoku DMF/SDS (20% SDS a 50% N,N

dimethylformamid, pH 4,7). Roztok DMF/SDS je promícháván několikerým nabráním a vypuštěním ze špičky dokud nejsou všechny krystalky MTT rozpuštěny a buňky jsou dále inkubovány po dobu 2-22 hodin. Hodnoty absorbance jsou měřeny na čtecím zařízení Vmax při 570. Podíl specifické cytotoxicity je vypočítán z hodnot optických denzit podle vzorce: % specifické cytotoxicity = 100% x [abs (buňky + médium) - abs(buňky + vzorek)] / [abs (buňky + médium) - abs(buňky + TX-100)]. Počet jednotek TNF v každém vzorku je určen pomocí podílu specifické cytotoxicity myších standartů,jak bylo dříve popsáno.

Výsledky WEHI testu jsou shrnuty níže v tabulce 2:

TAB. 2: *In vitro* aktivita ve WEHI testu

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

Na základě výsledku WEHI testu nejsou žádné významné rozdíly v bilogické účinnosti *in vitro* mezi sTNFR-1 2,6D/C106 a sTNFR-1 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), stanovuje rovněž cytotoxicitu usmrcování citlivého k TNF-α. Buněčné linie jsou citlivé na TNF-α (tzn. TNF-α je cytotoxický). V přítomnosti rozpustného TNF-α inhibitoru jsou buňky chráněny před cytotoxickým účinkem a jsou proto schopny proliferace.

Protokol:

Buněčná linie L929 je získána z American Type Culture Collection (Catalog number CCL 1, NCTC klon 929, klon kmene L, pojivová tkáň, myš). K pomnožení buněk je užito RPMI Medium 1640

doplněné 10% FBS + 1% roztok L-glutaminu + 1% roztok penicilin-streptomycinu.

Test je prováděn v 96 místných mikrotitračních destičkách (Corning) tak, že jen 60 vnitřních jamek je použito. Test je opakován třikrát na téže destičce pro standart i pokusné vzorky.

TNFα použitý v testu pochází z R&D Systems (Minneapolis, MN). Konečná koncentrace TNFα je 1 ng/mL ve všech pokusných jamkách.

Vzorky jsou ředěny v L929 růstovém médiu, 10 ng/mL TNFα, 10 μg/mL aktinomycinu D (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) - Assay Diluent.

Destičky jsou sklizeny pomocí roztoku XTT/MEN (1,5 mg/mL XTT + 75 mM MEN)

První den jsou buňky vysety na pokusné destičky. Buněčná suspenze je připravena trypsinizací a resuspendováním buněk v koncentraci 3,33 x 10^4 buněk/mL. Do každé z vnitřních 60 jamek pokusné destičky je vyseto 180 mL této buněčné suspenze. 200 mL růstového média je rozmístěno ve vnějších 36 jamkách, abychom se vyhnuli pokusným chybám způsobeným odpařováním. Destičky, přikryté folií a chráněné před průvanem, jsou ponechány při laboratorní teplotě asi jednu hodinu. Potom jsou umístěny v inkubátoru s vysokou vlhkostí při teplotě 37±2 °C, 5±1% CO_2. Destičky se inkubují asi 20-22 hodin , pak je přidán sTNFR-I v různém ředění.

Druhý den je připraven standart sTNFR-I 4D/N105 a pokusné vzorky tímto způsobem: Nařeďte standart sTNFR-I 4D/N105 a pokusné vzorky na koncentraci asi 2,0 mg/mL (anebo na jinou vhodnou koncentraci). Udělejte postupná ředění této koncentrace tak, aby vznikla ředící křivka o 10 bodech sahající od hodnoty asi 1,0 x 10^6 ng/mL k 1,0 x 10^{-3} ng/mL, včetně 0 ng/mL (pouze Assay Diluent). Mohou být použity i jiné vhodné koncentrace. Přidejte 1000 μL každého ředění trojmo na každou pokusnou destičku. Potom inkubujte destičky v inkubátoru s vysokou vlhkostí při teplotě 37±2 °C, 5±1% CO_2 po dobu 20±1 hodin.

Třetí den je přidáno 50 μl na jamku roztoku XTT/MEN do 60 vnitřních jamek pokusných destiček. Destičky jsou inkubovány v inkubátoru s vysokou vlhkostí při teplotě 37±2 °C, 5±1% CO_2 (Falcon, New York, New York) po dobu 24±0,5 hodin.

11.10.99

Čtvrtý den jsou stanoveny hodnoty optické denzity (O.D.) pokusných destiček při 450 nm minus 650 nm na čtecím zařízení ELISA (SpectraMAX, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA). Pokud je získána při těchto vlnových délkách hodnota 4000 OD pro jamky na destičce, destička musí být ihned znovu přečtena při 490 nm minus 650 nm a tyto údaje použity pro výpočet.

Standartní logaritmická křivka závislosti odpovědi na dávce je stanovena pomocí čtyřparametrové logistické aproximace. Původní koncentrace neznámých vzorků jsou spočítány ze standartní křivky, ED_{50} je spočítána pro standart, je spočítán korelační koeficient standartní křivky.

Výsledky:

Výsledky L929 cytotoxického testu jsou shrnuty v tabulce 3.

TAB. 3 : *In vitro* aktivita v L929 cytotoxickém testu.

Látka	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 2,6D/C106db	2,2	1,0 + 0,1
sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG (33 kDa)	2,0	229,2±8
sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG (33 kDa)	1,1	325,5±147
sTNFR-I 2,6D/C105-t-BuPEG (33 kDa)	1,7	210,2±9
Vnitřní standart:		
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 dávku v porovnání se standartem. 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 ve srovnání se sTNFR-I 4D/C105db.

Pokus #2		
sTNFR-I 3D/C105db	0,2	2,27±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 standart :		
sTNFR-I 4D/C105	3,5	115,9±42,1

• Hodnota založená na jediném výsledku

Tyto údaje dokazují, že sTNFR-I 3D/C105db je aktivní a hodnoty ED_{50} 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). Data rovněž ukazují, že sTNFR-I 3D/N105 je méně aktivní než vnitřní standart sTNFR-I 4D/C105 .

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

Reaktivační modelový pokus artritidy indukované buněčnou stěnou streptokoka u krys je 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 krysy Lewis (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA), každá o váze 175 a 185 gramů jsou injikovány intraartikulátně do kloubu na pravém kotníku suspenzí prepáratu buněčné stěny streptokoka s obsahem peptidoglykan-polysacharidu (SCW) (Lee Laboratory, Grayson, GA) v dávce 1,5 mg/10 mg na kloub. Fyziologický roztok je injikován do kontralaterálního kloubu jako kontrola. Intraartikulátní injekce SCW způsobuje akutní artritidu relativně krátkého trvání s otokem kloubu, která vrcholí den až dva po injekci. Po dvaceti dnech, během nichž dozní akutní zánětlivá odpověď, SCW v dávce 200 mg/200 mL na krysu je opět podán nitrožilně. Druhá dávka stačí k reaktivaci zánětu v tom kotníkovém kloubu, kam byl předtím injikován SCW,

avšak má malý účinek na kotník injikovaný fyziologickým roztokem. Rozsah zánětu během 72 hodin po nitrožilní injekci SCW je stanoven měřením zadního kotníkového kloubu pomocí kotníkového měřitka (kaliper) v časech 0, 24, 36, 48 a 72 hodin po reaktivaci artritidy, poté je zadní kontralaterální článek odebrán pro histologické vyšetření (např. zánět, vytvoření pannusu, poškození chrupavky a kosti.)

Výsledky:

Účinky podání sTNFR-I 2,6D/C106db na vývoj kloubního otoku během reaktivace artritidy jsou testovány. Inhibitor a slepý vzorek je podán každý v jedné nitrožilní injekci 24 hodin před reaktivací pomocí SCW.

sTNFR-I 2,6D/C106db vykazuje statisticky významnou účinnost v redukci otoku kloubu, prokázanou analýzou rozptylu (ANOVA) ve Fisherově post-hoc testu (Statview^{R}), ve všech čtyřech dávkách podaných dva nebo tři dny po reaktivaci a ve všech dávkách s vyjímkou 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 (tj. 8,8 nM) v časovém rozmezí od prvního dne před reaktivací do třetího dne po reaktivaci. Preparáty sTNFR vykazují 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 obr. 9, sTNFR-I 2,6D/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) ukazuje významnou redukci v šířce kloubu a histologických indexech ve srovnání s kontrolní skupinou nemoci v modelovém pokusu.

D. Modelový pokus s použitím D-galaktosamin/ lipopolysacharidu:

D-galaktozamin(D-GalNH_2)/lipopolysacharid (LPS) model (Parmely et al. (1993), viz výše) je modelový pokus *in vivo*, založený na zvířecí letalitě závislé na TNF-α. Navíc byla u autoimunních myší MRL-*lpr/lpr* prokázána extrémní citlivost na TNF-α indukovaný LPS nebo SEB (Mountz et al. (1995), *J. Immunol.*, 155: 4829-4837).

Protokol:

U 6-8 týdnů starých myších samic (MRL -*lpr/lpr*) (Jakckson Laboratory, Bar Harbor, ME) je po nočním hladovění vyvolána I.P. reakce pomocí následujících farmakologických preparátů: 25 mg D-$GalNH_2$ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suspendovaný v Hanksově balancovaném roztoku solí (Gibco Laboratories, Inc., Grand Island, NY) (50 mg/mL); lipopolysacharid (LPS) z *E. coli* sérotyp 0127:B8 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ve sterilním, endotoxinu prostém médiu PBS (25 mg/myš); anebo SEB (Toxin Technologies, Sarasota, FL) v běžném fyziologickém roztoku (50 mg/myš). Různé formy sTNFR jsou podány v postupném dvojnásobném ředění (dávky v mg/kg) tak, aby byla získána křivka ED_{50} pomocí statistického software od firmy MacIntosh (Statview^R, Mountain View, CA). Letalita je sledována během 48 hodin po vyvolání I.P. reakce.

Výsledky:

Tabulka 4 ukazuje, že pokud je sTNFR-I 2,6D/C106db podaný, jak bylo výše popsáno, 1 hodinu před podáním LPS/$DGalNH_2$, ED_{50} (tj. dávka sTNFR-I 2,6D/C106db nutná pro záchranu 50% myší) v čase 48 hodin je ~50 μg/kg (N=8 myší). Ve srovnání se sTNFR-I 4D/C105db není žádný významný rozdíl ($P > 0,05$) ve schopnosti této formy zabraňovat letalitě (ED_{50} = ~50 μg/kg; N=8 myší).

11.10.99

TAB. 4: Srovnání sTNFR a optimalizovaných forem sTNFR v modelovém pokuse LPS/D-$GalNH_2$)

Preparát	ED_{100}	ED_{50}
sTNFR-I 4D/C105db	~100 μg/kg	~50 μg/kg
sTNFR-I 2,6D/C106db	~100 μg/kg	~50 μg/kg
sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa)	~2 mg/kg	~400 μg/kg
sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG(20 kDa)	~800-1000 μg/kg	~1 mg/kg
sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (20 kDa rozvětvený)	2 mg/kg	~1-1,5 mg/kg
sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (40 kDa 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 (33 kDa) je v tomto modelovém pokuse méně aktivní (ED_{50} je asi 400 μg/kg; n = 5 myší). Také aktivity sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (20 kDa rozvětvený) a 2,6D/N105-MePEG (40 kDa rozvětvený) jsou v tomto pokuse nižší.

E. Pokusný model artritidy indukované pomocí adjuvans:

Reumatoidní artritida indukovaná u krys pomocí adjuvans se v mnohém podobá reumatoidní artritidě u lidí. Účelem tohoto pokusu je demonstrovat, že systémové podání zkrácených forem sTNFR má zmírňující účinek v patogenezi artritidy vyvolané pomocí adjuvans u myší.

Protokol:

Samci krys Lewis (5-7 ve skupině) (Charles Laboratories, Inc., Wilmington, MA) o váze nejméně 200 g jsou kanylováni katetrem SQ a ponecháni zotavit několik dní. Potom jsou umístěni v infúzních klecích, kde si zvykají týden před začátkem infúzí.

V den 0 jsou všechny krysy injikovány 100 μl Freundova kompletního adjuvans (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ke kterému bylo přidáno syntetické adjuvans N,N-dioktyldecyldecyl-N´,N-bis(2-hydroxy-ethyl) propandiamin, 50 mg/ml. Osmý den je

různým skupinám krys podávána SQ kontinuální infúze sTNFR-I 4D/C105 a sTNFR-I 2,6D/N105.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.

TAB. 5: Artritida indukovaná pomocí adjuvans.

Látka	Dávka	AUC%	Váha tlapky	Zánět	Res.Kosti Histopatologie
	(mg /kg/hod)	(% Inh.)	(% Inh.)	(% Inh.)	(% Inh.)
Studie # 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
Studie # 2					
sTNFR-I 2,6D/N105	5	42	ND	19	67
	1	38	ND	13	49
Studie # 3					
sTNFR-I 2,6D/N105	9	50	40	13	27
- MePEG(20 kDa)	3	35	34	9	22
	1	36	30	0	0
sTNFR-I 2,6D/N105	9	43	37		
MePEG(33 kDa	3	38	33		
	1	24	20		

Formy sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG (33 kDa) a sTNFR-I 4D/C105db mají kupodivu v případě artritidy vyvolané pomocí adjuvans u krys Lewis antiartritickou

aktivitu navzájem srovnatelnou , ačkoliv sTNFR-I 4D/C105db je účinnější v *in vitro* cytotoxických testech WEHI - 164 a L929, stejně jako v pokusném modelu LPS/GalN.

F.Artritida indukovaná kolagenem:

Artritida indukovaná kolagenem II u krys v mnohém připomíná reumatoidní artritidu u lidí. Účelem tohoto pokusu je demonstrovat, že systémové podání zkrácených forem sTNFR má zmírňující účinek v patogenezi artritidy vyvolané kolagenem typu II u krys a myší.

11.10.99

Protokol pro krysy:

Krysím samicím Lewis (Charles River laboratories, Inc., Wilmington, MA) byly implantovány SQ kanyly , krysy byly přivyknuty k upoutání během kontinuální infúze. Poté jsou imunizovány kravským kolagenem typu II ve Freundově kompletním adjuvans. 13., 14. nebo 15. den po imunizaci jsou zvířata s rozvinutou artritidou náhodně rozdělena do skupin po osmi jedincích. Infúze různých dávek sTNFR-I nebo slepého vzorku je podávána pokusným skupinám sedm dní, jak je popsáno v tab.6. Zánět v tlapce je hodnocen denním měřením kotníkových kloubů speciálním měřítkem (kaliper). Sedmý den jsou zvířata šetrně zabita a tlapky odebrány k určení váhy, která slouží jako index zánětu. Kotníkové a kolenní klouby jsou odebrány k histopatologickému posouzení parametrů artritidy.

Výsledky jsou uvedeny v tab. 6A.

TAB. 6A : Artritida indukovaná kolagenem

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

Je zajímavé, že v případě kolagenem indukované artrózy je účinnost u všech léčených skupin zhruba stejná (např. tvar křivky, podíl inhibice plochy vymezené křivkou (AUC) v rozmezí 30-59%, inhibice váhy tlapky v rozmezí 40-64%). Skupina, která nebyla léčena, se statisticky významně odlišuje od všech ostatních skupin u tohoto modelu artritidy.

Protokol pro myši:

Samci DBA/1 (Jackson Laboratories, Inc., Bar Harbor, ME) jsou imunizováni kravským kolagenem typu II (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ve Freundově nekompletním adjuvans. 24. 25. a 26. den po imunizaci jsou zvířata s rozvinutou artritidou náhodně

rozdělena do skupin o osmi zvířatech. Jedincům v pokusných skupinách je podáván dvakrát denně IP cestou buď fyziologický roztok, anebo sTNFR-I 2,6D/N105-MePEG (33 kDa) po tři dny za sebou (dny +27, +28, +29). Zánět v tlapce je hodnocen denním měřením kotníkových kloubů speciálním měřítkem (kaliper). 34. den jsou zvířata šetrně zabita a tlapky odebrány k určení váhy, která slouží jako index zánětu. Kotníkové a kolenní klouby jsou odebrány k histopatologickému posouzení parametrů artritidy.

Výsledky jsou shrnuty v Tab. 6B.

TAB. 6B: Artritida indukovaná kolagenem

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

G. Produkce TNF-α indukovaného LPS ovlivněná kontinuální infuzí u krys:

sTNFR-I 2,6D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C106db, sTNFR-I 2,6D/N105 a sTNFR-I 4D/N105 jsou podány IV do krční žíly pomocí Alzet ™ minipump (Alza Corp., Palo Alto, CA), podle návodu výrobce během 48 hodinové infúze (1 mg/kg). Hladiny TNF-α v séru, měřené ELISA testem (Genzyme, Cambridge, MA) jsou významně sníženy ve srovnání s kontrolami +2 hodiny po podání LPS.

Příklad III: Imunogenní studia

Imunogennost různých forem zkráceného rekombinantního rozpustného TNFR-I je stanovena u několika zvířecích modelů.

A. Hlodavci:

sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG (33 kDa) a sTNFR-I 4D/C105db jsou subkutánně podány (4 mg/kg) první a pátý pokusný den krysím samicím Sprague Dawley (Charles Rivers Labs, Wilmington, MA) (n=6-8 ve skupině). Vzorky krve jsou týdně odebírány do 21. dne po začátku pokusu. Ve vzorcích je stanovena produkce IgM a IgG protilátek.

TAB. 7 : Imunogennost u hlodavců

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

Z 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 (33 kDa), který má téměř nulové titry protilátek. Podobné trendy imunogennosti jsou pozorovány i v případě krys produkujících anti-sTNFR-I IgM protilátky do 21. dne. sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG (33 kDa) nevyvolává tvorbu krysích anti- sTNFR-I IgM protilátek do 21. dne.

B. *Papio anubis:*

Náplní fáze A části 1 této studie je stanovení farmakokinetiky a imunogennosti 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 BW), které jsou podány dvakrát IV zdravému paviánovi ve 21 denním intervalu.

Část 1 je rozdělena do dvou fází. Cílem fáze A je stanovení farmakokinetiky a imunogennosti různých preparátů sTNFR-I u zdravého

paviána v odpovědi na dvě aplikace. Dvanáct paviánů je rozděleno do tří skupin. Jedinci každé skupiny dostávají v anestezii 0,2 mg/kg BW sTNFR-I 4D/C105db , sTNFR-I 3D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C105db. Tři paviáni jsou studováni během jednoho pokusu. Zvířata jsou sledována 21 dnů, potom dostávají druhou identickou IV aplikaci proteinu a jsou studována dalších 21 dnů. Farmakokinetika a imunogennost jsou potom stanovovány v intervalech .

Cílem fáze B této studie je 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 je indukována letální *E. coli* bakterémie podáním 5-10 x 10^{10} cfu/kg živé váhy. Skupina, která dostala placebo je srovnána s paviány , kteří byli předem IV injikováni 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 jsou mladí dospělí paviáni *Papio anubis*, samci i samice (6-11 kg), (Biomedical Research Foundation, San Antonio, TX) ponecháni přes noc hladovět. Anestezie zvířat je provedena ketaminem (10 mg/kg *i.m.*) a žíla na hlavě je perkutánně kanylována. Anestezie je udržována prvotním podáním až 35 mg/kg pentobarbitalu sodného, pak následují opakované injekce 3-5 mg/kg/hod pentobarbitalu sodného. Horní cesty dýchací jsou pojištěny umístěním endotracheální trubice s manžetou , zvířata dýchají spontánně. Do stehenní tepny je umístěn perkutánně katetr umožňující opakovaný odběr arteriálních krevních vzorků stejně jako souvislé sledování činnosti srdce a střední arteriální krevní tlak pomocí monitoru anestézie a srdeční činnosti Datascope 2000 (Datascope, San Antonio, TX). Vzorky krve z arterie jsou odebírány v intervalech, po přidání EDTA nebo heparinu k zamezení srážení jsou ihned po odběru ochlazeny na ledu. Frakce krevní plazmy je oddělena centrifugací při 4°C a uložena při - 70 °C až do okamžiku analýzy. Vnitřní tělesná teplota je sledována rektální sondou. Nebotnavý Foleyův katetr je umístěn do močové trubice, aby bylo možno sledovat výdej moče a vylučování kreatininu. Každých patnáct minut jasou sledovány hemodynamické parametry. Všechna zvířata dostanou 0,9 % chlorid sodný (4 ml/kg) pro udržení *i.v.* tekutin. Během fáze B pokusu dostávají zvířata další tekutinu (10 ml/kg každých 15 minut),

jestliže jsou splněna dvě z následujících fyziologických kritérií: 1) střední arteriální tlak polklesne 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 období klidu k ekvilibraci začíná infúze proteinů.

Během fáze A této studie je pro infúzi rekombinantních proteinů využita cefalická véna, zvířata jsou sledována osm hodin, poté jsou všechny katetry odstraněny a zvířata jsou vrácena do svých klecí na dobu 21 dní. Po 24 a 48 hodinách a 3., 5., 8., 11., 16., a 21. den je u zvířat provedena lehká anestezie IM ketaminem (10 mg/kg) a odebrány vzorky žilní krve. 21. den je provedena nová anestezie, podána druhá aplikace proteinu a celý postup jak byl výše popsán ode dne nula je opakován dalších 21 dní. Po této době jsou zvířata šetrně usmrcena.

Během fáze B této studie jsou jednu hodinu před infuzí *E. coli* náhodně vybrána čtyři zvířata, která dostávají buď placebo, anebo jeden z výše zmíněných rekombinantních preparátů. Zvířata jsou sledována osm hodin, poté jsou všechny katetry odstraněny, zvířata vrácena do klecí a je pozorováno případné přežívání letální bakterémie. Zvířata, která nadměrně trpí, jsou šetrně usmrcena. Nadměrné utrpení je definováno IACUC takto: 1) neschopnost stát nebo sedět po dobu 12 hodin, 2) neschopnost přijímat potravu či vodu po dobu 12 hodin, 3) nezvladatelné krvácení z míst, kde byly katetry, anebo 4) neodpovídavost na vnější podněty. Vzorky žilní krve jsou odbírány 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. 21. den jsou zvířata, která do této doby přežijí, šetrně usmrcena.

Přítomnost *Papio* protilátek proti podaným rekombinantním proteinům je určována pomocí testu ELISA sandwich. Stručně popsáno, ELISA destičky jsou potaženy preparáty sTNFR-1(1µg/ml), pak je přidána ředěná (1:50 až 1:100 000) paviání plazma (100 µL). Po promytí vzorků je přidán konjugát křenové peroxidázy a proteinu A (0,5 µg/ml), reakce je vizualizována pomocí TMB.

Výsledky (Část I):

Tři rekombinantní preparáty se významně lišily poločasem přetrvání v plazmě. Křivky popisující vymizení jsou stanoveny metodou nezávislou na modelu, poločasy jsou obecně hodnoceny mezi 8 a 172 hodinami. U zvířat vstupujících do pokusu je poločas přetrvání v plazmě nejdelší u paviánů, kteří dostali 4 doménový preparát (29 hod) a postupně klesá 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, je jen 26%. Po druhém podání proteinů příslušným paviánům poločasy přetrvání v plazmě mají neočekávanou tendenci k výraznému zkrácení, což naznačuje rychlejší vylučování. Tato redukce poločasů je nejvýraznější u paviánů ovlivněných sTNFR-I 4D/C105db, u nichž jsou poločasy kratší o 48% ($p<0,01$) [Obr.10]. Střední redukce poločasů je u paviánů ovlivněných sTNFR-I 3D/C105db (31%) [Obr.11] a nejmenší u zvířat, kterým byl podán sTNFR-I 2,6D/C105db (14%) [Obr.12] . U paviánů, kteří dostali sTNFR-I 2,6D/C105db, nejsou redukce poločasů statisticky odlišné.

Všechny preparáty jsou u paviánů imunogenní. Avšak nejvyšší hodnota imunogennsti byla nalezena u paviánů ovlivněných sTNFR-I 4D/C105db, střední u zvířat ovlivněných sTNFR-I 3D/C105db a nejnižší u zvířat, kterým byl podán sTNFR-I 2,6D/C105db (Tab.8).

TAB. 8: Vrcholy protilátkové odpovědi[1]

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

[1] logaritmické měřítko (převrácená hodnota ředění plazmy potřebná k dosažení poloviny maxima absorbance v testu ELISA sandwich, viz *Experimentální metody*)

• p=0,056, stanoveno podle Kruskal-Wallis dvouparametrový ANOVA (hodnoty vyjádřené logaritmicky nebyly použitelné v normálním rozložení)

Protilátková odpověď se obecně rozvíjí kolem osmého dne po podání rekombinantního preparátu a je přítomna během po dobu 21 dní. Protilátková odpověď se stává silnější po druhé aplikaci rekombinantního proteinu.

Všichni čtyři paviáni, kteří dostali sTNFR-I 4D/C105db tvoří 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 tvoří protilátky. Velikost protilátkové odpovědi (vyjádřená logaritmicky) podle Kruskall- Wallis ANOVA se významně liší mezi třemi skupinami jako funkce času ($p<0,05$). Post-hoc analýza naznačuje, že významný rozdíl v protilátkové odpovědi je především mezi zvířaty, která dostala sTNFR-I 4D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C105db se středními (a nevýznamnými) odpověďmi u zvířat, kterým byl podán sTNFR-I 3D/C105db.

Je pozorována korelace mezi tvorbou protilátek a změnou ve vylučování mezi oběma 21 denními studiemi ($p<0,01$). U zvířat se silnou protilátkovou odpovědí na první podání rekombinantního

preparátu je podle očekávání protein po druhém podání rychleji vylučován. Změna ve vylučování po první a druhé aplikaci je porovnána u zvířat, která vykázala protilátkovou odpověď (n=7) a která nikoliv (n=5) [Obr.13].

Přímá cytotoxicita na buněčné linii ME-180 a neutralizační kapacita v L-929 testu byla hodnocena u protilátek nalezených v plazmě paviánů u vybraného počtu zvířat. Žádná cytotoxicita ani neutralizace nebyla nalezena u protilátek proti třem zkoumaným rekombinantním proteinům.

Jak bylo prokázáno během A fáze studia paviánů, zvířata, která rozvíjejí nejsilnější protilátkovou odpověď, vykazují nejrychlejší zvýšení ve vylučování rekombinantního preparátu po jeho druhém podání. Taková zjištění naznačují, že protilátková odpověď může zkrátit biologický poločas a tedy i terapeutickou účinnost rekombinantního preparátu, a proto může být vyžadována úprava dávky. Nezdá se však být prokázána jakákoliv nepříznivá klinická odpověď na přítomnost protilátek po druhém podání rekombinantního preparátu. Terapeutické úsilí zaměřené na modifikace rekombinantních preparátu, které by snížily imunogenicitu a významně neovlivnily poločas účinnosti, směřují primárně k omezení potřeby zvýšit dávku, nikoliv ke snížení rizika nepříznivé klinické reakce.

Výsledky Část 1 Fáze B:

Závěrem možno konstatovat, že všechny tři rekombinantní preparáty jsou téměř stejně účinné u dosud nedotčených zvířat a zabraňují poškození způsobenému cytokiny během bakterémie *E. coli*, pokud jsou podány 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 rekombinantní preparáty zabraňují biologické aktivitě TNFα a mají dostatečnou neutralizační kapacitu.

Část II:

Cílem části II studie u paviánů je rozhodnout, zda má opakovaná expozice zvířat (tj. 3 oddělené aplikace) k různým sTNFR-I proteinům za následek zvýšenou imunogennost a snížený poločas. Dále má tato studie porovnat imunogennost a farmakokinetiku několika sTNFR-I preparátů včetně sTNFR-I 4D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C105db, dále sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa). Konečně je tato studie zaměřena na zhodnocení klinického významu protilátkové odpovědi a změněného vylučování na následnou odpověď k poškození způsobenému TNFα (*E. coli* bakterémie).

Ve dnech 0, 21 a 42 jsou paviánům podány IV (0,2 mg/kg) různé rekombinantní proteiny (sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 2,6D/C105db, sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa). 63. den dostávají paviáni 2,0 mg/kg BW příslušného proteinu. 65. den (tj. o 48 hodin později) je paviánům podána letální dávka *E. coli*, jak bylo popsáno výše v Části I. Hlavní poznatky Části II jsou následující.

Výsledky (Část II):

U nedotčených paviánů mají sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) obecně delší poločasy než sTNFR-I 4D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C105db bez ohledu na počet domén. Délka poločasu je v rozmezí 30 - 35 hodin u monopegylovaných forem sTNFR-I na rozdíl od 10-20 hodin u dimerických pegylovaných forem. Navíc mají sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 4D/C105db delší poločasy než sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 2,6D/C105db.

sTNFR-I 4D/C105db a sTNFR-I 2,6D/C105db jsou také imunogenní, s mírným trendem k nižší imunogennosti u sTNFR-I 2,6D/C105db. Avšak pouze sTNFR-I 4D/C105db je méně vylučován po opakovaném podávání. sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) nejsou ani antigenní, ani se jejich rychlost vylučování významně nemění po opakovaném podávání.

In vitro imunoreaktivita (ELISA sandwich capture) k jiným rekombinantním proteinům v séru, odebraném každému paviánovi (N=3) 21., 42. a 61. den, je stanovena pomocí odlišného rekombinantního

proteinu užitého jako záchytný (capture) antigen. Např. sérum z paviánů, kterým byl podán sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) 21.den (Tab.9)" nereaguje" se sTNFR-I 4D/C105db ani se sTNFR-I 4D/N105 užitými jako záchytné (capture) antigeny na ELISA destičce.

Za pozitivní je pokládána protilátková odpověď o titru >1:400. Údaje ze 42. a 61. dne jsou shrnuty v tab. 10 a 11. Za důležitý je považován fakt, že sérum z 1 paviána, kterému byl podán sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa), dávalo pozitivní in vitro reakci při testování se sTNFR-I 4D/C105db záchytným (capture) antigenem (tab. 11).

Za pozitivní je pokládána protilátková odpověď o titru >1:400. Údaje ze 42. a 61. dne jsou shrnuty v tab. 10 a 11. Za důležitý je považován fakt, že sérum z 1 paviána, kterému byl podán sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa), dávalo pozitivní in vitro reakci při testování se sTNFR-I 4D/C105db záchytným (capture) antigenem.

Podle účinnosti prevence poškození způsobeného TNFα u paviánů , kterým byl třikrát podán rekombinantní preparát, je možno seřadit proteiny počínaje nejúčinnějším takto (1) sTNFR-I 4D/C105db, (2) sTNFR-I 2,6D/C105db, (3) sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a (4) sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) (stanoveno na základě přežívání, systémového selhání orgánů (MSOF), IL-6 a bílých krvinek (WBC) v séru). Vadou této studie je fakt, že nebrala v úvahu rozdíly ve schopnosti různých rekombinantních proteinů neutralizovat TNF.

Tabulka 9

Imunitní reakce paviánů

I_gG (≥ 1:400 titr) Den 21

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

Tabulka 10

Imunitní reakce paviánů

I_gG (≥ 1:400 titr) Den 42

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

Tabulka 11

Imunitní reakce paviánů

I_gG (≥ 1:400 titr) Den 61

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

C. Šimpanz

Cílem této studie je stanovit imunogennost různých forem sTNFR-I, které jsou opakovaně injikovány I.V. cestou šimpanzům v průběhu 1 měsíce. Následující formy sTNFR-I jsou testovány: sTNFR-I 2,6D/C105db, sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33 kDa), sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa). V jedné pokusné skupině jsou celkem tři šimpanzi.

Dávkovací režim a parametry této studie jsou následující: Každý šimpanz dostává 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 mění v závislosti na koncentraci podávaného vzorku. 5 ml séra je odebráno každému zvířeti v den 0 před začátkem pokusu. Další vzorky séra jsou odebírány těsně pře podáním preparátu 7., 14., 21. a 28. den.

Základní údaje o imunogennosti u šimpanze jsou uvedeny v tab. 12.

Do 28. dne je u všech zvířat (N=3), kterým byl podáván sTNFR-I 4D/C105db nebo sTNFR-I 2,6D/C105db, zaznamenána pozitivní reakce (stanoveno testem ELISA), nevyšší naměřené titry jsou 1:12 800 a 1:3200 (tab.12). (Poznámka: V této části pokusu jsou všechny „imunizační" antigeny užity jako odpovídající záchytné (capture) antigeny immobilizované na ELISA destičce). Jedno zvíře imunizované sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa) má pozitivní protilátkovou reakci 21. a 28. den (Tab.12). Je důležité, že u žádných zvířat imunizovaných během tohoto pokusu sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33 kDa) nebo sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) nebyla pozorována tvorba anti sTNFR-I protilátek (tab.12).

Sérum odebrané 28. den všem šimpanzům (N=3) imunizovaným různými formami sTNFR-I je testováno na *in vitro* imunoreaktivitu proti jiným rekombinantním proteinům sTNFR-I užitým jako záchytné (capture) antigeny v testu ELISA, jak bylo popsáno výše u pokusů s paviány. Pozitivní reakcí je protilátková odpověď o titru vyšším než 1:400. Je významné, že sérum ze šimpanzů, kterým byl podáván sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) „nereaguje" se sTNFR-I 4D/C105db ani se sTNFR-I 4D/N105, pokud jsou tyto proteiny užity jako záchytné (capture) antigeny na ELISA destičce (tab. 13). Totéž je pozorováno u zvířat imunizovaných sTNFR-I 4D/C105db, sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33 kDa) a podáván sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG(33 kDa)(tab.13)

Tabulka 12

Imunitní reakce I_gG

Titr (počet šimpanzů)

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

* Pozn.: Titr pozorován s použitím sTNFR-I 4D/C105db jako vazebné protilátky

Tabulka 13

Imunitní výsledky šimpanzů

I_gG (≥ 1:400 titr)

Počet zvířat : n=3	sTNFR-I 2.6D/C105db	sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa)	sTNFR-I 4D/N105-t-BuPEG (33kDa)	sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG (33kDa)	sTNFR-I 4D/C105db	sTNFR-I 4D/N105
sTNFR-I 2.6D/N105-t-BuPEG (33kDa)		3/3 neg			3/3 neg	3/3 neg
sTNFR-I 2.6D/C105db	3/3 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) jsou v anestezii imunizovány na šlapce levé zadní končetiny (den 0) 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 je podán 0,1 ml PBS/CFA emulze bez MBP do šlapky levé zadní končetiny.

Klinické hodnocení nemoci je založeno na obvyklém bodovacím systému 0-5. 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. Injekce rekombinantních preparátů sTNFR-I nebo slepého vzorku jsou podávány S.C. v dávce 1 mg/kg každý další den počínaje dnem 9 po imunizaci. Pokus je 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 jsou srovnány s hodnotami kontrolní skupiny pomocí Mannova-Whitneyova testu.

Zvířata, kterým byl podán slepý vzorek, projevují začátek onemocnění kolem desátého dne, nemoc vrcholila 16. den a potom ustupovala. sTNFR-I 4D/C106db zmírňuje klinické příznaky o zhruba 73% ve srovnání se zvířaty léčenými slepým vzorkem. sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33 kDa) rovněž zmírňuje klinické příznaky o zhruba 85%. sTNFR-I 4D/C105-t-BuPEG(33 kDa) a sTNFR-I 2,6D/N105-t-BuPEG(33 kDa) jsou 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.

11.10.99

Tento vynález byl popsán výše obecně i v podobě doporučených konkrétních postupů a pokusů. Je však zřejmé, že odborníci mohou navrhnout na základě tohoto popisu další variace a modifikace.

11.10.99

SEZNAM SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE:

(i) ŽADATEL: AMGEN INC.

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Zkrácené rozpustné receptory faktoru nekrotizujícího tumory typu I a typu II

(iii) POČET SEKVENCÍ: 81

(iv) POŠTOVNÍ ADRESA:
(A) ADRESÁT: AMGEN INC.
(B) ULICE: 1840 De Havilland Drive
(C) MĚSTO: Thousand Oaks
(D) STÁT: California
(E) ZEMĚ: United States of America
(F) ZIP (PSČ): 91320-1789

(v) FORMA VHODNÁ PRO POČÍTAČOVÉ ZPRACOVÁNÍ:
(A) TYP MEDIA: Floppy disk
(B) POČÍTAČ: IBM PC compatible
(C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) SOUČASNÉ ÚDAJE O ŽÁDOSTI:
(A) ČÍSLO ŽÁDOSTI:
(B) DATUM REGISTRACE:
(C) KLASIFIKACE:

(vii) PŘEDCHÁZEJÍCÍ ÚDAJE O ŽÁDOSTI:
(A) ČÍSLO ŽÁDOSTI: US 60/021,443
(B) DATUM REGISTRACE: 9.7.1996

(vii) PŘEDCHÁZEJÍCÍ ÚDAJE O ŽÁDOSTI:
(A) ČÍSLO ŽÁDOSTI: US 60/032,534
(B) DATUM REGISTRACE: 6.12.1996

(vii) PŘEDCHÁZEJÍCÍ ÚDAJE O ŽÁDOSTI:
(A) ČÍSLO ŽÁDOSTI: US 60/037,737
(B) DATUM REGISTRACE: 23.1.1997

(vii) PŘEDCHÁZEJÍCÍ ÚDAJE O ŽÁDOSTI:
(A) ČÍSLO ŽÁDOSTI: US 60/039,314
(B) DATUM REGISTRACE: 7.2.1997

(vii) PŘEDCHÁZEJÍCÍ ÚDAJE O ŽÁDOSTI:
(A) ČÍSLO ŽÁDOSTI: US 60/039,792
(B) DATUM REGISTRACE: 4.3.1997

(viii) INFORMACE O PRAVNÍM ZÁSTUPCI/AGENTOVI:
(A) JMÉNO: Zindrick, Thomas D.
(B) ČÍSLO REGISTRACE: 32,185
(C) REFERENCE/POČET SOUDNÍCH PŘÍPADŮ: A-415E

(2) Informace o SEQ ID NO:1:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 483 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/Klíč: CDS

(B) Umístění: 1..483

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

(2) Informace o SEQ ID NO:2:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 161 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: linearní

(ii) Typ molekuly: protein

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

(2) Informace o SEQ ID NO:3:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 332 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/Klíč: CDS

(B) Umístění: 4..324

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: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 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 TGC TGA TAGGATCC              332
Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Cys  *
                 100                 105
```

(2) Informace o SEQ ID NO:4:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 107 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

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

(2) Informace o SEQ ID NO:5:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 339 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/Klíč: CDS

(B) Umístění: 4..333

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:5:

```
CAT ATG GAC AGC GTT TGC CCC CAA GGA AAA TAT ATC CAC CCT CAA AAT      48
    Met Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn
      1               5                  10                  15

AAT TCG ATT TGC TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT      96
Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn
                20                  25                  30

GAC TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG AGC     144
Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser
            35                  40                  45

GGC TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC CTC AGC TGC     192
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys
        50                  55                  60

TCC AAA TGC CGA AAG GAA ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA     240
Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr
    65                  70                  75

GTG GAC CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT     288
Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His
80                  85                  90                  95

TAT TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC AAT TGC TCT CTG TAA         333
Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu  *
                100                 105                 110

AAGCTT                                                             339
```

(2) Informace o SEQ ID NO:6:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 110 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: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                 110
```

(2) Informace o SEQ ID NO:7:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 333 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/Klíč: CDS

(B) Umístění: 4..324

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

(2) Informace o SEQ ID NO:8:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 107 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

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

(2) Informace o SEQ ID NO:9:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 285 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/Klíč: CDS

(B) Umístění: 4..279

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

(2) Informace o SEQ ID NO:10:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 92 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: linearní

(ii) Typ molekuly: protein

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

(2) Informace o SEQ ID NO:11:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 315 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/Klíč: CDS

(B) Umístění: 4..309

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

(2) Informace o SEQ ID NO:12:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 102 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: linearní

(ii) Typ molekuly: protein

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

(2) Informace o SEQ ID NO:13:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 294 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/Klíč: CDS

(B) Umístění: 4..288

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:13:

```
CAT ATG TCG ATT AGC TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC      48
    Met Ser Ile Ser Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr
     1               5                  10                  15

AAT GAC TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG      96
Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu
                20                  25                  30
```

```
AGC GGC TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC CTC AGC      144
Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser
            35                  40                  45

TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC      192
Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys
        50                  55                  60

ACA GTG GAC CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG      240
Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg
    65                  70                  75

CAT TAT TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC AAT TGC TCT CTG TAA      288
His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu  *
80                  85                  90                  95

AAGCTT                                                              294
```

(2) Informace o SEQ ID NO:14:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 95 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: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                  95
```

(2) Informace o SEQ ID NO:15:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 4 aminokyseliny

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:15:

Asn Ser Ile Cys
1

(2) Informace o SEQ ID NO:16:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 5 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:16:

Asn Asn Ser Ile Cys
1 5

(2) Informace o SEQ ID NO:17:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 6 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:17:

Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5

(2) Informace o SEQ ID NO:18:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 7 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:18:

Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5

(2) Informace o SEQ ID NO:19:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 8 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:19:

His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5

(2) Informace o SEQ ID NO:20:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 9 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:20:

Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
1 5

(2) Informace o SEQ ID NO:21:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 10 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:21:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:22:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 11 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:22:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:23:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 12 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:23:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:24:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 13 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:24:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:25:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 14 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:25:

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

11.10.99

(2) Informace o SEQ ID NO:26:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 15 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:26:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:27:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 16 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:27:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:28:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 17 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:28:

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

Cys

(2) Informace o SEQ ID NO:29:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 18 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEO ID NO:29:

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

Ile Cys

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 4 aminokyseliny

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEO ID NO:30:

Phe Cys Cys Ser
1

(2) Informace o SEQ ID NO:31:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 5 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:31:

Phe Cys Cys Ser Leu
1 5

(2) Informace o SEQ ID NO:32:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 6 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:32:

Phe Cys Cys Ser Leu Cys
1 5

(2) Informace o SEQ ID NO:33:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 7 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:33:

Phe Cys Cys Ser Leu Cys Leu
1 5

(2) Informace o SEQ ID NO:34:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 705 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/Klíč: CDS

(B) Umístění: 1..705

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

11.10.99

```
AGC AAG TGC TCG CCG GGC CAA CAT GCA AAA GTC TTC TGT ACC AAG ACC          144
Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
          35                  40                  45

TCG GAC ACC GTG TGT GAC TCC TGT GAG GAC AGC ACA TAC ACC CAG CTC          192
Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
      50                  55                  60

TGG AAC TGG GTT CCC GAG TGC TTG AGC TGT GGC TCC CGC TGT AGC TCT          240
Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
 65                  70                  75                  80

GAC CAG GTG GAA ACT CAA GCC TGC ACT CGG GAA CAG AAC CGC ATC TGC          288
Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
                 85                  90                  95

ACC TGC AGG CCC GGC TGG TAC TGC GCG CTG AGC AAG CAG GAG GGG TGC          336
Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
            100                 105                 110

CGG CTG TGC GCG CCG CTG CGC AAG TGC CGC CCG GGC TTC GGC GTG GCC          384
Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
        115                 120                 125

AGA CCA GGA ACT GAA ACA TCA GAC GTG GTG TGC AAG CCC TGT GCC CCG          432
Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
    130                 135                 140

GGG ACG TTC TCC AAC ACG ACT TCA TCC ACG GAT ATT TGC AGG CCC CAC          480
Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145                 150                 155                 160

CAG ATC TGT AAC GTG GTG GCC ATC CCT GGG AAT GCA AGC AGG GAT GCA          528
Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Arg Asp Ala
                165                 170                 175

GTC TGC ACG TCC ACG TCC CCC ACC CGG AGT ATG GCC CCA GGG GCA GTA          576
Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
            180                 185                 190

CAC TTA CCC CAG CCA GTG TCC ACA CGA TCC CAA CAC ACG CAG CCA ACT          624
His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
        195                 200                 205

CCA GAA CCC AGC ACT GCT CCA AGC ACC TCC TTC CTG CTC CCA ATG GGC          672
Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
    210                 215                 220

CCC AGC CCC CCA GCT GAA GGG AGC ACT GGC GAC                              705
Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp
225                 230                 235
```

(2) Informace o SEQ ID NO:35:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 235 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

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

(2) Informace o SEQ ID NO:36:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 4 aminokyseliny

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:36:

Ala Gln Met Cys
1

(2) Informace o SEQ ID NO:37:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 5 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:37:

Thr Ala Gln Met Cys
1 5

(2) Informace o SEQ ID NO:38:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 6 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:38:

Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5

(2) Informace o SEQ ID NO:39:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 7 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii)Typ molekuly: protein

(xi)Popis sekvence: SEQ ID NO:39:

Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5

(2)Informace o SEQ ID NO:40:

(i)Charakteristika sekvence

(A)Délka: 8 aminokyselin

(B)Typ: aminokyselina

(C)Počet řetězců: neznámý

(D)Topologie: neznámá

(ii)Typ molekuly: protein

(xi)Popis sekvence: SEQ ID NO:40:

Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5

(2)Informace o SEQ ID NO:41:

(i)Charakteristika sekvence

(A)Délka: 9 aminokyselin

(B)Typ: aminokyselina

(C)Počet řetězců: neznámý

(D)Topologie: neznámá

(ii)Typ molekuly: protein

(xi)Popis sekvence: SEQ ID NO:41:

Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys
1 5

(2)Informace o SEQ ID NO:42:

(i)Charakteristika sekvence

(A)Délka: 10 aminokyselin

(B)Typ: aminokyselina

(C)Počet řetězců: neznámý

(D)Topologie: neznámá

(ii)Typ molekuly: protein

(xi)Popis sekvence: SEQ ID NO:42

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

(2)Informace o SEQ ID NO:43:

(i)Charakteristika sekvence

(A)Délka: 11 aminokyselin

(B)Typ: aminokyselina

(C)Počet řetězců: neznámý

(D)Topologie: neznámá

(ii)Typ molekuly: protein

(xi)Popis sekvence: SEQ ID NO:43:

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

(2)Informace o SEQ ID NO:44:

(i)Charakteristika sekvence

(A)Délka: 12 aminokyselin

(B)Typ: aminokyselina

(C)Počet řetězců: neznámý

(D)Topologie: neznámá

(ii)Typ molekuly: protein

(xi)Popis sekvence: SEQ ID NO:44:

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

(2)Informace o SEQ ID NO:45:

(i)Charakteristika sekvence

(A)Délka: 13 aminokyselin

(B)Typ: aminokyselina

(C)Počet řetězců: neznámý

(D)Topologie: neznámá

(ii)Typ molekuly: protein

(xi)Popis sekvence: SEQ ID NO:45:

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

(2)Informace o SEQ ID NO:46:

(i)Charakteristika sekvence

(A)Délka: 14 aminokyselin

(B)Typ: aminokyselina

(C)Počet řetězců: neznámý

(D)Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:46:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:47:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 15 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:47:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:48:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 16 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:48:

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

(2) Informace o SEQ ID NO:49:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 17 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

11.10.99

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:49:

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

Cys

(2) Informace o SEQ ID NO:50:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 18 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:50:

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

Met Cys

(2) Informace o SEQ ID NO:51:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 19 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:51:

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

Gln Met Cys

(2) Informace o SEQ ID NO:52:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 20 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

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

(2) Informace o SEQ ID NO:53:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 21 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

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

(2) Informace o SEQ ID NO:54:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 22 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

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

11.10.96

(2) Informace o SEQ ID NO:55:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 23 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: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

(2) Informace o SEQ ID NO:56:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 24 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: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

(2) Informace o SEQ ID NO:57:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 25 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: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

(2) Informace o SEQ ID NO:58:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 26 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: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

(2) Informace o SEQ ID NO:59:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 27 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: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

(2) Informace o SEQ ID NO:60:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 28 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: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

(2) Informace o SEQ ID NO:61:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 29 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: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

(2) Informace o SEQ ID NO:62:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka:30 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: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

(2) Informace o SEQ ID NO:63:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 31 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

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

(2) Informace o SEQ ID NO:64:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 4 aminokyseliny

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:64:

```
Ala Pro Leu Arg
1
```

(2) Informace o SEQ ID NO:65:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 5 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:65:

```
Ala Pro Leu Arg Lys
1               5
```

(2) Informace o SEQ ID NO:66:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 6 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:66:

```
Ala Pro Leu Arg Lys Cys
1               5
```

(2) Informace o SEQ ID NO:67:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 7 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:67:

Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
1 5

(2) Informace o SEQ ID NO:68:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 31 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:68:

GGTTAGCCAT ATGGACAGCG TTTGCCCCCA A 31

(2) Informace o SEQ ID NO:69:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 33 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:69:

CCCAAGCTTT TACAGAGAGC AATTGAAGCA CTG 33

(2) Informace o SEQ ID NO:70:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 40 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:70:

ACTCGAGGAT CCGCGGATAA ATAAGTAACG ATCCGGTCCA 40

(2) Informace o SEQ ID NO:71:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 41 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:71:

CAGGTCGGAT CCTATCAGCA GAAGCACTGG AAAAGGTTTT C 41

(2) Informace o SEQ ID NO:72:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 31 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:72:

GGTTAGCCAT ATGGACAGCG TTTGCCCCCA A 31

(2) Informace o SEQ ID NO:73:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 34 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(2) Informace o SEQ ID NO:77:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 33 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:77:

CCCAAGCTTT TACAGAGAGC AATTGAAGCA CTG 33

(2) Informace o SEQ ID NO:78:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 30 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:78

CCCCATATGT GTACCAAGTG CCACAAAGGA 30

(2) Informace o SEQ ID NO:79:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 33 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:79:

CCCAAGCTTT TACAGAGAGC AATTGAAGCA CTG 33

(2) Informace o SEQ ID NO:80:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 31 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:73:

CGCGGATCCC TATTAATTGA AGCACTGGAA AAGG 34

(2) Informace o SEQ ID NO:74:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 30 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:74:

CCCCATATGT ATATCCACCC TCAAAATAAT 30

(2) Informace o SEQ ID NO:75:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 33 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:75:

CCCAAGCTTT TACAGAGAGC AATTGAAGCA CTG 33

(2) Informace o SEQ ID NO:76:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 38 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:76:

CCCCATATGT CGATTAGCTG TACCAAGTGC CACAAAGG 38

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:80:

GGTTAGCCAT ATGGACAGCG TTTGCCCCCA A 31

(2) Informace o SEQ ID NO:81:

(i) Charakteristika sekvence

(A) Délka: 33 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Počet řetězců: neznámý

(D) Topologie: neznámá

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:81:

CCCAAGCTTT TAGGTGCACA CGGTGTTCTG TTT 33

11.10.99

PV 4-99

69844

P A T E N O V É N Á R O K Y

1. Zkrácené sTNFR mající následující vzorec: R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2, kde [Cys^{19}-Cys^{103}] představuje zbytky 19 až 103 sTNRF-I (schéma číslování aminokyselinových zbytků je uvedeno na Obr.1 (SEQ ID NO:2) k usnadnění srovnání), a kde dále R_1 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou amino skupinu Cys^{19} nebo aminokyselinového zbytku (či zbytků) aminokyselinového konce vybraných 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)
HPQMMSIC (SEQ ID NO:19)
IHPQNNSIC (SEQ ID NO:20)
YIHPQNNSIC (SEQ ID NO:21)
KYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:22)
GKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:23)
QGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:24)
PQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:25)
CPQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:26)
VCPQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:27)
SVCPQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:28)
DSVCPQGKYIHPQNNSIC (SEQ ID NO:29),

a kde R_2 představuje karboxyskupinu Cys^{103} nebo karboxyskupinu karboxykoncového aminokyselinového zbytku vybraného ze skupiny:

F
FC
FCC
FCCS (SEQ ID NO:30)
FCCSL (SEQ ID NO:31)
FCCSLC (SEQ ID NO:32)

FCCSLCL (SEQ ID NO:33)

a od nich odvozených obměn nebo derivátů, ale za předpokladu, že když R_1 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu aminokyselinové sekvence VCPQGKYIHPQNNSIC nebo odtud odvozené N terminální zkrácení 1 až 15 zbytků, pak R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-R_2 není přidaná varianta mající vzorec R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FCCSLCL-R_3, kde R_3 reprezentuje karboxyskupinu aminokyselinových zbytků Asn^{111}-Asn^{161} Obr.1 nebo zkrácení na karboxylovém konci Asn^{111}-Asn^{161} Obr.1.

2. Vazebný protein nekrotizující tumory podle nároku 1, vybraný ze skupiny skládající se z sTNFR-I 2.6D/C105, sTNFR-I 2.6D/106, sTNFR-I 2.6D/N105, sTNFR-I 2.3D/d8, sTNFR-I 2.3D/d18, sTNFR-I 2.3D/d15 nebo od nich odvozených obměn nebo derivátů.

3. Zkrácený sTNFR mající vzorec R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5, kde [Cys^{32}-Cys^{115}] představuje zbytky Cys^{32} až Cys^{115} celkového 40 kDa inhibitoru TNF plné délky, schéma číslování aminokyselinových zbytků je uvedeno na Obr.8 (SEQ ID NO:35) k usnadnění srovnání. Kde dále R_4 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu Cys^{32} nebo aminokyselinového zbytku (či zbytků) aminokyselinového konce vybraných ze skupiny:

C
MC
QMC
AQMC (SEQ ID NO:36)
TAQMC (SEQ ID NO:37)
QTAQMC (SEQ ID NO:38)
DQTAQMC (SEQ ID NO:39)
YDQTAQMC (SEQ ID NO:40)
YYDQTAQMC (SEQ ID NO:41)
EYYDQTAQMC (SEQ ID NO:42)
REYYDQTAQMC (SEQ ID NO:43)
LREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:44)
RLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:45)

CRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:46)
TCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:47)
STCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:48)
GSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:49)
PGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:50)
EPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:51)
PEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:52)
APEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:53)
YAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:54)
PYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:55)
TPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:56)
FTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:57)
AFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:58)
VAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:59)
QVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:60)
AQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:61)
PAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:62)
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMC (SEQ ID NO:63)

a kde R_5 reprezentuje karboxyskupinu Cys^{115} nebo karboxyskupinu karboxykoncového aminokyselinového zbytku vybraného 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 od nich odvozených obměn, ale za předpokladu, že když R_4 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu aminokyselinové sekvence TCRLREYYDQTAQMC nebo odtud odvozené N terminální zkrácení 1 až 15 zbytků, pak R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-R_5 není přidaná varianta mající vzorec R_4-[Cys^{32}-Cys^{115}]-APLRKCR-R_6, kde R_6 reprezentuje karboxyskupinu aminokyselinových zbytků Pro^{123}-Thr^{179} Obr.8 nebo zkrácení na karboxylovém konci Pro^{123}-Thr^{179} Obr.8.

4. Vazebný protein nekrotizující tumory podle kteréhokoliv nároku 1 až 3, kde jsou uvedené aminokyselinové sekvence neglykosilované.

5. Vazebný protein nekrotizující tumory podle kteréhokoliv nároku 1 až 3, kde jsou uvedené aminokyselinové sekvence glykosilované.

6. Vazebný protein nekrotizující tumory podle kteréhokoliv nároku 1 až 5, kde je protein konjugovaný s ve vodě rozpustným polymerem.

7. Polyvalentní vazebný protein nekrotizující tumory obsahující nejméně jeden vazebný protein nekrotizující tumory podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6.

8. Polyvalentní vazebný protein nekrotizující tumory mající vzorec R_1-X-R_2 , kde: X se skládá z linkeru (spojovníku) a uvedený linker je ve vodě rozpustný polymer a kde R_1 A R_2 jsou biologicky aktivní molekuly kovalentně vázané na uvedený ve vodě rozpustný polymer a kde alespoň jeden z R_1 a R_2 je vazebný protein nekrotizující tumory podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6.

9. Polyvalentní vazebný protein nekrotizující tumory podle nároku 8, kde ve vodě rozpustný polymer je polyetylenglykol.

10. Polyvalentní vazebný protein nekrotizující tumory podle nároku 9, kde je protein vybrán ze skupiny skládající se z sTNFR-I 2.6D/C105db a sTNFR-I 2.6D/C106db.

11. Vazebný protein nekrotizující tumory podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 k použití léčení nemoci zprostředkované TNF.

12. Vazebný protein nekrotizující tumory podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 použitý k léčení artritidy.

13. Polynukleotid kódující vazebný protein nekrotizující tumory podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3.

14. Sekvence nukleové kyseliny obsahující vazebný protein faktoru nekrotizujícího tumory kódovaný nukleotidovou sekvencí vybranou z následujících:

a) sekvence cDNA jak je ukázána na Obr.2

b) sekvence cDNA jak je ukázána na Obr.3

c) sekvence cDNA jak je ukázána na Obr.4

d) sekvence cDNA jak je ukázána na Obr.5

e) sekvence cDNA jak je ukázána na Obr.6

f) sekvence cDNA jak je ukázána na Obr.7

g) sekvence, která je degenerovaná v kódujících oblastech nebo jejich částech sekvencí a),b), c), d), e) a f)

h) sekvence, které hybridizují se sekvencemi a),b), c), d), e) a f) a

i) sekvence, které jsou komplementární k sekvencím a),b), c), d), e) a f),

ale za předpokladu, že nukleová kyselina nekóduje protein mající vzorec R_1-[Cys^{19}-Cys^{103}]-FCCSLCL-R_3, kde [Cys^{19}-Cys^{103}] představuje zbytky 19 až 103 sTNRF-I (schéma číslování aminokyselinových zbytků je uvedeno na Obr.1 (SEQ ID NO:2) k usnadnění srovnání), kde dále R_1 představuje methionylovanou nebo nemethionylovanou aminoskupinu aminokyselinové sekvence obsahující NNSIC a kde R_3 představuje karboxyskupinu

aminokyselinových zbytků Asn^{111}-Asn^{161} Obr.1 nebo zkrácení na karboxylovém konci Asn^{111}-Asn^{161} Obr.1.

15. Polynukleotid mající sekvenci jak je vysvětlena na Obr.2,3,4,5,6,7, nebo mající jejich část.

16. Vektor tvořený polynukleotidem podle kteréhokoliv z nároků 13 až 15 účinně spojený s expresní kontrolní sekvencí.

17. Prokaryotická nebo eukaryotická hostitelská buňka obsahující polynukleotid podle kteréhokoliv z nároků 13 až 15.

18. Způsob tvořený rostoucími hostitelskými buňkami podle nároku 17 ve vhodném živném mediu a, volitelně, izolací uvedeného zkráceného sTNFR z uvedených buněk nebo uvedeného media

19. Způsob produkce vazebného proteinu nekrotizujícího tumory podle nároku 18, kde uvedenými hostitelskými buňkami jsou buňky *E.coli*.

20. Způsob produkce vazebného proteinu faktoru nekrotizujícího tumory podle nároku 18, kde uvedenými hostitelskými buňkami jsou buňky vaječníků čínského křečka.

21. Způsob zahrnující následující kroky:

a) pěstování prokaryotických nebo eukaryotických hostitelských buněk podle nároku 17

b) udržování uvedených hostitelských buněk za podmínek dovolujících expresi zkráceného sTNFR uvedenými hostitelskými buňkami a

c) volitelně izolaci zkráceného sTNFR exprimovaného uvedenými hostitelskými buňkami.

22. Vazebný protein nekrotizující tumory, který je produktem rekombinantní exprese prokaryotických nebo eukaryotických hostitelských buněk obsahujících polynukleotid podle kteréhokoliv z nároků 13 až 15.

23. Farmaceutické složení obsahující vazebný protein faktoru nekrotizujícího tumory podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 ve spojení s farmaceuticky akceptovatelným nosičem.

24. Farmaceutické složení obsahující vazebný protein faktoru nekrotizujícího tumory produkovaný podle způsobu nároku 18 ve spojení s farmaceuticky akceptovatelným nosičem.

25. Farmaceutické složení obsahující vazebný protein nekrotizující tumory produkovaný podle způsobu nároku 21 ve spojení s farmaceuticky akceptovatelným nosičem.

26. Způsob léčení nemocí způsobených TNF zahrnující podávání farmaceutických směsí podle nároků 23 až 25 pacientům.

27. Způsob nároku 26, kde nemocí způsobenou TNF je artritida.

28. Způsob přípravy farmaceutické směsi, v které je terapeuticky efektivní množství vazebného proteinu faktoru nekrotizujícího tumory podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 smíšeno s jedním nebo více farmaceuticky akceptovatelným nosičem.

29. Použití vazebného proteinu faktoru nekrotizujícího tumory podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 k léčení nemocí způsobených TNF.

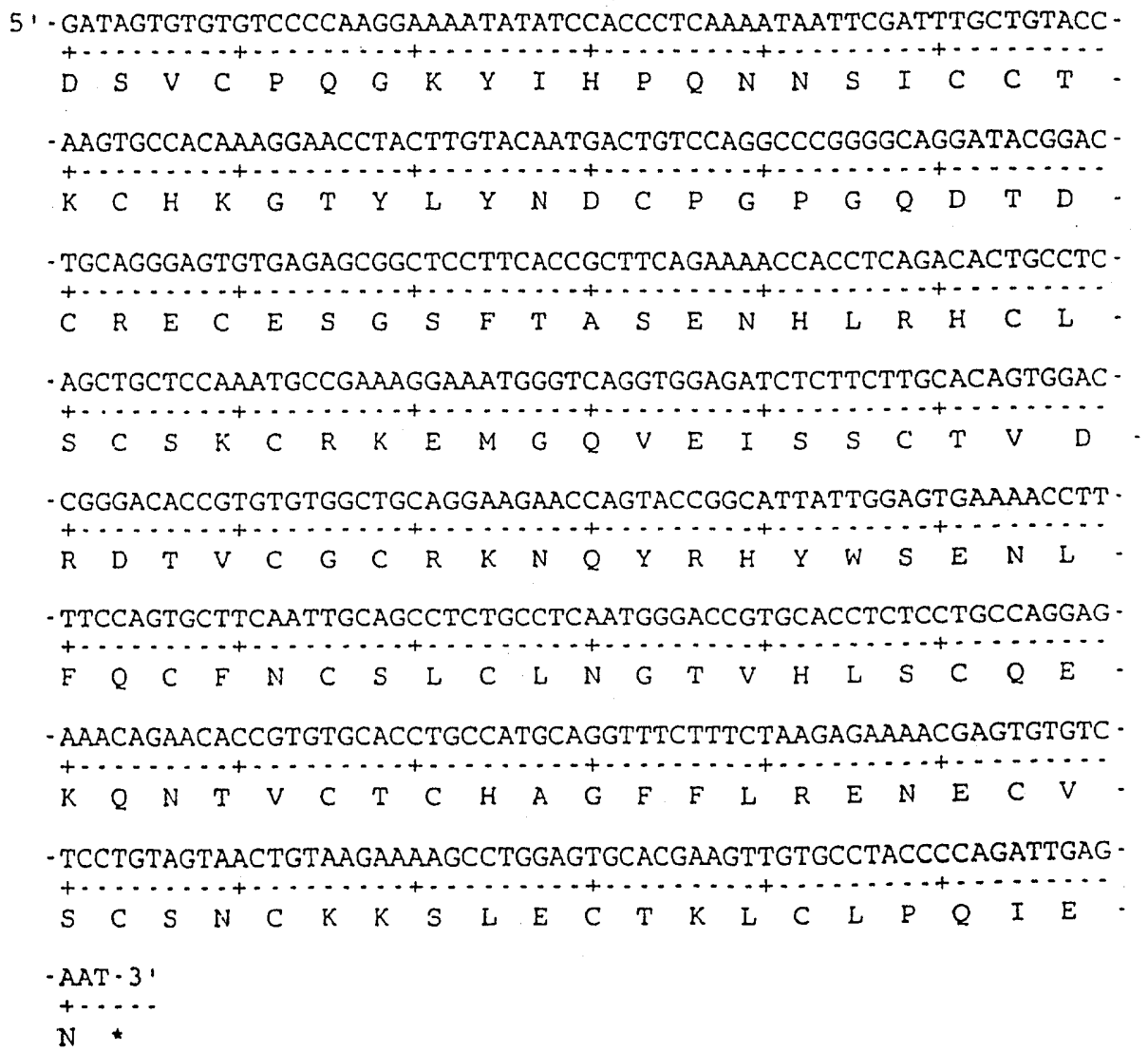
30. Použití vazebného proteinu faktoru nekrotizujícího tumory podle nároku 29 k léčení artritidy.

31. Souprava k přípravě roztoku proteinu o složení obsahující vazebný protein faktoru nekrotizujícího tumory podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 a druhou nádobu obsahující fyziologicky akceptovatelné rozpouštědlo.

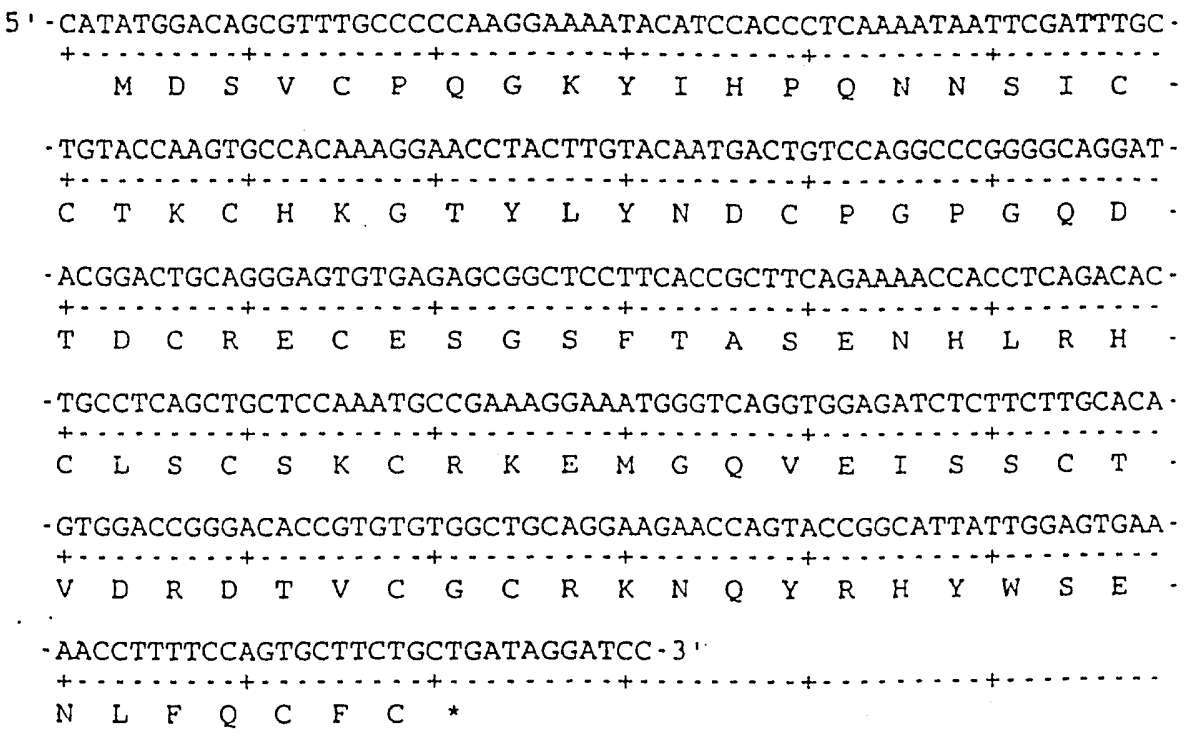
11.10.99

PV 4-99

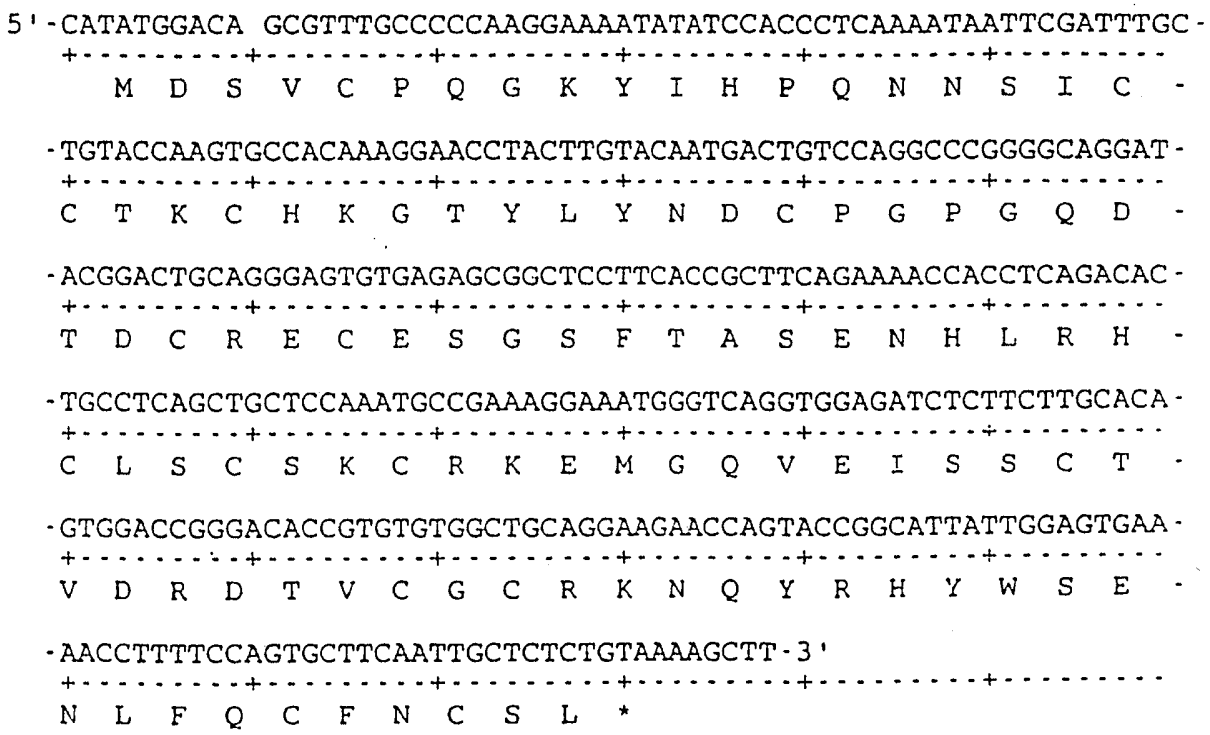
6984



Obr.1

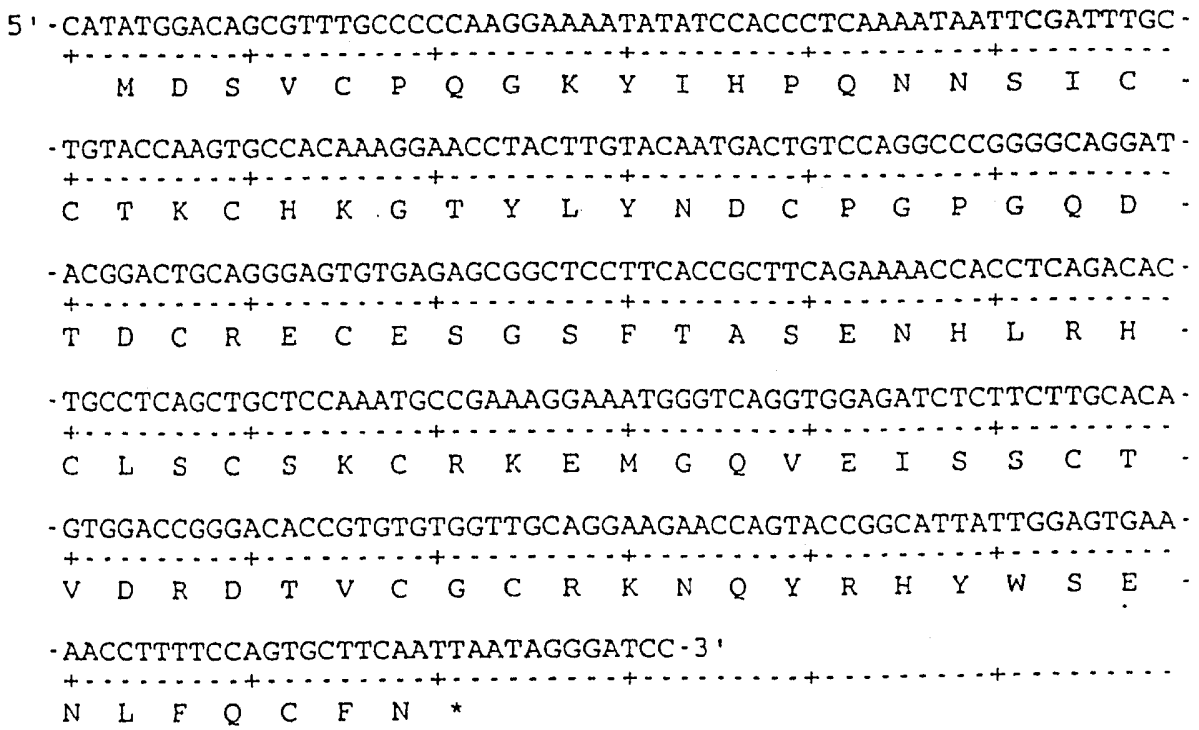

5'-CATATGGACAGCGTTTGCCCCCAAGGAAAATACATCCACCCTCAAAATAATTCGATTTGC-
M D S V C P Q G K Y I H P Q N N S I C
-TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGAT-
C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D
-ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACAC-
T D C R E C E S G S F T A S E N H L R H
-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
-AACCTTTTCCAGTGCTTCTGCTGATAGGATCC-3'
N L F Q C F C *

Obr.2


5'-CATATGGACA GCGTTTGCCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAAATAATTCGATTTGC-
M D S V C P Q G K Y I H P Q N N S I C -
-TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGAT-
C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D -
-ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACAC-
T D C R E C E S G S F T A S E N H L R H -
-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 *

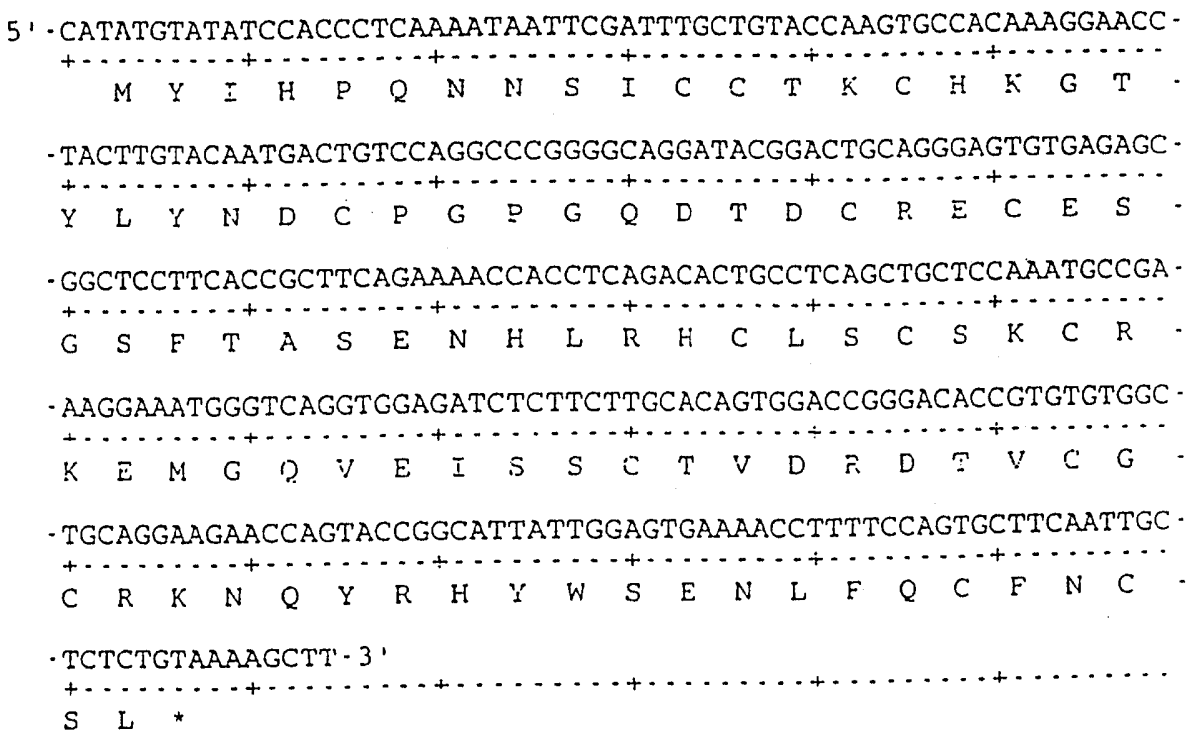
Obr.3

11.10.99


5'-CATATGGACAGCGTTTGCCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAAATAATTCGATTTGC-
M D S V C P Q G K Y I H P Q N N S I C
-TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGAT-
C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D
-ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACAC-
T D C R E C E S G S F T A S E N H L R H
-TGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTGCACA-
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 *

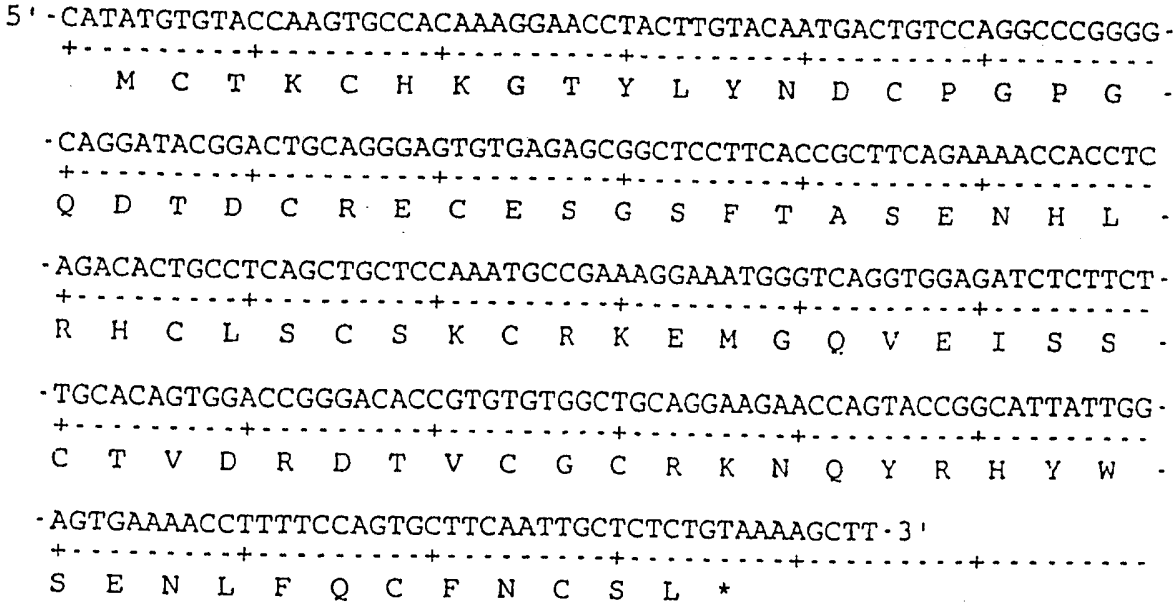
Obr.4

11.10.99


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

11.10.99


5'-CATATGTGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGG-
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 *

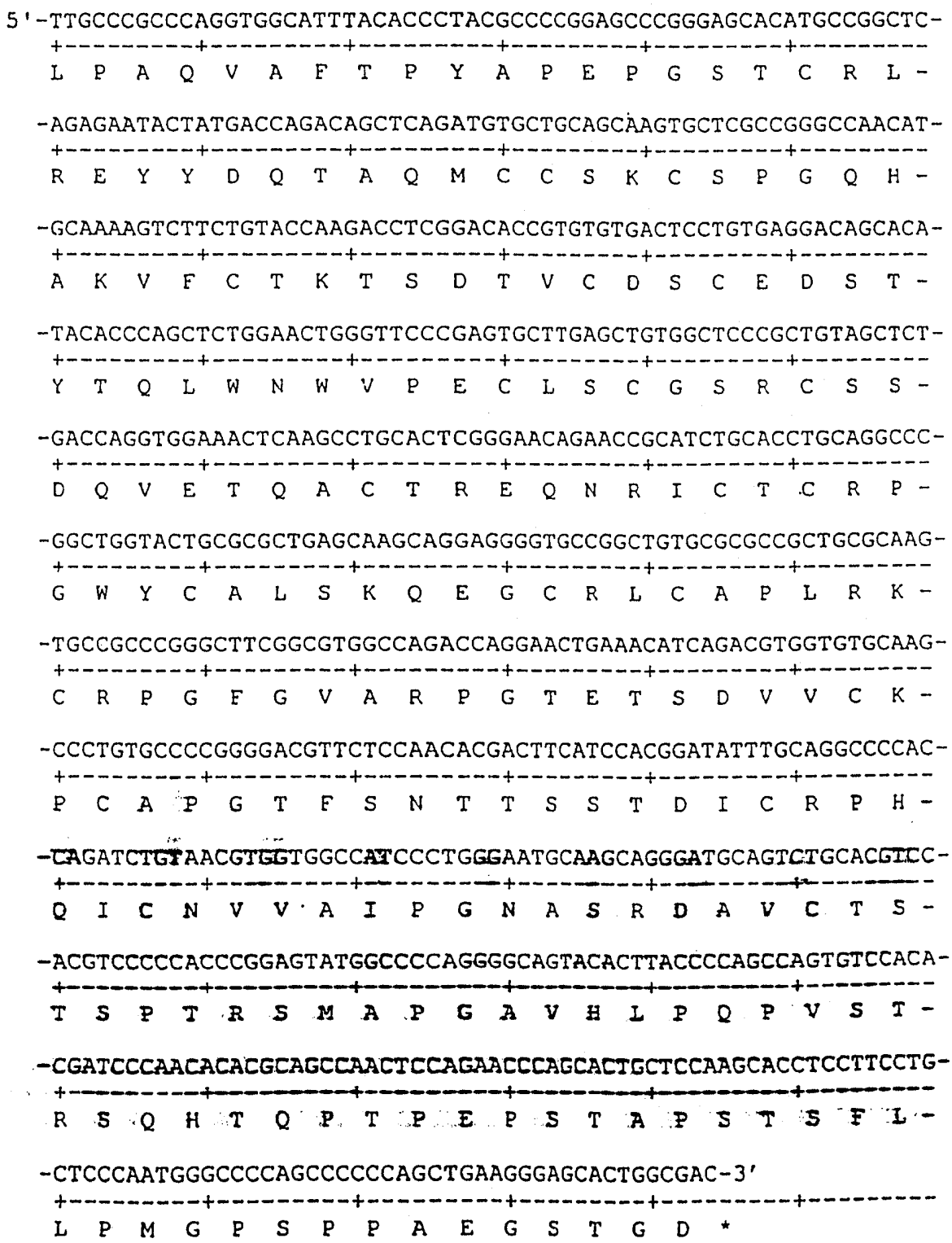
Obr.6

11.10.99

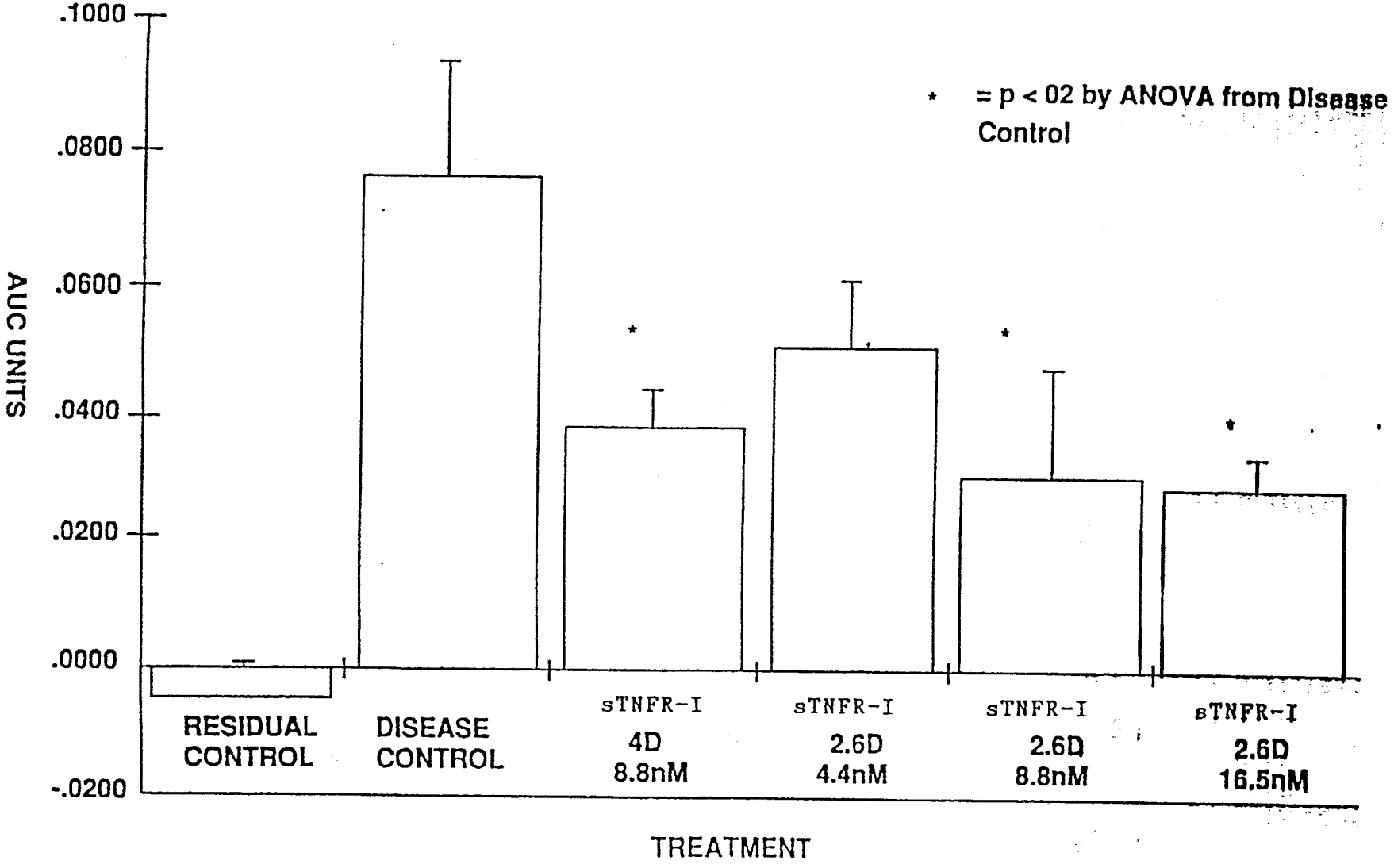
5'-CATATGTCGATTAGCTGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCA-
M S I S C T K C H K G T Y L Y N D C P
-GGCCCGGGGCAGGATACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAA-
G P G Q D T D C R E C E S G S F T A S E
-AACCACCTCAGACACTGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAG-
N H L R H C L S C S K C R K E M G Q V E
-ATCTCTTCTTGCACAGTGGACCGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGG-
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

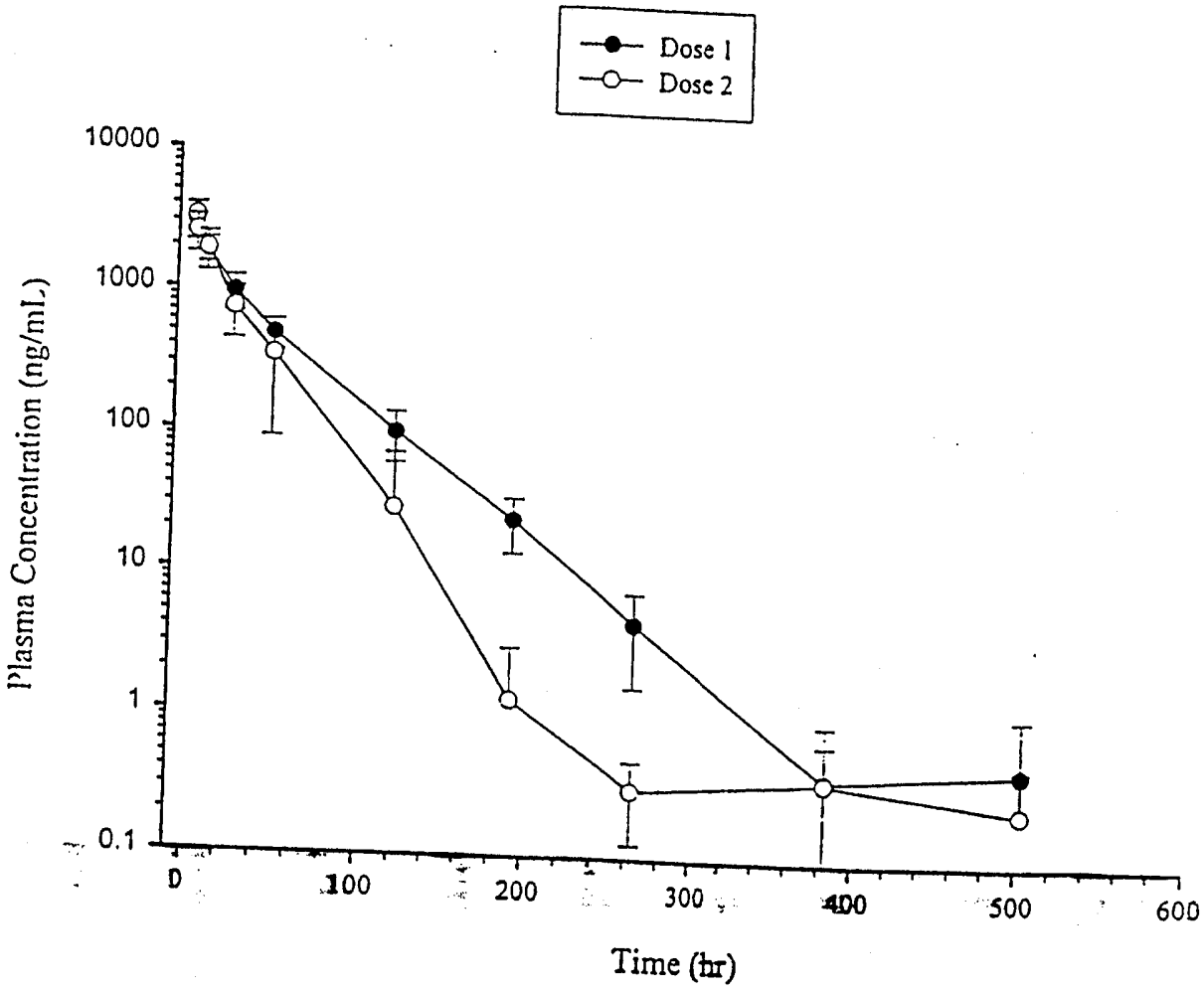
11.10.99


5'-TTGCCCGCCCAGGTGGCATTTACACCCTACGCCCCGGAGCCCGGGAGCACATGCCGGCTC-
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 -
-TACACCCAGCTCTGGAACTGGGTTCCCGAGTGCTTGAGCTGTGGCTCCCGCTGTAGCTCT-
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 -
-TGCCGCCCGGGCTTCGGCGTGGCCAGACCAGGAACTGAAACATCAGACGTGGTGTGCAAG-
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 -
-CAGATCTGTAACGTGGTGGCCATCCCTGGGAATGCAAGCAGGGATGCAGTCTGCACGTCC-
Q I C N V V A I P G N A S R D A V C T S -
-ACGTCCCCCACCCGGAGTATGGCCCCAGGGGCAGTACACTTACCCCAGCCAGTGTCCACA-
T S P T R S M A P G A V H L P Q P V S T -
-CGATCCCAACACACGCAGCCAACTCCAGAACCCAGCACTGCTCCAAGCACCTCCTTCCTG-
R S Q H T Q P T P E P S T A P S T S F L -
-CTCCCAATGGGCCCCAGCCCCCCAGCTGAAGGGAGCACTGGCGAC-3'
L P M G P S P P A E G S T G D *

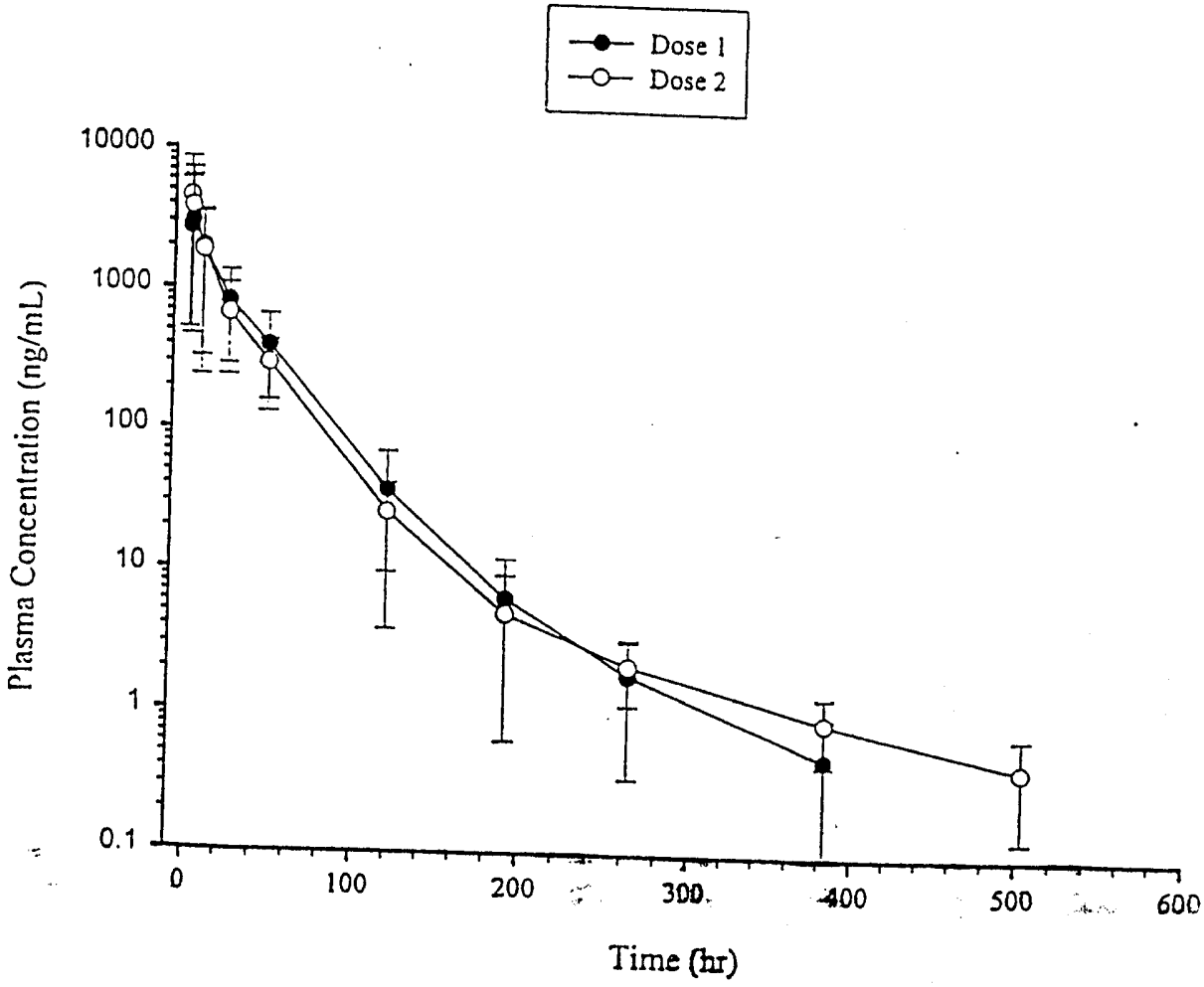
Obr.8


.1000
.0800
.0600
.0400
.0200
.0000
-.0200
AUC UNITS
* = p < 02 by ANOVA from Disease Control
RESIDUAL CONTROL
DISEASE CONTROL
sTNFR-I 4D 8.8nM
sTNFR-I 2.6D 4.4nM
sTNFR-I 2.6D 8.8nM
sTNFR-I 2.6D 16.5nM
TREATMENT

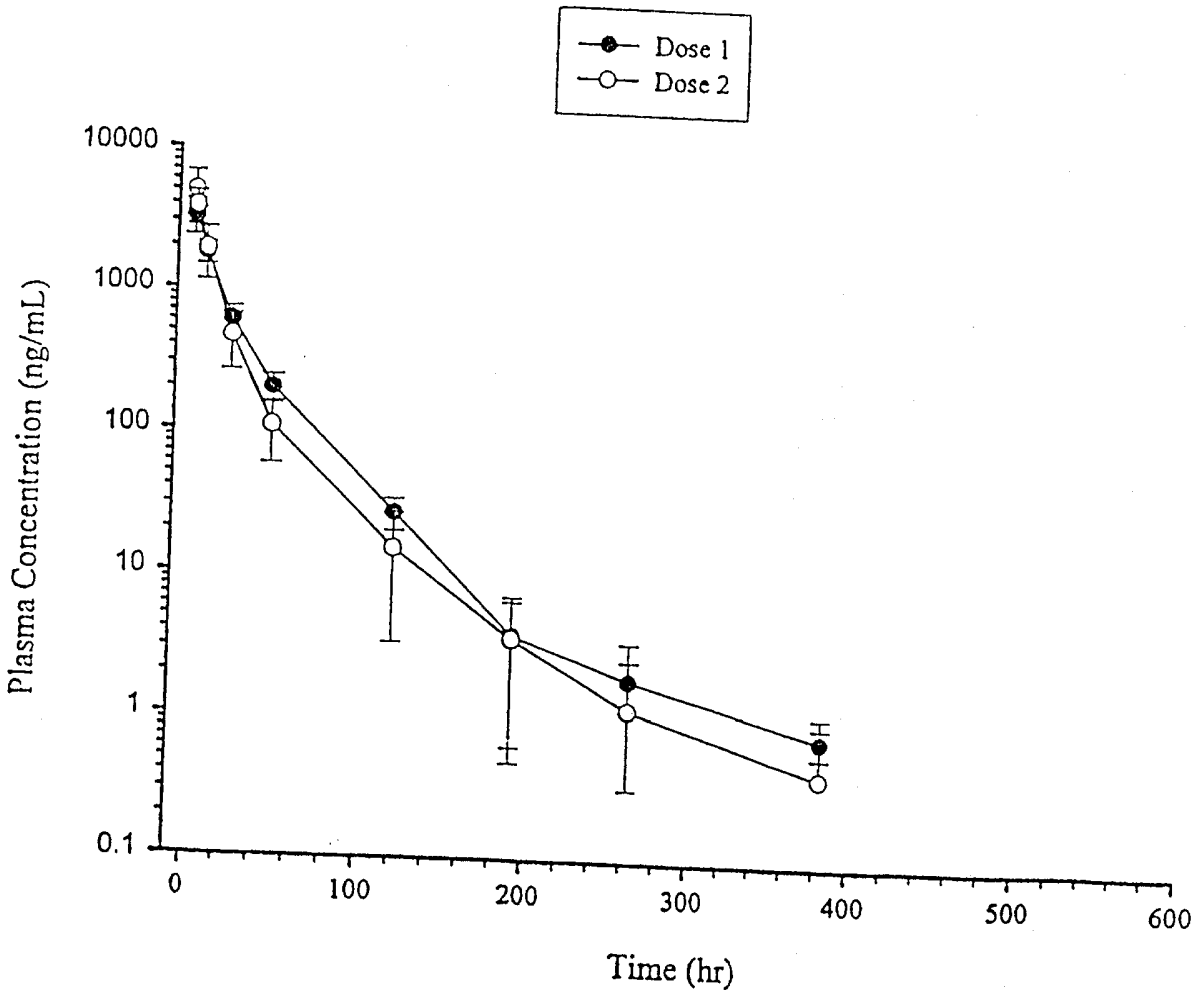
Obr.9


Dose 1
Dose 2
Plasma Concentration (ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
0
100
200
300
400
500
600
Time (hr)

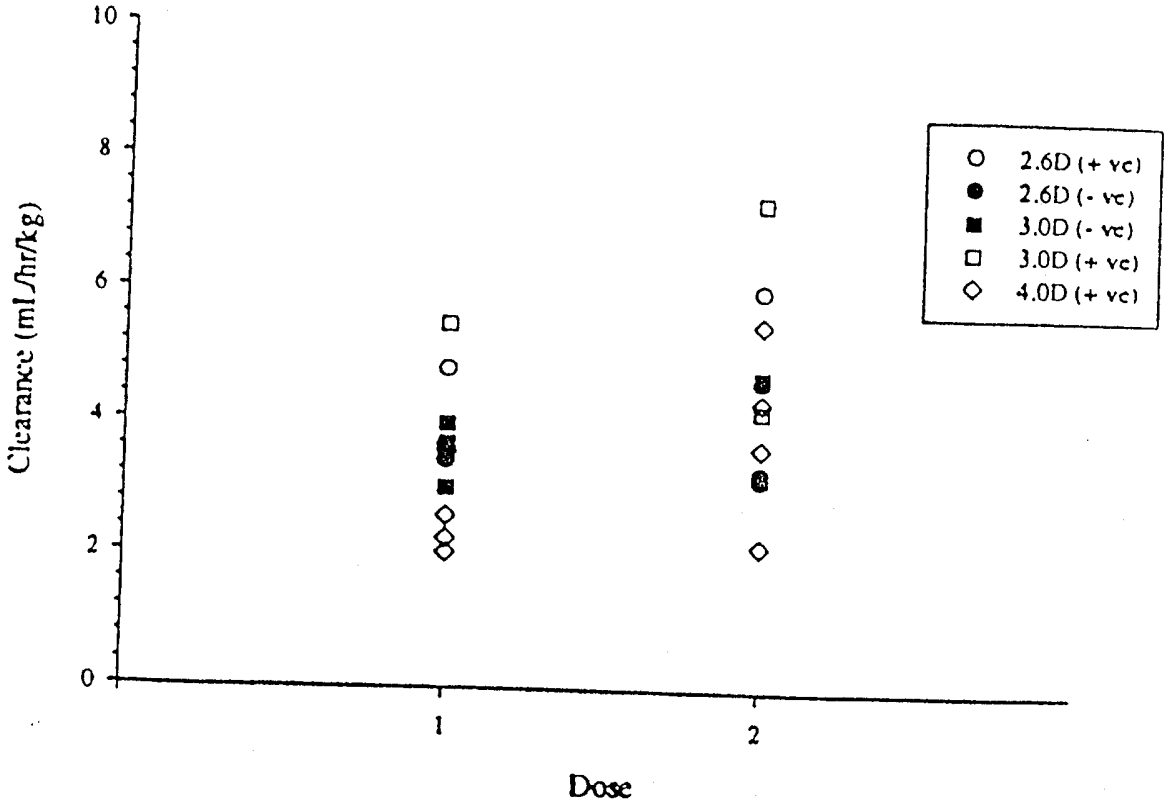
Obr.10


Dose 1
Dose 2
Plasma Concentration (ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
0
100
200
300
400
500
600
Time (hr)

Obr.11


Dose 1
Dose 2
Plasma Concentration (ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
0
100
200
300
400
500
600
Time (hr)

Obr.12


10
8
6
4
2
0
Clearance (ml/hr/kg)
1
2
Dose
2.6D (+ vc)
2.6D (- vc)
3.0D (- vc)
3.0D (+ vc)
4.0D (+ vc)

Obr.13