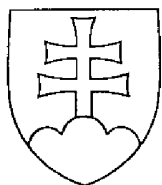


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

288287

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2015.01):

A61K 38/00
A61K 39/00
A61P 37/00
A61P 35/00
C07K 14/00

- (21) Číslo prihlášky: **229-2002**
(22) Dátum podania prihlášky: **16. 8. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/149 378, 60/181 684, 60/183 536**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **17. 8. 1999, 11. 2. 2000, 18. 2. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US, US, US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **2. 7. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **07/2002**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **5. 6. 2015**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US00/22507**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO01/12812**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(73) Majiteľ: **Biogen Idec MA Inc., Cambridge, MA, US;**
Apotech R & D, S. A., Geneva, CH;

(72) Pôvodca: **Mackay Fabienne, Vaucluse, AU;**
Browning Jeffrey L., Brookline, MA, US;
Ambrose Christine, Reading, MA, US;
Tschopp Jurg, Epalinges, CH;
Schneider Pascal, Epalinges, CH;
Thompson Jeffrey, Stoneham, MA, US;

(74) Zástupca: **Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Protilátka proti sekvencii SEQ ID No: 1 alebo polypeptid s jej obsahom a ich použitie**

(57) Anotácia:
Receptor BCMA je identifikovaný ako receptor pre proteín BAFF. Na základe toho je navrhnuté medicínske použitie protilátok proti BCMA a polypeptidu obsahujúceho fragment receptora BCMA.

SK 288287 B6

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka polypeptidu BAFF-R, receptora na BAFF (faktor aktivujúci B-lymfocyty, patriaci do rodiny nádorového nekrotického faktora (TNF)) a činidiel blokujúcich tento receptor, na použitie na stimuláciu alebo inhibíciu expzie B-lymfocytov a imunoglobulínov. Tento receptor má protinádorové imunoregulačné využitie a tiež využitie na liečenie imunosupresívnych ochorení, ako je napr. HIV. Okrem toho tento receptor a jeho blokujúce činidlá hrajú úlohu pri rozvoji hypertenzie príbuzných ochorení. Navyše bunky transfekované génom pre tento receptor sa môžu využiť na liečenie ochorení, ako sú nádory, lymfómy, autoimunitné ochorenia alebo dedičné choroby súvisiace s B-lymfocytmi. Blokujúce činidlá, ako sú napr. rekombinantné varianty alebo protilátky špecifické na receptor, majú tiež využitie pri imunoregulácii. Použitie receptora pre BAFF ako stimulátora B-lymfocytov pri liečení ochorení s potlačenou imunitou sa týka tiež použitia u pacientov, ktorí prekonali transplantáciu orgánov (napr. transplantáciu kostnej drene) tiež použitie na stimuláciu tvorby B-lymfocytov u pacientov, ktorí sa zotavujú po liečení rakoviny. Tiež sa týka použitia receptora pre BAFF ako adjuvans a/alebo kostimulátora na zvýšenie alebo obnovu hladiny B-lymfocytov na približne normálnu úroveň. Rozpustné formy receptora pre BAFF, ktoré blokujú funkciu B-lymfocytov, môžu byť tiež využité na inhibíciu ochorení, ktoré sú sprostredkované B-lymfocytmi.

Doterajší stav techniky

Predkladaný vynález sa týka nového receptora z rodiny TNF, ktorý bol označený BAFF-R (alebo BCMA).

Rodina TNF sa skladá z párov ligandov a ich špecifických receptorov, ktoré bývajú označované ako ligandy rodiny TNF a receptory rodiny TNF (Bazzoni Beutler, 1996, Aggarwal Natarajan, 1996). Táto rodina sa podieľa na regulácii imunitného systému a možno iných „neimunologických“ systémov. Ide často o reguláciu typu „hlavného prepínača“, keď signalizácia typu TNF môže viesť k mnohým rôznym následným udalostiam, ktorých typickým príkladom je práve TNF. TNF môže napr. iniciovať všeobecnú obrannú zápalovú reakciu organizmu v reakcii na cudzorodú látku, ktorá zahŕňa pozmenenú prezentáciu adhézných molekúl zúčastnených v „cell trafficking“, produkciu chemokínov, ktoré smerujú špecifické bunky do špecifických kompartmentov a v špecifickom inštruovaní (priming) rôznych efektorových buniek. Teda regulácia týchto metabolických dráh má iste klinický potenciál.

Predpokladá sa, že indukcia rôznych typov bunkových odpovedí sprostredkovaných cytokínmi z rodiny TNF je iniciovaná ich naviazaním na špecifické bunkové receptory. Boli identifikované prinajmenšom dva odlišné TNF receptory veľkosti približne 55 kDa (TNFR1), 75 kDa (TNFR2) (Hohman et al., J. Biol. Chem. 264: 14927 – 14934 (1989), Brockhaus et al., PNAS, 87: 3127 – 3131 (1990)). S génmi pre obidva receptory TNF je spojený významný polymorfizmus. Obidva TNFR zdieľajú typickú štruktúru receptorov na bunkovom povrchu vrátane extracelulárnej, transmembránovej a intracelulárnej domény. Extracelulárna časť TNFR typu 1 aj 2 obsahuje repetitívny profil aminokyselinových sekvencií štyroch domén bohatých na cysteín (CDR). Podobný repetitívny profil CDR sa vyskytuje aj pri niekoľkých iných proteínoch na bunkovom povrchu, ako je napr. receptor nervového rastového faktora p75 alebo antigén CD-40 B-lymfocytov.

TNF receptory sú významnými nástrojmi na objasnenie biologických metabolických dráh, lebo môžu byť ľahko upravené na imunoglobulínové fúzne proteíny. Tieto dimérne rozpustné formy receptora sú dobré inhibítory udalostí sprostredkovaných secernovanými alebo povrchovo viazanými ligandmi. Tieto fúzne proteíny tým, že sa naviažu na ligandy, zabránia ligandom v interakcii s receptormi asociovanými s bunkami, tým inhibujú nadväzujúcu signalizáciu. Tieto fúzne proteíny receptora-Ig sú užitočné nielen z experimentálneho hľadiska, ale sú úspešne využívané aj klinicky, napr. TNF-R-Ig sa úspešne používa na liečenie zápalového ochorenia čriev, reumatickej artritídy alebo akútneho klinického syndrómu, ktorý sprevádza podávanie OKT3 (Easton et al., 1996, Feldman et al., 1997, van Dulleman et al., 1995). Možno očakávať, že cieleňé ovplyvnenie mnohých udalostí, ktoré sú sprostredkované signalizáciou za účasti receptorov TNF rodiny, sa bude môcť využiť na liečenie porúch imunity a tiež mnohých ochorení, ktoré majú patologické následky vďaka účasti imunitného systému. Napr. rozpustná forma v súčasnosti opísaného receptora osteoprotegerínu blokuje straty kostnej hmoty, takže je vidieť, že udalosti riadené signalizáciou zahŕňajúce receptory TNF rodiny sa neobmedzujú len na reguláciu imunitného systému. Protilátky na receptory môžu blokovat' väzbu ligandu, teda môžu mať klinické využitie. Takéto protilátky majú často veľmi dlhú životnosť a sú teda výhodnejšie ako rozpustné fúzne proteíny receptora-Ig, ktoré majú v krvi kratší polčas.

Aj keď inhibícia receptorom sprostredkovanej metabolickej dráhy predstavuje teraz najpoužívanejšiu terapeutickú aplikáciu receptorov, bola to pôvodne aktivácia TNF receptorov, ktorá sa javila ako klinicky sľubná (Aggarwal Natarajan, 1996). Aktivácia TNF receptorov môže iniciovať bunkovú smrť cieľových buniek, teda aplikácia pri nádoroch bola a stále je atraktívna (Eggermont et al., 1996). Receptor môže byť aktivovaný buď podaním ligandu, t. j. využitím prirodzenej cesty, alebo podaním protilátok, ktoré sa naviažu (zosieťovaním) na receptor. Protilátky môžu byť výhodné napr. pri liečení rakoviny, lebo môžu prežívať

v krvi dlhší čas na rozdiel od ligandov, ktoré majú v krvi spravidla kratšiu životnosť. Agonistické protilátky sú užitočné prípravky na liečenie rakoviny, lebo receptory môžu byť exprimované v nádoroch selektívnejšie, alebo môžu signalizovať iba bunkovú smrť alebo diferenciáciu nádorových buniek. Podobne mnohé pozitívne imunologické udalosti sú sprostredkované receptormi rodiny TNF, napr. zápalová reakcia hostiteľa, tvorba protilátok a pod., teda agonistické protilátky môžu byť užitočné aj v iných než onkologických aplikáciách.

Paradoxne aj inhibícia metabolickej/signálnej dráhy môže byť klinicky prospešná pri liečení nádorov. Napr. ligand Fas je exprimovaný v niektorých nádoroch, táto expresia vedie k odumretiu Fas-pozitívnych lymfocytov, čo umožňuje, že nádor sa vyhne imunitnému systému. V takomto prípade by inhibícia systému Fas dovolila, aby imunitný systém reagoval na nádor iným spôsobom (Green Ware, 1997).

Podstata vynálezu

Pôvodcovia identifikovali klon cDNA kódujúci polypeptid, označovaný v predkladanej prihláške BAFF-R alebo BCMA, ktorý viaže nádorový nekrotický faktor BAFF, čo je faktor patriaci do rodiny TNF aktivujúci B-lymfocyty. BAFF je molekula zhodná s molekulou už skôr opísanou v dokumente WO/9912964, ktorý je celý zahrnutý formou odkazu.

V jednom uskutočnení vynález poskytuje spôsoby použitia BAFF-R. Sem patria spôsoby na inhibíciu rastu B-lymfocytov, rastu a zrenia B-lymfocytov indukovaných dendritickými bunkami alebo produkcie imunoglobulínov vo zvierati pomocou BAFF-R polypeptidu. Ďalej sú zahrnuté spôsoby stimulácie rastu B-lymfocytov, rastu a zrenia B-lymfocytov indukovaných dendritickými bunkami, alebo produkcie imunoglobulínov vo zvierati pomocou BAFF-R polypeptidu alebo kostimulácie rastu B-lymfocytov, rastu a zrenia B-lymfocytov indukovaných dendritickými bunkami, alebo produkcie imunoglobulínov vo zvierati pomocou BAFF-R polypeptidu a anti-T protilátky, CD40 ligandu alebo anti-CD40 ligandu.

V inom uskutočnení vynález poskytuje BAFF-R na použitie na liečenie autoimunitných ochorení, hypertenzie, kardiovaskulárnych ochorení, renálnych porúch, lymfoproliferatívnych ochorení B-lymfocytov, imunosupresívnych ochorení, orgánových transplantácií a HIV. Vynález sa tiež týka použitia činidiel na liečenie, potlačenie alebo zmenu imunitnej reakcie, ktorá zahŕňa signálnu dráhu medzi BAFF-R a jeho ligandom, spôsoby inhibície zápalu podávaním protilátok špecifických na BAFF-R alebo jeho epitop.

Pri liečebnom využití vynálezu sa podáva terapeuticky účinné množstvo polypeptidu BAFF-R, chimérické molekuly obsahujúce polypeptid BAFF-R fúzovaný s heterológnu aminokyselinovou sekvenciou alebo homológ protilátky anti-BAFF-R.

Iné uskutočnenie vynálezu sa týka farmaceutických kompozícií, ktoré obsahujú polypeptid BAFF-R a farmaceuticky prijateľné vehikulum.

Ďalšie uskutočnenie vynálezu poskytuje chimérickú molekulu, ktorá obsahuje polypeptid BAFF-R fúzovaný s heterológnu polypeptidom alebo aminokyselinovou sekvenciou. Príkladom takejto chimérickej molekuly je molekula obsahujúca BAFF-R fúzovaný s úsekom Fc imunoglobulínu alebo so značiacou sekvenciou epitopu (an epitope tag sequence).

Ďalšie uskutočnenie vynálezu poskytuje protilátku, ktorá sa špecificky viaže na polypeptid BAFF-R. Táto protilátka je prípadne monoklonálna protilátka.

Definície

Termíny BAFF-R a BCMA používané v opise zahŕňajú natívne sekvencie BAFF-R a varianty BAFF-R (ktoré budú ďalej definované). BAFF-R je možné izolovať z rôznych zdrojov, ako napr. z rôznych typov myších alebo ľudských tkanív alebo z ďalších zdrojov, alebo môže byť pripravený rekombinantnými metódami alebo synteticky.

Termín natívna sekvencia BAFF-R označuje polypeptid majúci aminokyselinovú sekvenciu ako BAFF-R pochádzajúcu z prírody. Takáto natívna sekvencia BAFF-R môže byť získaná izoláciou z prírody alebo môže byť pripravená rekombinantnými metódami alebo synteticky. Patria sem tiež prirodzene sa vyskytujúce skrátené alebo secernované formy BAFF-R (napr. rozpustné formy obsahujúce napr. sekvencie extracelulárnej domény), prirodzene sa vyskytujúce varianty (napr. alternatívne zostrihané formy) a prirodzene sa vyskytujúce alelické varianty BAFF-R. V jednom uskutočnení vynálezu je natívna sekvencia BAFF-R zrelá alebo úplná natívna sekvencia polypeptidu BAFF-R obsahujúca aminokyseliny 1 až 184 zo sekvencie SEQ ID NO: 1 alebo fragment tejto sekvencie.

Termín extracelulárna doména BAFF-R alebo skrátené BAFF-R ECD označuje formu BAFF-R, ktorá je v podstate bez transmembránovej a cytoplazmatickej domény BAFF-R. Obvykle, extracelulárna doména BAFF-R obsahuje menej než 1 % týchto transmembránových a cytoplazmatických domén, výhodne obsahuje menej než 0,5 % týchto domén. Prípadne BAFF-R ECD obsahuje aminokyselinové zvyšky 8 až 41 zo sekvencie SEQ ID NO: 1 alebo aminokyselinové zvyšky 4 až 51 zo sekvencie SEQ ID NO: 1, alebo aminokyselinové zvyšky 1 až 53 zo sekvencie SEQ ID NO: 1. Vo výhodnom uskutočnení predkladaného vynálezu

BAFF-R ECD obsahuje aminokyselinové zvyšky 1 až 51 zo sekvencie SEQ ID NO: 1. V ďalšom výhodnom uskutočnení BAFF-R ECD obsahuje aminokyselinové zvyšky 1 až 50 zo sekvencie SEQ ID NO: 1. Odborníkovi je zrejmé, že transmembránová doména polypeptidu BAFF-R podľa vynálezu je identifikovaná na základe kritérií rutinne používaných v odbore na identifikáciu tohto typu hydrofóbnej domény. Presné hranice transmembránovej domény môžu byť rôzne, ale s veľkou pravdepodobnosťou sa nelíšia o viac ako 5 aminokyselín na každom konci domény, ktoré sú špecificky uvedené. Takže BAFF-R ECD prípadne obsahuje aminokyseliny 8-41 (sekvencia SEQ ID NO: 1).

Termín variant BAFF-R označuje aktívny BAFF-R, ako je definovaný ďalej, ktorý má aspoň 80 % aminokyselinovú sekvenčnú identitu s dedukovanou aminokyselinovou sekvenciou BAFF-R, ktorá je uvedená ako sekvencia SEQ ID NO: 1 pre úplnú natívnu sekvenciu BAFF-R alebo sekvenciu BAFF-R ECD. K variantom BAFF-R patria napr. polypeptidy BAFF-R, kde je pridaných alebo odstránených jeden aminokyselinový zvyšok alebo viac aminokyselinových zvyškov na N-konci alebo C-konci sekvencie SEQ ID NO: 1. Obvykle má variant BAFF-R aspoň 80 % alebo 85 % aminokyselinovú sekvenčnú identitu, výhodnejšie aspoň 90 % aminokyselinovú sekvenčnú identitu a najvýhodnejšie aspoň 95 % aminokyselinovú sekvenčnú identitu s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID NO: 1.

Percentá (%) aminokyselinovej sekvenčnej identity vzhľadom na opísané sekvencie BAFF-R sú definované ako percentá aminokyselinových zvyškov v kandidátnej sekvencii, ktoré sú identické s aminokyselinovými zvyškami v sekvencii BAFF-R po porovnaní sekvencií (aligning) a prípadnom vložení medzier, pokiaľ je to nevyhnutné na dosiahnutie maximálneho percenta sekvenčnej identity, pričom konzervatívne substitúcie sa nepovažujú za súčasť sekvenčnej identity. Porovnanie sekvencií na účely stanovenia percenta aminokyselinovej sekvenčnej identity je možné uskutočniť rôznymi spôsobmi, ktoré sú odborníkom známe, napr. použitím verejne dostupných počítačových programov, ako je BLAST, ALIGN alebo Megalign (DNASTAR) Software. Odborník je schopný určiť vhodné parametre na vyhodnotenie porovnaní sekvencií a vhodný algoritmus na dosiahnutie najlepšieho porovnania celkovej dĺžky porovnávaných sekvencií.

Termín označený epitop (epitope tagged) používaný v opise chimérického polypeptidu obsahujúceho BAFF-R alebo sekvencia jeho domén, fúzovaný so značkovacím polypeptidom (tag polypeptide). Značkovací polypeptid (tag polypeptide) je polypeptid obsahujúci dostatok aminokyselín na to, aby poskytol epitop, proti ktorému môže byť pripravená protilátka alebo ktorý je možné identifikovať iným činidlom, pričom je dostatočne krátky, aby nenarušoval aktivitu BAFF-R. Značkovací polypeptid musí byť tiež dostatočne unikátny, aby protilátka v podstate nemohla skrížene reagovať s inými epitopmi. Vhodný značkovací polypeptid všeobecne obsahuje aspoň 6 aminokyselinových zvyškov, obvykle 8 až 50 aminokyselinových zvyškov (výhodne približne 10 až 20 aminokyselinových zvyškov).

Termín izolovaný, pokiaľ ide o opísané polypeptidy, označuje polypeptid, ktorý bol identifikovaný a separovaný a/alebo izolovaný zo svojho prirodzeného prostredia. Kontaminujúce zložky v jeho prirodzenom prostredí sú také materiály, ktoré by rušili diagnostické alebo terapeutické využitie polypeptidu a zahŕňajú enzýmy, hormóny a ďalšie proteínové alebo neproteínové rozpustené látky. Vo výhodnom uskutočnení vynálezu je polypeptid purifikovaný (1) do stupňa postačujúceho na získanie aspoň 15 zvyškov N-konca alebo internej aminokyselinovej sekvencie pomocou rotačného sekvenčného zariadenia (spinning cup sequenator) alebo (2) do homogenity použitím SDS-PAGE za redukujúcich alebo neredukujúcich podmienok a pomocou farbenia Coomassie modrou alebo výhodne striebrom. K izolovaným polypeptidom patria polypeptidy *in situ* v rekombinantných bunkách, kde je neprítomná aspoň jedna zložka prirodzeného prostredia BAFF-R. Obvykle je však izolovaný polypeptid pripravený aspoň jedným purifikačným krokom.

Termín protilátka sa v predkladanom opise používa v najširšom zmysle a špecificky zahŕňa jednoduché BAFF-R monoklonálne protilátky (vrátane agonistických, antagonistických a neutralizačných protilátok) a anti-BAFF-R protilátkové prípravky s polypepitopickou špecificitou. Termín monoklonálna protilátka označuje protilátky získané z populácie v podstate homogénnych protilátok, t. j. individuálne protilátky tvoriace populáciu sú identické, s výnimkou možných prirodzene sa vyskytujúcich mutácií, ktoré môžu byť prítomné vo veľmi malom počte.

Termín purifikovaný preparát alebo v podstate čistý preparát polypeptidu označuje polypeptid, ktorý bol separovaný od iných proteínov, lipidov a nukleových kyselín, s ktorými sa prirodzene vyskytuje. Výhodne je polypeptid tiež separovaný od ostatných substancií ako sú napr. protilátky, nosiče a pod., ktoré boli použité na purifikáciu.

Termíny liečenie, ošetrovanie a terapia sa používajú v zmysle liečebného, profylaktického a preventívneho pôsobenia.

Termíny peptid, proteíny a polypeptidy sú v opise používané celkom zameniteľne.

Termín biologicky aktívny znamená v prípade proteínu, že má *in vivo* alebo *in vitro* aktivitu, ktorá pôsobí priamo alebo nepriamo. Biologicky aktívne fragmenty majú napr. 70 % aminokyselinovú homológiu s aktívnym miestom receptora, výhodnejšie aspoň 80 % a najvýhodnejšie aspoň 90 % homológiu. Identita alebo homológia vzhľadom na receptor je definovaná ako percento aminokyselinových zvyškov v kandidátnej sekvencii, ktoré sú identické so zvyškami BAFF-R v sekvencii SEQ ID NO: 1 alebo ktoré sú identické s amino-

kyselinovými zvyškami definovanej časti sekvencie SEQ ID NO: 1.

Termín cicavec označuje akékoľvek zviera klasifikované ako cicavec, ako je napr. krava, kôň, pes, myš a mačka vrátane človeka. Vo výhodnom uskutočnení vynálezu je cicavec človek.

Pri realizácii predkladaného vynálezu sa využívajú, pokiaľ nie je výslovne uvedené inak, štandardné postupy bunkovej biológie, bunkových kultúr, molekulárnej biológie, transgénnej biológie, mikrobiológie, rekombinantnej DNA a imunológie, ktoré sú odborníkom známe. Tieto metódy sú dostatočne opísané v odbornej literatúre.

Ďalej sa opis týka výhodných uskutočnení vynálezu. Vynález BAFF-R a molekúl príbuzných BAFF-R na použitie na ovplyvnenie rastu a zrenia B-lymfocytov a sekrécie imunoglobulínu. Vynález sa ďalej týka BAFF-R a molekúl príbuzných BAFF-R na použitie na ovplyvnenie reakcie imunitného systému, čo je nutné pri ochoreniach súvisiacich s imunitným systémom. Navyše sa vynález týka liečenia rakoviny a porúch imunity, keď sa pri génovej terapii používa gén BAFF-R alebo gén príbuzný BAFF-R.

BAFF-R a jeho homológy produkované hostiteľom transformovaným sekvenciou podľa vynálezu a tiež natívny BAFF-R purifikovaný odborníkovi známym spôsobom alebo pripravený zo známej aminokyselinovej sekvencie, sú užitočné pri mnohých aplikáciách, ako sú napr. protirakovinové, protinádorové a imunoregulačné aplikácie. Sú užitočné tiež pri liečení ďalších ochorení.

Ďalší aspekt predkladaného vynálezu sa týka použitia polypeptidu kódovaného izolovanou nukleovou kyselinou kódujúcou BAFF-R pri *antisense* terapii. Termín *antisense* terapia označuje podávanie alebo *in situ* vytváranie oligonukleotidov alebo ich derivátov, ktoré špecificky hybridizujú v bunkových podmienkach s bunkovou mRNA a/alebo DNA kódujúcou požadovaný ligand, takže inhibujú expresiu kódovaného proteínu tým, že inhibujú jeho transkripciu a/alebo transláciu. Väzba sa môže uskutočniť na základe konvenčnej komplementarity báz alebo napr. v prípade väzby na dvojzávitnici DNA prostredníctvom špecifických interakcií v hlavnom záreze dvojzávitnice. Všeobecne sa *antisense* terapia týka celého radu rôznych metód v odbore používaných a v podstate zahŕňa celú terapiu založenú na špecifickej väzbe na oligonukleotidové sekvencie.

Antisense konštrukt podľa predkladaného vynálezu môže byť podávaný vo forme expresného plazmidu, ktorý pri transkripcii v bunke produkuje RNA, ktorá je komplementárna s aspoň časťou bunkovej mRNA kódujúcej BAFF-ligand. Alternatívne, *antisense* konštrukt je oligonukleotidová sonda pripravená *ex vivo*. Takéto oligonukleotidové sondy sú výhodne modifikované na oligonukleotidy, ktoré sú rezistentné na endogénne nukleázy a sú teda stabilné *in vivo*. Príklady molekúl nukleovej kyseliny na použitie ako *antisense* oligonukleotidy sú fosforamidátové, fosfotioátové a metylfosfonátové analógy DNA (pozri napr. patentové dokumenty USA č. 5,176,996; 5,264,564; and 5,256,775). Navyše všeobecné princípy konštrukcie oligomérov užitočných na *antisense* terapiu boli prehľadne opísané napr. v publikáciách Van Der Krol et al., (1988) *Biotechniques* 6: 958-976; Stein et al. (1988) *Cancer Res* 48: 2659 – 2668, ktoré sú zahrnuté formou odkazu.

BAFF-R podľa predkladaného vynálezu je, ako už bolo uvedené, člen rodiny receptorov TNF. Tento proteín, jeho fragmenty alebo homológy majú široké terapeutické a diagnostické aplikácie.

Polypeptidy podľa vynálezu špecificky interagujú s BAFF, polypeptidom skôr opísaným v patentovej prihláške WO99/12964, ktorá je zahrnutá formou odkazu. Opísané peptidy a spôsoby umožňujú identifikovať molekuly, ktoré špecificky interagujú s BAFF-R alebo jeho fragmentom.

Niektoré uskutočnenia predkladaného vynálezu sa týkajú použitia peptidov odvodených z BAFF-R, ktoré majú schopnosť viazať sa na BAFF. Fragmenty BAFF-R môžu byť pripravené rôznymi spôsobmi, napr. rekombinantnou technikou, využitím PCR, proteolytickým štiepením alebo chemickou syntézou. Interné alebo terminálne fragmenty polypeptidu môžu byť pripravené odstránením jedného nukleotidu alebo viacerých nukleotidov z jedného konca alebo oboch koncov nukleovej kyseliny, ktorá kóduje polypeptid. Expresia takto mutovanej DNA poskytuje polypeptidové fragmenty.

Chimérické molekuly podľa predkladaného vynálezu môžu byť pripravené metódami, ktoré sú odborníkom známe. Podľa vynálezu sa zamýšľa použitie chimérických molekúl obsahujúcich 3AFF-R polypeptid (alebo jeho variant) fúzovaný s heterológnou aminokyselinovou sekvenciou, ako je napr. IgG Fc doména imunoglobulínu. Výhodne sú také chimérické molekuly rozpustné a obsahujú rozpustný polypeptid BAFF-R. Vo výhodnom uskutočnení chimerická molekula obsahuje aminokyselinové zvyšky 1 až 50 zo sekvencie SEQ ID NO: 1 fúzovanej s doménou Fc.

Polypeptidové fragmenty môžu byť tiež pripravené chemickou syntézou použitím postupov, ktoré sú odborníkom známe, ako je napr. obvyklá Merrifieldova metóda chemickej syntézy na pevnej fáze používajúca f-moc alebo t-boc. Napr. peptidy a DNA sekvencie môžu byť ľubovoľne rozdelené na fragmenty požadovanej dĺžky bez prekryvania alebo na prekryvajúce sa fragmenty požadovanej dĺžky. Tieto metódy budú nižšie podrobnejšie opísané.

Príprava rozpustných foriem BAFF-R

Rozpustné formy BAFF-R sú často signálne účinné, a teda môžu byť podávané ako liečivá, ktoré napodobňujú prírodné membránové formy. Je možné, že BAFF-R podľa vynálezu sú v prírode secerňované ako rozpustné cytokíny, ale v prípade, že nie, je možné podporiť sekréciu tým, že sa gén upraví metódami géno-

vého inžinierstva. Na vytvorenie rozpustnej secernovanej formy BAFF-R by sa odstránili na úrovni DNA N-koncové transmembránové úseky a nejaká časť tzv. stonkového úseku a nahradili by sa vedúcou sekvenciou (leader) typu I, alternatívne typu II, ktorá by umožnila účinné proteolytické štiepenie vo zvolenom expresnom systéme. Odborník môže meniť rozsah ponechanej stonkovej oblasti v konštrukte na sekréciu, aby sa optimalizovali ako väzbové vlastnosti ligandu, tak aj účinnosť sekrécie. Tak napr. konštrukty obsahujúce všetky možné dĺžky stonky, t. j. sekvencie skrátené na N-konci, sa môžu pripraviť tak, že vzniknú proteíny, ktoré začínajú aminokyselinou 1 až 51. Výsledkom takejto analýzy je potom stanovenie optimálnej dĺžky stonkového úseku.

Vo výhodnom uskutočnení vynálezu rozpustný BAFF-R polypeptid je izolovaná natívna sekvencia BAFF-R polypeptidu obsahujúca aminokyselinové zvyšky 1 až 51 zo sekvencie SEQ ID NO: 1 alebo fragment tejto sekvencie; izolovaný BAFF-R polypeptid majúci aspoň 80 % (a výhodnejšie 90 %) aminokyselinovú sekvenciu identitu s natívnou sekvenciou BAFF-R polypeptidu obsahujúcu aminokyselinové zvyšky 1 až 51 zo sekvencie SEQ ID NO: 1 alebo fragment tejto sekvencie, izolovaný BAFF-R polypeptid obsahujúci aminokyselinové zvyšky 8 až 41 zo sekvencie SEQ ID NO: 1 alebo fragment tejto sekvencie a izolovaná natívna sekvencia polypeptidu BAFF-R obsahujúca aminokyselinové zvyšky 1 až 50 zo sekvencie SEQ ID NO: 1 a alebo fragment tejto sekvencie.

Príprava protilátok reaktívnych s BAFF-R

Predkladaný vynález sa týka protilátok, ktoré špecificky reagujú s BAFF-R alebo jeho koreceptormi. Anti-proteín/anti-peptidové antisérum alebo monoklonálne protilátky sa pripravujú štandardnými postupmi (pozri napr. *Antibodies: Laboratory Manual* ed. By Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Cicavce ako napr. myš, škrečok alebo králik sa imunizujú imunogénnou formou peptidu. K postupom, ktorým sa proteínu alebo peptidu udelí imunogenicita, patrí konjugácia s nosičom a ďalšie metódy, ktoré sú odborníkom známe.

Imunogénna časť BAFF-R alebo jeho koreceptorov sa podáva spoločne s adjuvans. Postup imunizácie je možné monitorovať meraním titra protilátok v plazme alebo v sére. Na stanovenie hladiny protilátok je možné využiť štandardný postup ELISA alebo iný formát imunotestu s imunogénom ako antigénom.

Protilátky vo výhodnom uskutočnení vynálezu sú protilátky imunošpecifické na antigénne determinanty BAFF-R alebo jeho koreceptory, napr. antigénne determinanty polypeptidu sekvencie SEQ ID NO: 1 alebo blízko príbuzné homológu humánneho alebo nehumánneho cicavčieho pôvodu (napr. so 70, 80 alebo 90 % homológiou, výhodnejšie s aspoň 95 % homológiou.). V ďalšom výhodnom uskutočnení vynálezu protilátky anti-BAFF-R alebo anti-BAFF-koreceptora v podstate skrížene nereagujú (t. j. reagujú len špecificky) s proteínom, ktorý je menej ako na 80 % homologický so sekvenciou SEQ ID NO: 1; výhodne menej ako z 90 % homologický so sekvenciou SEQ ID NO: 1; a najvýhodnejšie menej ako z 95 % homologický so sekvenciou SEQ ID NO: 1. Výrazom v podstate skrížene nereagujú sa myslí to, že protilátka má väzbovú afinitu na nehomologický proteín, ktorá predstavuje menej ako 10 %, výhodnejšie menej ako 5 % a ešte výhodnejšie menej ako 1 % väzbovej afinity na proteín sekvencie SEQ ID NO: 1.

Termín protilátka, ako je používaný v predkladanom vynáleze, zahŕňa také protilátkové fragmenty, ktoré špecificky reagujú s BAFF-R alebo jeho koreceptormi. Protilátky je možné fragmentovať konvenčnými metódami, ktoré sú odborníkom známe, a potom testovať užitočnosť fragmentov rovnakým spôsobom, ktorý bol opísaný pre celé protilátky. Tak napr. fragmenty $F(ab')_2$ sa pripravujú pôsobením pepsínu na protilátku. Vzniknuté fragmenty $F(ab')_2$ môžu byť ešte ošetrené tak, že sa redukujú disulfidické mostíky a vzniknú fragmenty Fab'. K protilátkam podľa vynálezu patria tiež biošpecifické a chimérické molekuly majúce aktivitu anti-BAFF-R alebo anti-BAFF-koreceptora. Ako monoklonálne, tak aj polyklonálne protilátky (Ab) namierené proti BAFF-R a jeho koreceptorom a tiež protilátkové fragmenty, ako je napr. Fab' a $F(ab')_2$, môžu byť použité na blokovanie pôsobenia BAFF-R a jeho prípadných koreceptorov.

Rôzne formy protilátok môžu byť pripravené použitím štandardných techník rekombinantnej DNA (Winter and Milstein, *Nature* 349: 293 – 299 (1991), vložené formou odkazu). Napr. sa môžu skonštruovať chimérické protilátky, kde doména viažuca antigén zo zvieracej protilátky je spojená s humánou konštantnou doménou (pozri napr. Cabilly et al., Patent U.S. 4,816,567, vložené formou odkazu). Chimérické protilátky môžu redukovať pozorovanú imunogénnu reakciu vyvolanú normálnymi zvieracími protilátkami pri klinickom použití u ľudí.

Navyše môžu byť synteticky pripravené rekombinantné humanizované protilátky, ktoré rozpoznávajú BAFF-R alebo jeho koreceptory. Humanizované protilátky sú chiméry, ktoré obsahujú väčšinu sekvencií humánneho IgG, do ktorých boli vložené úseky zodpovedné za špecifickú väzbu antigénu. Požadovaným antigénom sa imunizujú zvieratá, izolujú sa z nich zodpovedajúce protilátky a odstránia sa časti sekvencií variabilných úsekov zodpovedné za špecifickú väzbu antigénu. Úseky viažuce antigén pochádzajúce zo zvierat sa potom klonujú do zodpovedajúceho miesta génov pre humánu protilátku, z ktorých boli úseky pre väzbu antigénu odstránené. Humanizované protilátky minimalizujú použitie heterológnych (medzidruhových) sekvencií v humánnych protilátkach, a teda je menšia pravdepodobnosť, že vyvolajú imunitnú reakciu u liečeného pacienta.

Konštrukciou rôznych tried rekombinantných protilátok je možné tiež uskutočniť prípravou chimérických

alebo humanizovaných protilátok obsahujúcich variabilné domény a humánne konštantné domény (CH1, CH2, CH3) izolované z rôznych tried imunoglobulínov. Napr. protilátky so zvýšenou valenciou väzbových miest pre antigén môžu byť rekombinantne pripravené klonovaním väzbových miest pre antigén do vektora nesúceho úseky humánnych konštantných reťazcov (Arulanandam et al., J. Exp. Med., 177: 1439 až 1450 (1993), zahrnuté formou odkazu).

Navyše sa môžu na zmenu väzbovej afinity rekombinantných protilátok s ich antigénmi použiť štandardné techniky rekombinantnej DNA, ktorými sa zmenia aminokyselinové zvyšky v blízkom okolí miest väzby antigén. Väzbová afinita humanizovaných protilátok na antigén môže byť zvýšená mutagenézou založenou na molekulovom modelovaní (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 10029 – 33 (1989), zahrnuté formou odkazu).

Príprava analógov: Príprava zmenených sekvencií DNA a peptidov

Analógy BAFF-R sa môžu líšiť od prirodzene sa vyskytujúceho BAFF-R v aminokyselinovej sekvencii alebo spôsobom, ktorý sa netýka sekvencie, alebo oboma spôsobmi. K iným než sekvencným (nesekvencným) modifikáciám patrí *in vivo* alebo *in vitro* chemická derivatizácia BAFF-R. K nesekvencným modifikáciám teda patria, bez toho aby bol zoznam obmedzujúci, zmeny v acetylácii, metylácii, fosforylácii, karboxylácii alebo glykozylácii.

K výhodným analógom patrí BAFF-R a jeho biologicky aktívne fragmenty, ktorých sekvencie sa líšia od sekvencie uvedenej ako sekvencia SEQ ID NO: 1 jednou konzervatívnou aminokyselinovou substitúciou alebo viacerými konzervatívnymi aminokyselinovými substitúciami alebo jednou nekonzervatívnou aminokyselinovou substitúciou a viacerými nekonzervatívnymi aminokyselinovými substitúciami, deléciami alebo inzerciami, ktoré nerušia aktivitu BAFF-ligandu. Ku konzervatívnym substitúciám typicky patria substitúcie jednej aminokyseliny inou aminokyselinou, ktorá má podobné vlastnosti, napr. substitúcia v rámci nasledujúcich skupín aminokyselín: valín – glycín; glycín – alanín; valín – izoleucín – leucín; kyselina asparágová – kyselina glutámová; asparagín – glutamín; serín – treonín; lyzín – arginín; a fenylalanín – tyrozín.

Využitie vynálezu

Úplný gén BAFF-R (sekvencia SEQ ID NO: 2) alebo jeho časť môžu byť použité ako hybridizačné sondy pre cDNA knižnice, napr. na izoláciu ďalších génov, ktoré majú požadovanú sekvencnú identitu so sekvenciou BAFF-R opísanou ako sekvencia SEQ ID NO: 2. Nukleotidové sekvencie kódujúce BAFF-R môžu byť tiež použité na konštrukciu hybridizačných sond na mapovanie génov, ktoré kódujú BAFF-R, a na genetické analýzy jedincov s genetickými poruchami.

Je možné navrhnúť testy na skríning zlúčenín, ktoré napodobňujú biologickú aktivitu BAFF-R. K takýmto skríningovým metódam patria testy, ktoré umožňujú vysokokapacitný skríning chemických knižníc a sú teda zvlášť výhodné na identifikáciu malých molekúl ako kandidátnych liečiv. K uvažovaným malým molekulám patria syntetické organické alebo anorganické zlúčeniny. Nukleové kyseliny kódujúce BAFF-R alebo jeho modifikované formy sa môžu tiež použiť na prípravu transgénnych zvierat alebo zvierat s vyradenou funkciou daného génu (knock out), ktoré sú zase užitočné pri skríningu a vývoji terapeuticky užitočných agensov.

Jedno uskutočnenie vynálezu sa týka stimulácie rastu B-lymfocytov, rastu a zrenia B-lymfocytov indukovaných dendritickými bunkami alebo produkcie imunoglobulínu u zvierat použitím polypeptidu BAFF-R alebo kostimulácie rastu B-lymfocytov, rastu a zrenia B-lymfocytov indukovaných dendritickými bunkami alebo produkcie imunoglobulínu u zvierat použitím polypeptidu BAFF-R a anti-T protilátky, CD-40 ligandu alebo anti-CD40 ligandu. Tiež sú zahrnuté spôsoby inhibície rastu B-lymfocytov, rastu a zrenia B-lymfocytov indukovaných, dendritickými bunkami alebo produkcie imunoglobulínu u zvierat použitím polypeptidu BAFF-R.

V inom uskutočnení sa vynález týka BAFF-R na použitie na liečenie autoimunitných porúch, hypertenzie, kardiovaskulárnych ochorení, ochorení obličiek, lymfoproliferatívnych ochorení B-lymfocytov, imunosupresívnych ochorení, transplantácií orgánov, zápalových ochorení a tiež HIV. Patrí sem aj použitie ako činidla na liečenie, potlačenie alebo zmenu imunitnej reakcie, na ktorej sa podieľa signálna dráha medzi BAFF-R a jeho ligandom.

V inom uskutočnení vynález poskytuje farmaceutický prípravok obsahujúci polypeptid BAFF-R a farmaceuticky prijateľné vehikulá. K vhodným nosičom pre polypeptid BAFF-R a jeho prípravky patria napr. vehikulá opísané v publikácii Remington's Pharmaceutical Sciences (16th ed., 1980, Mack Publishing Co., edited by Oslo et al.) Typicky sa používa vhodné množstvo farmaceuticky prijateľnej soli, aby bol prípravok izotonický. K príkladom vhodných nosičov patria pufre ako roztoky solí, Ringerov roztok a roztok dextransy. pH roztoku je výhodne 5 až 8, výhodnejšie 7,4 až 7,8. K ďalším vhodným nosičom patria prostriedky na predĺžené/riadené uvoľňovanie liečiva, ako je semipermeabilný matrix z pevných hydrofóbných polymérov, ktorý je vo forme tvarovaných častíc napr. lipozómov, filmov alebo mikročastíc. Odborníkovi je zrejme, že niektoré nosiče môžu byť výhodnejšie v závislosti od určitého spôsobu podávania koncentrácie podávaného polypeptidu BAFF-R.

Podávanie prípravkov podľa vynálezu sa uskutočňuje napr. injekciou (napr. intravenóznou, intraperitoneálnou, subkutánnou, intramuskulárnou) alebo inými spôsobmi ako je napr. infúzia, ktorá zaisť podanie v účinnej forme do krvného obehu.

Pri realizácii predkladaného vynálezu boli použité, pokiaľ nie je výslovne uvedené inak, štandardné postupy bunkovej biológie, bunkových kultúr, molekulárnej biológie, transgénnej biológie, mikrobiológie, rekombinantnej DNA a imunológie, ktoré sú odborníkom známe. Tieto metódy sú dostatočne opísané v odbornej literatúre, pozri napr. *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, 2nd edition. (Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; *DNA Cloning*, Volumes I and II (d. N. Glover, ed), 1985; *Oligonukleotide Synthesis*, (M. J. Gait, ed.), 1984; U.S. Patent No. 4,983,195 (Mullis et al.); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames and S. J. Higgins. Eds.), 1984; *Transcription and Translation* (B. D. Hames and S. J. Higgins, eds.), 1984; *Culture of Animal Cells* (R. I. Freshney, ed). Alan R. Liss, Inc., 1987; *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, 1986; *Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal), 1984; *Methods in Enzymology*, Volumes 154 and 155 (Wu et al., eds), Academic Press, New York; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds.), Academic Press, London, 1987; *Handbook of Experiment Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.), 1986; *Manipulating Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

20 Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 ukazuje sekvenciu nukleovej kyseliny (Sekvencia SEQ ID NO: 2) cDNA humánneho BAFF-R (BCMA) a z nej odvodenú aminokyselinovú sekvenciu (Sekvencia SEQ ID NO: 1). Potenciálny začiatok translácie je buď nukleotid 219, alebo 228; doména bohatá na cysteín (CDR) zahŕňa nukleotidy 240 až 341 zo sekvencie SEQ ID NO: 2 (aminokyselinové zvyšky 8-41 sekvencie SEQ ID NO: 1); a potenciálny transmembránový úsek predstavujú nukleotidy 375 až 459 sekvencie SEQ ID NO: 2.

Obrázok 2 ukazuje sekvenciu nukleovej kyseliny (sekvencia SEQ ID NO: 4) a z nej odvodenú aminokyselinovú sekvenciu (sekvencia SEQ ID NO: 3) plazmidu pJST538, plazmid kódujúci BAFF-R-Fc; nukleotidy 1-69, myšiu IgG-kappa signálnu sekvenciu; nukleotidy 70-222, BAFF-R (nukleotidy 1 až 153); nukleotidy 223 až 906, humánny IgG.

Obrázok 3 ukazuje sekvenciu nukleovej kyseliny plazmidu pJST535, kódujúceho úplný humánny BAFF-R a jeho odvodenú aminokyselinovú sekvenciu.

Obrázok 4 ukazuje štruktúrne porovnanie medzi TNF-R55 a BAFF-R.

Obrázok 5 ukazuje bunky 293EBNA transfekované buď CH269 (1,0 µg), alebo pJST535 (0, 1 µg), plazmidom exprimujúcim úplný BAFF-R a zafarbené 0,5 µg/ml flag-hBAFF v teste na mikrodoštičke.

Obrázok 6(a) ukazuje pokrytie buniek 293EBNA transfekovaných pJST535 s FACS a zafarbených nasledovne: bez ligandu (čierny histogram), 1 µg/ml flag-hCD40L (ružový) alebo flag-hBAFF (zelený). Všetky vzorky sa potom zafarbili pomocou anti-flag M2 nasledované oslim anti-myším IgG, ako je opísané v príklade 2.

Obrázok 6(b) ukazuje FACS histogramy so štatistickými dátami z rovnakého experimentu. Farbenie bolo nasledujúce: (1) nezafarbené, (2) len 7AAD, (3) druhý krok a len 7AAD, (4) 9 µg/ml flag-hBAFF, (5) 3 µg/ml flag-hBAFF, (6) 1 µg/ml flag-hBAFF, (7) 0,33 µg/ml flag-hBAFF, (8) 0,11 µg/ml flag-hBAFF, (9) flag-hCD40L 1 µg/ml.

Obrázok 7 ukazuje imunoprecipitácie BAFF-R-Fc, ako je opísané v príklade 4. Štandardy molekulových hmotností v kDa sú uvedené na obrázku vľavo. Dráha (1) 12,5 ng flag-hTWEAK, (2) 12,5 ng flag-hBAFF, (3) imunoprecipitácia flag-hBAFF s 0,5 ml BAFF-R-Fc upraveného média, (4) imunoprecipitácia flag-hTWEAK s 0,5 ml BAFF-R-Fc upraveného média, (5) imunoprecipitácia bez ligandu s 0,5 ml BAFF-R-Fc upraveného média, (6) imunoprecipitácia flag-hBAFF s 0,5 ml upraveného média z netransfekovaných 293EBNA, (7) imunoprecipitácia flag-hTWEAK s 0,5 ml upraveného média z netransfekovaných 293EBNA.

Obrázok 8 ukazuje vynesenie výsledkov z proliferáčného testu splenocytov, kde sú impulzy za minútu (CPM) inkorporované do myších splenocytov vynesené oproti množstvu pridaného humánneho BAFF (µg/ml).

Obrázok 9 ukazuje vynesenie výsledkov BAFF blokovacieho testu, ktorým bola analyzovaná väzba BAFF na bunky Raji, kde sú vynesené hodnoty MFI (priemerná intenzita fluorescencie) oproti množstvu R:rhIgG1 (ng/ml).

Obrázok 10(a) ukazuje vynesenie expsie IgM proti CD1 vo FACS analýze pre Baff Tg myší, ktoré dostali injekciu h-Ig (stredný panel) alebo hBCMA-Ig (spodný panel) a pre kontrolné myši divého typu, ktoré dostali injekciu PBS (horný panel), ako je opísané v príklade 11. Podávanie BCMA-Ig redukuje celkovú populáciu B-lymfocytov CD1^{hi}/IgM^{hi} v slezine BAFF-transgénnych myší.

Obrázok 10(b) ukazuje vynesenie expsie CD21 proti IgM vo FACS analýze, pri vymedzení vstupu pre IgD pozitívnu populáciu Baff Tg myší, ktoré dostali injekciu h-Ig (stredný panel) alebo hBCMA-Ig (spodný panel) a pre kontrolné myši divého typu, ktoré dostali injekciu PBS (horný panel), ako je opísané v príklade

11. Podávanie BCMA-Ig redukuje celkovú populáciu zrelých B-lymfocytov a T2 B-lymfocytov v slezine BAFF-transgénnych myší.

Obrázok 10(c) ukazuje vynesenie expresie CD21 oproti IgM vo FACS analýze, pri vymedzení vstupu pre IgD pozitívnu populáciu Baff Tg myší, ktoré dostali injekciu h-Ig (stredný panel) alebo hBCMA-Ig (spodný panel) a pre kontrolné myši divého typu, ktoré dostali injekciu PBS (horný panel), ako je opísané v príklade 11. Podávanie BCMA-Ig redukuje celkovú populáciu lymfocytov marginálnej zóny a T1 B-lymfocytov v slezine BAFF-transgénnych myší.

Obrázok 11 ukazuje hmotnosti sleziny všetkých skupín Baff Tg myší (hmotnosť je uvedená v mg +/- smerodajná odchýlka). Podávanie hBCMA-Ig znižuje hmotnosť sleziny u BAFF transgénnych myší.

Obrázok 12 ukazuje vynesenie proteinúrie (mg/dL) oproti počtu injekcií Baff Tg myší, ktorým bol podávaný PBS, hlg, hBCMA-Ig a u kontrolných myší. Podávanie BCMA-Ig znižuje proteinúriu u BAFF transgénnych myší (BAFF Tg) na hladinu porovnateľnú s myšami divého typu (WT).

Obrázok 13 ukazuje vynesenie priemernej hodnoty priemerného arteriálneho tlaku (mmHg) BAFF Tg myší (BAFF+) a kontrolných myší divého typu (BAFF-).

Obrázok 14 ukazuje vynesenie priemerného individuálneho arteriálneho tlaku (mmHg) BAFF Tg myší (BAFF+) a kontrolných myší divého typu (BAFF-).

Obrázok 15 ukazuje stĺpcový graf percenta myší SNTF1, pri ktorých sa prejavila silná nefritída po podávaní BAFF-R-Ig (BCMA-Ig), HuIgG alebo PBS. Podávanie BCMA-Ig myšiam SNF-1 s miernou nefritídou spomaľuje progresiu k silnej nefritíde.

Obrázok 16 ukazuje celkový počet CD11c+DC buniek (v miliónoch) myší, ktorým bolo podávané *in vivo* 20 µg BCMA-Ig, 50 µg BCMA-Ig, HuIgG alebo PBS. Vyšetrované bunkové populácie CD11c+DC boli: (1) CD8a- CD4-, (2) CD8a+ CD4-, and (3) CD8a-CD4+.

Na ilustráciu vynálezu sú uvedené nasledujúce príklady, ktoré však žiadnym spôsobom neobmedzujú rozsah vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Detekcia BAFF väzby na BAFF-R s použitím testu v doštičkovom formáte

V tomto príklade je opísaná väzba BAFF na transfekované bunky BAFF-R s použitím testu v doštičkovom formáte (doštičkového testu).

Kompletný humánný BAFF-R bol vytvorený z BJAB polyA+ RNA s použitím súpravy Superscrip tII preamplification kit (Life Technologies) na vytvorenie cDNA templátu a amplifikovaný s *Pfu* I s použitím primérov komplementárnych k 5' a 3' kódujúcim sekvenciám BAFF-R. PCR produkt bol klonovaný do CH269, derivátu pCEP4 (Invitrogen). Výsledný klon bol nazvaný pJST535. Humánne bunky embryonálnych obličiek obsahujúce gén EBNA-1 (293EBNA) boli vysiate na doštičky so 6 jamkami potiahnutými fibronektínom a transfekované lipofektamínom (Life Technologies) a buď pJST535 v rôznych riedeniach, alebo CH269 ako kontrolou pozadia. 48 hodín po transfekcii boli transfekované bunky testované na schopnosť viazať rozpustný FLAG-hBAFF (aminokyseliny L83-L285) tak, ako je uvedené. Všetky inkubácie sa uskutočňovali pri teplote miestnosti. Kondicionované médiá sa odsali z jamiek a bunky sa premyli pufrom BHA (20 mM HEPES pH 7,0, 0,5 mg/ml BSA, 0,1 % NaN₃) a inkubovali s 0,5 µg/ml FLAG-hBAFF nariedeným v PBS obsahujúcim 1 mM MgCl₂, 1mM CaCl₂ a 0,1 % NaN₃. Po 1 hodine inkubácie sa roztok BAFF odstránil a bunky sa premyli BHA. Bunky sa potom inkubovali počas 30 minút v roztoku PBS obsahujúcim anti-FLAG monoklonálnu protilátku v koncentrácii 1 µg/ml, M2 (Sigma). Tento roztok sa odsal a bunky sa premyli BHA. Bunky sa potom inkubovali počas 30 minút v 1 : 3000 riedení kozieho protimyšieho IgG F(ab)'2 (Jackson ImunoResearch) konjugovaného s alkalickou fosfatázou. Tento roztok sa odsal a bunky sa premyli BHA. Aby sa znížilo množstvo značeného pozadia spôsobené endogénnou alkalickou fosfatázou, bunky sa inkubovali počas 15 minút v 2,5 mM levimazole (Vektor Laboratories) riedenom v 100mM NaCl, 100mM Tris-Cl pH 9,5 a 5mM MgCl₂. Na chromogénnu detekciu alkalické fosfatázy sa roztok inhibítora odsal a bunky sa inkubovali s roztokom farbiva fast red a naftolfosfátu (Pierce). Značenie bolo pozorované a fotografované v mikroskope pri malom zväčšení.

Ukladanie farbiva fast red bolo pozorované vo všetkých jamkách transfekovaných s plazmidom exprimujúcim BAFF-R, pJST535. Početnosť signálu sa znižovala, ako klesalo množstvo plazmidu transfekovaného do buniek. V bunkách transfekovaných kontrolným expresným vektorom, CH269 nebolo pozorované žiadne značenie. V transfekovaných bunkách tiež nebolo pozorované žiadne značenie, keď bol FLAG-hBAFF vypustený zo značiaceho protokolu alebo keď bol FLAG-hBAFF nahradený iným členom rodiny ligandu TNF, FLAG-značený LIGHT. Teda BAFF značenie buniek transfekovaných BAFF-R je špecifické.

Príklad 2

FACS analýza väzby BAFF na bunky transfekované BAFF-R

Tento príklad opisuje detekciu väzby BAFF na transfekované bunky BAFF-R s použitím FACS analýzy.

Plazmid kódujúci kompletný BAFF-R, pJST535 sa transfekoval do buniek 293EBNA použitím súpravy FuGene6 (Boehringer Mannheim). 24 alebo 48 hodín po transfekcii sa bunky odstránili z doštičiek použitím 5mM EDTA v PBS a počítali. Bunky sa premyli dvakrát pufrom FACS (PBS obsahujúci 10 % fetálne bovinné sérum, 0,1 % NaN_3 a 10 $\mu\text{g/ml}$ hIgG (Jackson ImmunoResearch)), a potom sa inkubovalo $2,5 \times 10^5$ buniek počas 1 hodiny na ľade s FLAG-hBAFF nariadeným vo FACS pufre v koncentrácii v rozmedzí od 9 $\mu\text{g/ml}$ do 0,037 $\mu\text{g/ml}$. Bunky sa premyli FACS pufrom a inkubovali s anti-FLAG monoklonálnou protilátkou, M2, v koncentrácii 5 $\mu\text{g/ml}$ počas 30 minút na ľade. Bunky sa premyli FACS pufrom a inkubovali počas 30 minút na ľade v roztoku obsahujúcom 1 : 100 riedenie oslieho protimýšieho IgG F(ab')₂ konjugovaného s R-fykoerytrínom a 10 $\mu\text{g/ml}$ 7-ADD. Potom, čo sa bunky premyli FACS pufrom, resuspendovali sa vo FACS pufre obsahujúcom 1 % paraformaldehyd. Nasledovala FACS analýza, keď boli 7-ADD pozitívne (mŕtve) bunky vylúčené.

Výsledky FACS analýzy ukázali, že frakcie buniek, ktoré sa transfekovali BAFF-R, sú schopné viazať BAFF. Pri BAFF koncentrácii 9 $\mu\text{g/ml}$, približne 28 % buniek viaže BAFF pri priemernej intenzite fluorescencie (MFI) 366. Pri použití samotnej PE-značenej oslej protimýšej reagentie nebol posun buniek významný. Iba 1,3 % buniek malo MFI 23,5, pričom priemer zo všetkých buniek bol 5,5. Signál buniek transfekovaných BAFF-R sa znižoval s klesajúcim množstvom BAFF. V koncentrácii 100 ng/ml malo 8,76 % buniek MFI 78,9.

Príklad 3

FACS analýza interakcie BAFF/BAFF-R vrátane GFP markera

V tomto príklade je opísaná schopnosť BAFF viazať sa na bunky transfekované spoločne (ko-transfekované) BAFF-R a GFP reportérovým plazmidom.

Bunky 293EBNA sa transfekovali pJST535 a GFP reportérovým plazmidom, ako bolo opísané v príklade 2. Reporterový plazmid kóduje GFP molekulu zakotvenú v membráne. Použitím kotransfekcie dvoch plazmidov analyzovali pôvodcovia percento transfekovaných buniek, ktoré boli schopné väzby na BAFF. Bunky sa odstránili z doštičiek a podrobili BAFF väzbe a detekcii, ako bolo opísané v príklade 2. Opäť bola zahrnutá 7-ADD, aby sa odčítali mŕtve bunky. Vzorky boli analyzované FACS a vynesené do grafu. Pravý horný kvadrant predstavuje bunky s naviazaným BAFF (fykoerytrín pozitívny) a exprimujúci GFP.

Hoci sa zdá, že nie všetky GFP transfekované bunky viažu BAFF, existuje významná frakcia buniek v pravom hornom kvadrante v porovnaní s kontrolami. 33 % transfekovaných buniek je v prvom hornom kvadrante v porovnaní s 8 %. Je možné, že je nevyhnutný určitý stupeň expresie BAFF-R, aby sa prejavila väzba BAFF na bunky. Je tiež možné, že je vyžadovaný koreceptor na interakciu s vysokou afinitou a že tento receptor je na bunkách 293EBNA limitujúci.

Príklad 4

Imunoprecipitácia FLAG-hBAFF fúziou BAFF-R-Fc

Tento príklad opisuje špecifickú interakciu FLAG-hBAFF s BAFF-R-Fc, molekulou zloženou z domény bohatej na cysteín (CRD) BAFF-R fúzovanej na Fc doménu ľudského IgG1.

CRD BAFF-R boli vytvorené pomocou RT-PCR z BJAB polyA+ RNA ako v príklade 1 použitím oligonukleotidu komplementárneho k nukleotidom 132-152 z hBAFF-R kódujúcej sekvencie ako 3'priméru. Výsledný PCR fragment sa klonoval do CH269 v smere od myšej IgG-kapa signálnej sekvencie a v protismere od Fc skupiny ľudského IgG. Tento konštrukt bol nazvaný pJST538. Konštrukt pJST538 alebo CH269 sa transfekoval do 293EBNA prostredníctvom lipofektamínu. Kondicionované médiá a bunkové extrakty sa zobrali 20 hodín po transfekcii. Bunky sa solubilizovali v 20 mM Tris pH 7,5/50 mM NaCl/0,5 % NP40/0,5 % deoxycholovej kyseliny a debris sa odstránil stočením. Alikvót kondicionovaného média a bunkové extrakty sa spojili s rovnakým objemom redukčného pufra 2xSDS, povarili a podrobili SDS-PAGE a Western prenosu. Aby sa overila expresia, membrána sa skúšala v 1 : 3000 riedení myšieho antihumánneho IgG konjugovaného s chrenovou peroxidázou (HRP) v 5 % odtučnenom sušenom mlieku v TBST pri teplote miestnosti počas 30 minút a premyla TBST. Membrány (bloty) boli vyvolané ECL (Amersham) a exponované na film.

Imunoprecipitácie sa uskutočňovali inkubáciou 25 ng buď FLAG-hBAFF, alebo FLAG-hTWEAK s 0,5 ml kondicionovaného média z 293EBNA transfekovaných buď pJST538, alebo CH269 pri 4 °C počas 1 hodiny s trepaním, a potom nasledovalo pridanie 30 μl Proteín A-Sepharose (Pharmacia) a pokračovalo trepanie cez noc. Proteín A-Sepharose perličky sa premyli dvakrát s PBS a resuspendovali vo vzorke redukčného pufra 2xSDS. Po SDS-PAGE a Western prenose sa bloty inkubovali s anti-FLAG monoklonálnou protilátkou M2 (Sigma) v koncentrácii 5 $\mu\text{g/ml}$ v 5 % odtučnenom sušenom mlieku v TBST pri teplote miestnosti počas 1 hodiny. Bloty sa premyli TBST a inkubovali s 1 : 3000 riedením kozieho protimýšieho IgG konjugátu s HRP (Jackson ImmunoResearch) v 5 % odtučnenom sušenom mlieku v TBS pri teplote miestnosti počas 30 minút.

Bloty boli vyvolané ECL (Amersham) a exponované na film.

Po transfekcii pJST538 do buniek 293EBNA sa detegovala expresia proteínu s veľkosťou približne 43kD ako v bunkovom extrakte, tak v kondiciovanom médiu analýzou Western blotom s myším antihumánnym IgG (Jackson ImmunoResearch), čo ukazovalo, že fúzia BAFF-R-Fc bola účinne exprimovaná a sekretovaná.

- 5 Pri imunoprecipitácii bol pozorovaný pás iba ako výsledok inkubácie BAFF-R-Fc a flag-hBAFF. Tento pás sa pohyboval spoločne s priamo nanesenou vzorkou flag-hBAFF. Žiadna ďalšia dráha nevytvorila signál, čo ukázalo, že interakcia medzi BAFF-R-Fc a flag-hBAFF je špecifická.

Príklad 5

- 10 Vytvorenie rozpustných foriem receptora

Aby sa vytvoril inhibítor receptora na použitie u človeka, je nutná cDNA sekvencia extracelulárnej domény humánneho receptora. Ak je známa myšia forma, je uskutočňovaný skrining humánnych cDNA knižníc použitím myšej cDNA sekvencie a v tejto oblasti sú tieto manipulácie uskutočňované rutinne. S humánnou cDNA sekvenciou je možné navrhnúť oligonukleotidové priméry, aby sa pomocou PCR amplifikovala extracelulárna doména receptora bez transmembránových a intracelulárnych domén. Typicky je zahrnutá väčšina aminokyselín medzi TFN doménou spojenou s posledným disulfidickým mostíkom a transmembránovou doménou. Je možné meniť množstvo stonkových oblastí zahrnutých na optimalizáciu potencie výsledného rozpustného receptora. Tento amplifikovaný úsek je upravený metódami genetického inžinierstva tak, aby zahŕňal vhodné reštrikčné miesta na klonovanie do rôznych vektorov na vytváranie fúznej chiméry s C-koncom Ig. Alebo je možné vložiť stop signál na 3'koniec a vytvoriť rozpustnú formu receptora bez pokusu použiť prístup s fúznou chimérou Ig.

25 Výsledné vektory môžu byť exprimované vo väčšine systémov používaných v biotechnológiách vrátane kvasiniek, hmyzích buniek, baktérií a cicavčích buniek a pre všetky typy expsie existujú príklady. Rôzne humánne Fc domény môžu byť pripojené, aby sa optimalizovali alebo eliminovali interakcie FcR a komplexu, ak je to žiaduce. Alebo sa môžu použiť mutované formy týchto Fc domén, aby sa selektívne odstránili interakcie FcR alebo komplexu, či pripojenie sacharidov N-pripojených na Fc doménu, čo má určité výhody.

Príklad 6

- 30 Príprava agonistických alebo antagonistických protilátok

Opísané rozpustné formy receptora môžu byť použité na imunizáciu myší a na vytváranie monoklonálnych protilátok (mAbs) obvyklými metódami. Výsledné mAbs, ktoré sú identifikované pomocou metód ELISA, môžu byť ďalej podrobené skriningu na to, či majú agonistickú aktivitu, a to buď ako rozpustné protilátky, alebo imobilizované na umelej hmote v rôznych *in vitro* bunkových testoch. Usmrtenie bunkovej línie HT29 je často vhodný systém, ktorý je citlivý na signalizáciu prostredníctvom mnohých TNF receptorov. Ak táto línia nemá skúmaný receptor, môže byť tento kompletný receptor stabilne transfekovaný do línie HT29, aby sa umožnilo fungovanie cytotoxického testu. Alebo môžu byť tieto bunky použité v prístroji Cytosensor, aby sa určilo, či aktivácia receptora môže vyvolať zmenu pH, ktorá je indikátorom signálneho javu. Rodina TNF receptorov v tomto usporiadaní signalizuje dobre a táto metóda nevyžaduje znalosť aktuálnych biologických javov spúšťaných receptorom. Agonistické mAbs môžu byť „humanizované“ na klinické použitie. Tento postup sa môže tiež použiť na charakterizáciu antagonistických mAbs. Pre tieto mAbs je charakteristický nedostatok agonistickej aktivity a schopnosť inhibovať interakcie receptor-ligand, ako je monitorované technikami ELISA, technikou klasickej väzby alebo technikou BIAcore. Nakoniec, indukcia sekrécie chemokínov rôznymi bunkami ako reakcia na agonistickú protilátku môže tvoriť základ pre skriningový test (metódu).

45

Príklad 7

Skrining inhibítorov interakcie receptor-ligand

Použitím fúzneho proteínu receptor-Ig je možné uskutočňovať skrining kombinačných knižníc na molekuly, ktoré môžu viazať receptor priamo. Tieto molekuly môžu byť potom testované v testoch ELISA použitím fúzneho proteínu receptor-Ig a rozpustnej formy ligandu na schopnosť inhibovať interakcie receptor-ligand. Táto ELISA môže byť použitá priamo na uskutočňovanie skriningu rôznych knižníc s prírodnými produktmi a pod. na inhibičné zlúčeniny. Receptor môže byť transfekovaný do bunkovej línie, ako je napríklad línia HT29, aby vznikol biologický test (v tomto prípade cytotoxický), ktorý potom vytvorí test vhodný na skrining.

55

Príklad 8

BAFF-R-IgG vyvoláva zníženie počtu B-lymfocytov u normálnych myší.

Osem týždňov staré samice myší BALB/c boli zakúpené od The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Myši (3/skupina) dostali i. p. buď PBS, 400 µg fúzneho proteínu humánneho BAFF-R-huIgG1 (hBAFF-R-Ig) (dodávaný firmou Teresa Cachero, Biogen), alebo 400 µg purifikovaného humánneho IgG (HuIgG)

60

(Sandoz, Bazilej, Švajčiarsko) v dňoch -8, -5, -1 a +2. Myši dostali 100 µl 10 % ovčích červených krviniek (SRBC) (Colorado Serum Company, Denver, CO) v deň 0.

V čase utrácania zvierat sa krv odoberala prostredníctvom punkcie srdca do skúmaviek obsahujúcich EDTA a červené krvinky sa lyzovali v hypotonickom pufrí. Krv sa tiež odoberala bez EDTA na sérové preparáty. Jednoduché bunkové suspenzie sa pripravili zo slezín a mezenterických lymfatických uzlín (MNL) a červené krvinky sa lyzovali v hypotonickom pufrí. Uskutočnila sa prietoková cytometria použitím PE-konjugovanej anti-CD45R/B220, anti-syndekan/CD138 a anti-B7.2 a FITC-konjugovaného anti-IgM a anti-CD45R/B220. Všetky mAbs boli zakúpené od firmy Pharmingen (San Diego, CA). Stručne, Fc receptory boli blokované prípravkom Fc Block (Pharmingen) v koncentrácii 10 µg/ml počas 15 minút na ľade, potom nasledovalo pridanie PE- a FITC-konjugovaných mAbs a inkubovanie na ľade počas 20 – 30 minút. Bunky sa 1 x premyli a suspendovali v 0,5 % paraformaldehyde. Dáta fluorescencie buniek sa získali na prietokovom cytometri FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) a analyzovali použitím softvéru CELLQuest™ (Becton Dickinson).

Po ošetrení s hBAFF-R-Ig nastala približne 50 % redukcia počtu B-lymfocytov v periférnej krvi a vo vyšetrených periférnych lymfatických orgánoch. B220^{high} IgM^{low} B-lymfocyty zodpovedali 23,4 % a 21,5 % buniek u myši ošetrených PBS a HuIgG, v danom poradí, zatiaľ čo táto populácia predstavovala iba 9,9 % buniek u myši ošetrených hBAFF-R-Ig. Počet plazmatických buniek (syndekan/CD138+) tiež ľahko poklesol, s 5,7 % a 4,8 % prítomnými v krvi myši ošetrených PBS a myši ošetrených HuIgG, v danom poradí, v porovnaní s 3,9 % u myši ošetrených hBAFF-R-Ig. B7.2 molekula bola zvýšená na 3,1 % a 4,5 % B220+ buniek u myši ošetrených PBS a myši ošetrených HuIgG, v danom poradí, v porovnaní s 1,9 % u myši ošetrených hBAFF-R-Ig.

B220^{high} B-lymfocyty v slezine boli výrazne redukované u myši ošetrených hBAFF-R-Ig, predstavovali 18,8 %, v porovnaní s 36,7 % a 40 % u myši ošetrených PBS a HuIgG, v danom poradí. Tento pokles bol pozorovaný u oboch populácií, IgM^{high} a IgM^{low} (pozri tabuľka 8A). Žiadna zmena nebola pozorovaná v novom vytvorenom kompartmente B-lymfocytov v slezine, B220^{low} IgM^{high} (dáta nie sú ukázané). Počet plazmatických buniek (syndekan/CD138+) tiež ľahko poklesol s 3,3 % a 3,4 % prítomnými v slezine myši ošetrených PBS a myši ošetrených HuIgG, v danom poradí, v porovnaní s 2,4 % u myši ošetrených hBAFF-R-Ig.

MLN prejavovali pokles B220+ B-lymfocytov s 14,1 % prítomnými u myši ošetrených hBAFF-R-Ig v porovnaní s 26,7 % a 35,8 % u myši ošetrených PBS a myši ošetrených HuIgG, v danom poradí. Dáta sú zhrnuté v tabuľke 8A.

Tabuľka 8A

Populácia B-lymfocytov u myši¹ ošetrených hBAFF-R-Ig, PBS a HuIgG

Krv	B220 ^{high} IgM ^{low}	Syndekan	B7.2/B220 ^{low}
PBS	23,4 ± 5,7	5,7 ± 1,5	3,1 ± 0,5
HuIgG	21,5 ± 4,5	4,8 ± 0,9	4,5 ± 1,0
HBAFF-R-Ig	9,9 ± 1,8	3,9 ± 0,6	1,9 ± 0,5
Slezina	B220 ^{high} IgM ^{low}	B220 ^{high} IgM ⁺	Syndekan
PBS	27,8 ± 1,6	11,9 ± 1,6	3,3 ± 0,8
HuIgG	30,5 ± 2	11,8 ± 1,0	3,4 ± 0,7
HBAFF-R-Ig	10,6 ± 0,2	8,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2
MLN	B220 ⁺		
PBS	26,7		
HuIgG	35,8 ± 3,3		
HBAFF-R-Ig	14,1 ± 5,9		

¹Myši boli ošetrené tak, ako bolo opísané v časti Materiál a metódy, a dáta sú udané ako percento ± smerodajná odchýlka

Znížené percento B7.2+ B-lymfocytov v krvi a plazmatických buniek v krvi a slezinách u myši ošetrených hBAFF-R-Ig po imunizácii s SRBCs svedčí o tom, že existuje inhibícia aktivácie a/alebo maturácie B-lymfocytov a potenciálne zvýšená eliminácia aktivovaných B-lymfocytov. Veľmi malé percento antigénne špecifických B-lymfocytov bolo aktivované a odpovedalo na nejaký antigén, v tomto prípade SRBC. Pretože ošetrenie hBAFF-R-Ig malo za následok takú dramatickú redukciu percenta B-lymfocytov vo všetkých vyšetrovaných tkanivách, ~50 %, zdá sa, že aktivita hBAFF-R-Ig tiež cieľi na pokojné, zrelé B-lymfocyty.

Predpokladá sa teda, že fúzny proteín BAFF-R môže byť použitý ako liečivo s klinickou aplikáciou pri ochoreniach, ktoré sú sprostredkované B-lymfocytmi. K týmto ochoreniam patria tie, ktoré sú autoimunitnej povahy, ako je napríklad systémový lupus erythematosus, myasténia gravis, autoimunitná hemolytická anémia, idiopatická trombocytopenická purpura, antifosfolipidový syndróm, Chagaova choroba, Graveova choroba, Wegenerova granulomatóza, nodózna polyarteritída a rýchla progresívna glomerulonefritída. Liečivo je tiež použiteľné pri chorobách plazmatických buniek, ako je napríklad mnohopočetný myelóm, Waldenstro-

mova makroglobulinémia, ochorenie ťažkých reťazcov, primárna amyloidóza alebo amyloidóza združená s imunocytmí a idiopatická monoklonálna gamapatia (MGUS). Onkologické ciele zahŕňajú karcinómy, leukémie a lymfómy pochádzajúce z B-lymfocytov.

5 Príklad 9

Blokovanie proliferácie B-lymfocytov indukovanej BAFF *in vitro* použitím rozpustného BAFF-R

V tomto príklade pôvodcovia dokázali, že rozpustný fúzny proteín BAFF-R:hIgG1 je schopný blokovat proliferáciu B-lymfocytov indukovanú BAFF v myších splenocytoch.

10 Myšie splenocyty (5×10^5 buniek/ml) z myší Balb/c sa izolovali a pestovali na 96 jamkových doštičkách v 100 μ l RPMI (Life Technologies) doplnenom 10 % fetálnym telacím sérom (JHR), 2 mM glutamínom, 100 jednotkami/ml penicilínu a 100 mg/ml streptomycínu (Life Technologies). Potom sa pridali rôzne množstvá humánneho BAFF, 10 μ g/ml humánneho BAFF-R: hIgG1 alebo humánneho Ig ako aj 10 μ g/ml antimyšieho povrchového ťažkého reťazca μ (Jackson ImmunoResearch). Po 48 hodinách sa v tkanivovej kultúre pri 37 °C bunkám podal impulz počas 24 hodín 1 μ Ci/jamku (metyl- 3 H) tymidínu (Dupont NEN) a bunky sa zozbierali 15 použitím prístroja na zbieranie buniek Tomtec (Orange, CT). Rádioaktivita sa merala scintilačným počítačom pre kvapaliny Betaplate (Pharmacia Biotech).

Obrázok 8 ukazuje výsledky testu proliferácie splenocytov. Sú ukázané impulzy za minútu (CPM) inkorporované do myších splenocytov oproti množstvu pridaného humánneho BAFF. Stupeň anti- μ alebo fúzneho proteínu alebo kontrolného hIgG je udržiavaný v konštantnej koncentrácii 10 μ g/ml. Plné štvorčky predstavujú stupeň proliferácie indukovanej samotným BAFF. Plné krúžky predstavujú proliferáciu buniek s BAFF a anti- μ . Krivka s prázdnyimi trojuholníkmi predstavuje inhibíciu pozorovanú, keď je pridaný BAFF-R: hIgG1BAFF s anti- μ plus BAFF-R: hIgG1. Prázdny kosoštvorec predstavuje inhibíciu pozorovanú pri použití kontrolného humánneho Ig.

25 Pridanie BAFF plus anti- μ má za následok proliferáciu myších splenocytov *in vitro*. Hladina 3 H tymidínu inkorporovaného do buniek je významne vyššia ako hladina získaná, keď je k splenocytom pridaný buď samotný BAFF, alebo samotná anti- μ . Ošetrovanie splenocytov samotným BAFF má za následok inkorporáciu 3 H tymidínu iba pri veľmi vysokých koncentráciách. Pridanie samotného anti- μ nemá za následok proliferáciu. Keď bol pridaný kontrolný humánny Ig v koncentrácii 10 μ g/ml, nastal mierny pokles stupňa proliferácie. Na rozdiel od toho, keď bol do testu pridaný fúzny proteín humánny BAFF-R: hIgG1 v koncentrácii 10 μ g/ml za 30 rovnakých podmienok, rozsah proliferácie bol redukovaný na stupeň pozorovaný pri ošetrovaní samotným BAFF. To ukazuje, že fúzny proteín BAFF-R:hIgG1 je schopný inhibovať proliferáciu splenocytov indukovanou BAFF a anti- μ .

Príklad 10

35 Blokovanie väzby BAFF na bunky Raji použitím BAFF-R:hIgG1

V tomto príklade je opísaná preinkubácia BAFF s fúznym proteínom BAFF-R:hIgG1, ktorá má za následok redukciiu BAFF väzby na bunkovú líniu Raji lymfómu z B-lymfocytov.

40 V tomto FACS teste sa 200 ng/ml FLAG-značeného (FLAG-tagged) humánneho BAFF preinkubovalo buď s humánnym BAFF-R:hIgG1, alebo humánnym LT β R:hIgG1 v dvojkových riedeniach v rozmedzí od 20 μ g/ml do 39 ng/ml alebo bez fúzneho proteínu počas 30 minút na ľade. Inkubácia sa uskutočňovala vo FACS pufrí obsahujúcom PBS bez Ca^{2+} alebo Mg^{2+} a 10 % FCS (JRH) a 0,05 % azid sodný. Po preinkubácii sa zmes BAFF-fúzneho proteínu pridala k 5×10^6 Raji (ATCC) buniek/ml. Táto inkubácia prebiehala počas 30 minút na ľade a bunky sa potom premyli 2 ml FACS pufru pri 4 °C. Aby sa detegoval naviazaný BAFF, k bunkám sa pridala anti-FLAG protilátka M2. (Sigma) v koncentrácii 5 μ g/ml a inkubovala počas 30 minút na ľade. 45 Bunky sa opäť premyli, ako je uvedené, a potom sa inkubovali s 1 : 100 riedením oslieho protimyšieho Ig (Jackson ImmunoResearch) konjugovaného s PE počas 30 minút na ľade. Potom sa bunky opäť premyli FACS pufrom, fixovali 1 % paraformaldehydom a odčítali prístrojom FACS® (Becton Dickinson a Co.).

Obrázok 9 ukazuje výsledky BAFF blokujúceho testu. Sú ukázané MFI (priemer intenzity fluorescencie) údaje, ktoré sú výsledkom analýzy FACS® vyšetrujúcej väzbu BAFF na bunky Raji. Plné štvorčky predstavujú dáta, keď sa humánna BAFF-R:hIgG1 preinkubovala s BAFF pred väzbou na bunky. Krúžky ukazujú krivku, ktorá je dôsledkom pridaní nešpecifického fúzneho proteínu, humánneho LT β R:hIgG1 na BAFF. Os x predstavuje množstvo fúzneho proteínu pridaného k BAFF v koncentrácii 200 ng/ml pred inkubáciou s bunkami.

50 Keď nebol s humánnym BAFF preinkubovaný žiadny fúzny proteín, priemerná intenzita fluorescencie (MFI) vzorky bola 80. Keď bol s BAFF preinkubovaný humánny LTPR:hIgG1, dokonca aj v koncentrácii 20 μ g/ml, detekcia väzby BAFF na bunky Raji bola nezmenená. Keď bol ale s BAFF preinkubovaný humánny BAFF-R:hIgG1, nastalo podstatné zníženie MFI, až na 20 – 25, dokonca aj pri koncentrácii fúzneho proteínu 625 ng/ml. Pozadie MFI na tento pokus bolo 7. BAFF-R:hIgG1 je teda veľmi účinný pri blokovaní väzby BAFF na lymfocyty Raji.

60

Príklad 11

BAFF-R-IgG zmiernuje autoimunitnú chorobu typu lupus u transgénnych myší

Tento príklad opisuje účinok BAFF-R-Ig na zníženie počtu periférnych B-lymfocytov a inhibíciu rozvoja splenomegálie a nefritídy.

5 V pokuse sa použili päť mesiacov staré BAFF transgénne (Tg) myši (C57BL/6) a vekovo porovnateľné kontrolné myši. U BAFF Tg myší sa manifestovali ochorenia lymfocytov a autoimunitný fenotyp podobný systémovému lupus erythematosus (Mackay et al., 1999). Tento fenotyp zahŕňa zvýšenie periférnych populácií B-lymfocytov vrátane prechodnej 1 (T1) a 2 (T2), zrelej (M), marginálnej zóny (MZ) a B-lymfocytov $CD1^{high}/IgM^{high}$.

10 Myši dostali i. p. PBS, 400 μ g purifikovaného humánneho IgG (hIg) (Sandoz, Bazilej, Švajčiarsko) (3/skupina) alebo 400 μ g fúzneho proteínu humánneho BAFF-R-huIgG1 pochádzajúceho z buniek CHO (hBCMA-Ig) (2/skupina) v dňoch 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35, a boli utratené v deň 40.

15 V čase utratenia zvierat sa odvážila slezina a pripravili sa jednoduché bunkové suspenzie po lýze červených krviniek v hypotonickom pufrí. Uskutočnila sa prietoková cytometria použitím FITC-konjugovanej anti-CD21/CD35, PE-konjugovanej anti-IgD a antiCD1, anti-CD45R/B220 konjugovanej s cychrómom (cyochrome) a anti-IgM konjugovanej s biotínom. Všetky mAbs boli zakúpené od firmy Pharmingen (San Diego, CA). Stručne, Fc receptory boli blokované činidlom Fc Block (Pharmingen) v koncentrácii 10 μ g/ml počas 10 minút na ľade, potom nasledovalo pridanie mAbs konjugovaných s biotínom počas 30 minút na ľade, bunky sa 1x premyli, potom nasledovalo pridanie Abs konjugovaných s FITC, PE, Cyochrome, streptavidín APC a FcBlock v koncentrácii 10 Bunky sa inkubovali počas 30 minút na ľade, 1 x premyli a suspendovali v 0,5 % paraformaldehyde. Dáta fluorescencie buniek sa získali na prístroji FACSCalibur (prietokový cyto-

20 meter, Becton Dickinson, San Jose, CA) a analyzovali použitím softvéru CELLQuest (Becton Dickinson).

Výskyt proteínov v moči myší sa meral použitím reagenčných prúžkov Multistix 10 SG na analýzu moču (Bayer Corp., Diagnostics Division).

25 Výsledky sú ukázané v tabuľkách 11A a 11B.

Tabuľka 11A

Analýza splenocytov počas 3 mesiacov

30 Celkový počet buniek na slezinu ($\times 10^6$)

	T1	T2	MZ	Zrelé
Myši BAFF Tg 816E23	9,4	18	9	91
816E33	14	30	19	170
816E99	14	24	19	150
Priemer	13+/-2,6	24+/-6	16+/-5,7	140+/-41
Kontrolné myši 816E2	5,3	5,8	3,1	73
816E4	2,4	3,7	1,9	44
Priemer	3,9+/-2	4,8+/-1,5	2,4+/-1	59+/-20

Sleziny myší Baff Tg starých 3 mesiace ($n = 3$) a vekovo porovnateľných kontrolných myší ($n = 2$) sa izolovali a podrobili analýzám FACS tak, ako bolo opísané v časti Materiál a metódy. T1, T2, M a MZ bunky boli definované expresiou nasledujúcich povrchových markerov (hi:high - vysoký, lo:low - nízky, int:intermediate - stredný):

35 T1: IgD^- , IgM^{high} , $CD21^{lo}$

MZ: IgD^- , IgM^{hi} , $CD21$

T2: IgD^+ , IgM^{hi} , $CD21^{hi}$

M: IgD^+ , IgM^{lo} , $CD21^{int}$

40

Tabuľka 11B

Analýza splenocytov počas 10 mesiacov

Celkový počet buniek na slezinu ($\times 10^6$)

	T1	T2	MZ	Zrelé
Myši BAFF Tg				
802-39	13	100	34	630
823-3-11	7,5	43	6,6	200
823-3-13	3,1	50	15	180

	T1	T2	MZ	Zrelé
Priemer	7,9+/-4,9	64+/-30	19+/-10	340+/-250
Kontrolné myši				
823-3-22	0,7	6,5	1,4	56
802-64	0,28	5,4	1,3	38
823-14-13	0,45	3,4	0,16	38
Priemer	0,48+/-0,21	5,1+/-1,5	0,95+/-0,65	44+/-10

Myši Baff Tg staré 10 mesiacov (n = 3) a vekovo porovnateľné kontrolné myši (n = 3) sa podrobili analýzam FACS tak, ako bolo opísané v tabuľke 1.

Po podávaní hBAFF-R-Ig myšiam BAFF Tg boli významne redukované populácie T1, T2, M, MZ a CD1^{high}/IgM^{high} B-lymfocytov v slezine, v porovnaní s myšami Baff Tg ošetrovanými PBS a hIg, celkové počty T1, T2, M, MZ a CD1^{high}/IgM^{high} B-lymfocytov boli redukované na počet podobný alebo nižší než u kontrolných myši ošetrovaných PBS (Fig. 10a, 10b, 10c).

BAFF-R-Ig ošetrovanie myši BAFF Tg malo za následok zmiernenie autoimunitného ochorenia sprostredkovaného Baff, ako sa dokázalo pozorovaním, že myši ošetrované BAFF-R mali sleziny normálnej veľkosti, zatiaľ čo u kontrolne ošetrovaných myši Baff Tg bola dokázaná splenomegália (obr. 11). Okrem toho bol u myši ošetrovaných BAFF-R-Ig inhibovaný rozvoj proteínúrie, indikátora renálnej disfunkcie, zatiaľ čo u kontrolne ošetrovaných myši Baff Tg sa rozvinula nefritída, ako sa zistilo zvyšovaním stupňa proteínúrie (pozri obr. 12).

Myši transgénné v Baff mali vysoko zvýšené počty periférnych B-lymfocytov a ďalšie analýzy týchto myši odhalili zvýšenie prevažne subpopulácií T1, T2 a MZ B-lymfocytov. Prechodný stupeň vývoja B-lymfocytov (T1 a T2) je kontrolný bod, keď sú autoreaktívne B-lymfocyty pravdepodobne odstránené. CD1^{hi}/IgM^{high} B-lymfocyty, ktoré majú tendenciu usadiť sa v marginálnej zóne, boli tiež u myši BAFF Tg vysoko zvýšené. Ukázalo sa, že táto posledná populácia B-lymfocytov bola hlavný zdroj produkcie autoprotilátok u lupoiných myši NZB/NZW. Ošetrovanie myši BAFF Tg s BAFF-R-Ig malo za následok redukciu populácií T1, T2, MZ a CD1^{hi} B-lymfocytov na počet podobný alebo nižší ako počet nájdený u kontrolných myši divého typu.

BAFF-R-Ig spôsobil zníženie počtu periférnych B-lymfocytov a inhiboval rozvoj splenomegálie a nefritídy. Teda, okrem jeho použiteľnosti pri systémovom lupus erythematosus a lupusovej nefritídy, účinok BAFF-R-Ig je tiež užitočný pri ochoreniach sprostredkovaných B-lymfocytmi, ktoré sú autoimunitnej povahy, ako je napríklad systémový lupus erythematosus, myasténia gravis, autoimunitná hemolytická anémia, idiopatická trombocytopenická purpura, antifosfolipidový syndróm, Chagaovo ochorenie, Graveovo ochorenie, Wegenerova granulomatóza, nodózna polyarteritída a rýchla progresívna glomerulonefritída. Liečivo je tiež použiteľné pri chorobách plazmatických buniek, ako je napríklad mnohopočetný myelóm, Waldenstromova makroglobulinémia, ochorenie ťažkých reťazcov, primárna amyloidóza alebo amyloidóza združená s imunocytmami a idiopatická monoklonálna gamapatia (MGUS). Onkologické ciele zahŕňajú karcinómy, leukémie a lymfómy pochádzajúce z B-lymfocytov.

Príklad 12

Priemerný arteriálny tlak u BAFF transgénnych myši

Tento experiment opisuje meranie krvného tlaku u BAFF transgénnych myši. Pozorovania, ktoré sa uskutočnili v priebehu vyhodnocovania fenotypu BAFF transgénnych myši, ukazovali na potenciálnu hypertenziu u myši.

BAFF Tg myši už opísané sa podrobili anestéze ketamínom. Ľavá karotída sa odkryla incíziou na krku. Do karotídy sa vložil katéter na meranie krvného tlaku a srdcovej činnosti. Katéter bol spojený s tlakovým snímačom a krvný tlak sa meral pomocou Gouldovho datazberného systému a Gouldovho polygrafu (Po-Ne-Mah Data Acquisition system and Gould polygraph). Z priebehu tlakových vln sa určil systolický tlak, diastolický tlak, priemerný tlak a srdcová frekvencia. Boli použité dve skupiny myši: BAFF transgénné myši (n = 8) a kontrolné myši divého typu (n = 9).

Obrázok 13 ukazuje priemery hodnôt priemerných arteriálnych tlakov, MAP (v mmHg) pre dve skupiny myši. Ako je ukázané, BAFF transgénné myši mali priemerný MAP 102 ± 8 mmHg. Kontrolné myši mali priemerný MAP 92 ± 6 mmHg. Takže BAFF myši vykazovali 10 mmHg zvýšenie v porovnaní s kontrolnými zvieratami, aj keď tento rozdiel nebol štatisticky dokázaný (ANOVA).

Podrobnejšia analýza týchto dát je uvedená na obrázku 14, kde sú uvedené výsledky merania jednotlivých zvierat. U kontrolných myši divého typu (BAFF-) distribúcia hodnôt vykazuje typické binomické rozdelenie. Oproti tomu tlaky u BAFF transgénnych myši (BAFF+) javia distribúciu do dvoch skupín, jedna skupina v rozmedzí 120 až 130 mmHg a druhá skupina v rozmedzí 80 až 90 mmHg.

Ako populácia majú BAFF transgénné myši tendenciu k hypertenzii v porovnaní s negatívnymi kontrolnými myšami.

Analýza individuálnych hodnôt arteriálneho tlaku ukázala, že tlak delí transgénné myši na dve subpopulá-

cie, jednu s vysokým krvným tlakom a druhú s normálnym krvným tlakom. Podávanie rozpustného BAFF-R, fúzneho proteínu alebo homológu protilátky môže zmierniť účinky hypertenzie.

Príklad 13

5 Liečenie myší SNF₁ s už rozvinutým ochorením podávaním BAFF-R-Ig spomaľuje progresiu silnej nefritídy
 Samice myší (SWR x NZB) F1 (SNF₁) náchylné na lupus v 21 týždni, ktoré vykazujú príznaky miernej nefritídy (proteinúrie 30 až 100 mg/dl), dostávali počas 8 týždňov jedenkrát týždenne i. p. injekciu 200 µg fúzneho proteínu ľudského BAFF-R-huIgG1 (hBCMA-Ig), ľudský IgG (HuIgG) (Sandóz) alebo 200 µl PBS.

10 Moč každej myši sa monitoroval na proteinúriu pomocou zariadenia Albustix (Bayer Corp., Terrytown, NY). Proteinúria vyššia ako 100 mg/dl sa hodnotila ako závažná nefritída. BAFF-R-Ig bol produkovaný v dočasne transfekovaných bunkách EBNA 293. Upravené médium z buniek 293 exprimujúcich hBCMA-Ig sa nanieslo na proteínovú kolónu. Proteín sa eluoval použitím pufru obsahujúceho 25 mM fosfát, 100 mM NaCl, pH 2,8 na neutralizáciu 1/20 objemu 0,5M NaPO₄ pH 8,6. Frakcie vybrané na základe meraní OD280
 15 sa analyzovali SDS-PAGE v redukujúcich a neredukujúcich podmienkach a ďalej Western blotmi, aby sa identifikoval purifikovaný proteín.

20 Tri týždne po ukončení liečenia 50 % myší liečených BAFF-R-Ig vykazovalo závažnú nefritídu, v porovnaní so 75 % a 87,5 % myší, ktoré dostali HuIgG a PBS (pozri obrázok 15). Tieto dáta ukazujú, že rozpustný BAFF receptor, BCMA-Ig, pôsobí tak, že blokuje autoimunitné ochorenie sprostredkované B-lymfocytmí, ako je lupusová nefritída, čo vedie k značnému spomaleniu progresie ochorenia.

Príklad 14

Podávanie BAFF-R-Ig normálnym myšiam vedie k zníženiu počtu dendritických buniek (DC) v slezine a atypickej lokalizácii v slezine

25 Samice sedem týždňov starých myší BALB/c (3/skupina) dostávali 1 x týždenne počas 4 týždňov i. p. injekciu 20 µg alebo 50 µg ľudského BAFF-R-IgG1 (hBCMA-Ig), 50 µg ľudského IgG (HuIgG) alebo 100 µl PBS. Fúzny proteín hBCMA-Ig sa purifikoval zo supernatantu kultúry trvalo transfekovaných buniek. Sleziny boli získané 8 dní po poslednej injekcii a ošetrované kolagenázou (Sigma, katalóg. Č. C-5138) 1 hodinu pri 37 °C. Pripravila sa suspenzia jednotlivých buniek, červené krvinky (RBCs) sa lyzovali v hypotonickom pufrí a bunky sa opláchli 3 x v PBS. Splenocyty sa pripravili na prietokovú cytometrickú analýzu zafarbením pomocou anti-CD11c-biotínu nasledovanom streptavidín-APC, anti-CD8a-cychrom a anti-CD4-FITC na vyhodnotenie populácií DC.

30 V oddelenom experimente samice myší BALB/c (N = 3) dostávali počas 4 týždňov 1 x za týždeň i. p. injekciu 100 µg hBCMA-Ig, potom sa sleziny odstránili a veľmi rýchlo zamrazili v OCT použitím 2-metylbutánu zamrazenom na CO₂. Kryorezy sa pripravili a fixovali v acetóne. Rezy sa inkubovali s anti-CD11c-biotínom nasledovaným streptavidín-AP a substrátom BCIP (Pierce) na vizualizáciu DC, monoklonálnou protilátkou MOMA-1 nasledovanou antipotkaňou IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch) a substrátom 3,3'-diaminobenzidínom (Sigma, St. Louis MO, katalóg, č. D-1293) na vizualizáciu metalofilných makrofágov a anti-CD35-biotínom nasledovaným streptavidín-AP a substrátom (Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Vector, katalóg. Č. SK-5100) na vizualizáciu folikulárných dendritických buniek (FDC).

40 Myši *in vivo* liečené podávaním 20 µg alebo 50 µg BCMA-Ig 1 x týždenne počas 4 týždňov vykazovali významné zníženie ($p < 0,05$ v Studentovom t-teste) počtu slezinných CD11c+ DC v porovnaní s kontrolami, ktorým sa podával HuIgG alebo PBS. Toto zníženie bolo pozorované u všetkých skúmaných populácií CD11c+ DC: CD8a-CD4-, CDB8+ CD4- a CD8a-CD4+ (pozri obrázok 16, tabuľka 14A).

45 Tabuľka 14A
 Podávanie BAFF-R-Ig vedie k zníženiu počtu DC v slezine

	PBS	HuIgG	20 µg BCMA-Ig	50 µg BCMA-Ig
	Priemerný počet CD11+ DC ($\times 10^6$) \pm smerodajná odchýlka			
CD8a-CD4-	0,81 \pm 0,15	0,49 \pm 0,07	0,26 \pm 0,04	0,35 \pm 0,05
CD8a+CD4-	0,36 \pm 0,02	0,35 \pm 0,07	0,16 \pm 0,02	0,2 \pm 0,02
CD8a-CD4+	0,92 \pm 0,02	0,84 \pm 0,15	0,4 \pm 0,06	0,55 \pm 0,04

50 Tento pokles slezinných DC, čo sú kritické bunky prezentujúce antigén, má vplyv na aktiváciu B-lymfocytov, ich zrenie a celkovú humorálnu imunitu.

Zmrazené rezy zo sleziny myší sa pripravili ako bolo opísané v časti Materiál a metódy. Myši liečené BCMA-Ig vykazovali atypický profil usadzovania DC, keď boli vzorky zafarbené anti-CD11c. DC sú normálne lokalizované vnútri oblasti T-lymfocytov v bielej dreni a v marginálnej zóne s tým, že k ich koncentrácii dochádza v mostíkových kanálikoch marginálnej zóny. Ale bolo zistené, že DC z myší liečených

- BCMA-Ig sa vyskytujú pozdĺž obvodu marginálnej zóny a len niekoľko málo ich bolo schopných migrovať hlbšie do bielej drene (dáta nie sú uvedené). Teda sa zdá, že blokovanie interakcie BAFF/BAFF-R použitím rozpustného receptora BAFF interferuje s profilom osídľovania DC, čo zrejme ovplyvňuje ich schopnosť fungovať ako bunky prezentujúce antigén, a teda má vplyv na aktiváciu a zrenie B-lymfocytov a tiež na humorálnu imunitu. Navyše sleziny myší liečených BCMA-Ig postrádajú CD35+ FDC, ako sa zistilo imunohistochemickou analýzou (dáta neuvedené). Pretože funkciou FDC je prezentovať antigén B-lymfocytom v germinálnych centrách (GC), nedostatok týchto buniek môže mať škodlivý účinok na štruktúru GC a afinitné zrenie B-lymfocytov.
- Odborníkovi je jasné, že sú možné rôzne modifikácie a varianty polypeptidov, kompozícií a spôsobov podľa vynálezu, ale v rámci zhodnej vynálezcovskej myšlienky predloženého vynálezu. Aj tieto prípadné modifikácie a varianty patria do rozsahu vynálezu, ktorý je definovaný pripojenými patentovými nárokmi a ich ekvivalentmi.

Zoznam sekvencií

<110> MacKay, Fabienne
 Browning, Jeffrey
 Ambrose, Christine
 Tschopp, Jurg
 Schneider, Pascal
 Thompson, Jeffrey
 Biogen, Inc.
 Apotech R&D S. A.

<120>

<130> A080PCT

<140> PCT/US00/22507

<141> 2000-08-16

<150> 60/149,378

<151> 1999-08-17

<150> 60/181,684

<151> 2000-02-11

<150> 60/183,536

<151> 2000-0,2-18

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

SK 288287 B6

Ser	Ser	Glu	Pro	Leu	Lys	Asp	Glu	Phe	Lys	Asn	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu
				85					90					95	
Leu	Gly	Met	Ala	Asn	Ile	Asp	Leu	Glu	Lys	Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Glu
			100					105					110		
Ile	Ile	Leu	Pro	Arg	Gly	Leu	Glu	Tyr	Thr	Val	Glu	Glu	Cys	Thr	Cys
		115					120					125			
Glu	Asp	Cys	Ile	Lys	Ser	Lys	Pro	Lys	Val	Asp	Ser	Asp	His	Cys	Phe
	130					135					140				
Pro	Leu	Pro	Ala	Met	Glu	Glu	Gly	Ala	Thr	Ile	Leu	Val	Thr	Thr	Lys
	145				150					155					160
Thr	Asn	Asp	Tyr	Cys	Lys	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Thr	Glu
				165					170					175	
Ile	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg								
			180												

<210> 2

<211> 552

<212> DNA

<213> homo sapien

<400> 2

```

atgttgacaga tggctgggca gtgctcccaa aatgaatatt ttgacagttt gttgcatact      60
tgcatacctt gtcaacttcg atgttcttct aatactcctc ctctaacatg tcagggttatt    120
gtaatgcaag tgtgaccaat tcagtgaaag gaacgaatgc gattctctgg acctgtttgg    180
gactgagctt aataatttct ttggcagttt tctgtgctaat gtttttgcta aggaagacaa    240
gctctgaacc attaaaggac gagtttaaaa acacaggatc aggtctcctg ggcattggcta    300
acattgacct ggaaaagagc aggactggtg atgaaattat tctccgagag gcctcgagta    360
cacggtggaa gaatgcacct gtgaagactg catcaagagc aaaccgaagg tcgactctga    420
ccattgcttt ccaactccag ctatggagga aggcgcaacc attctgtcac cacgaaaacg    480
aatgactatt gcaagagcct gccagctgct ttgagtgcta cggagataga gaaatcaatt    540
tctgctaggt aa                                     552
  
```

<210> 3

<211> 207

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 3

Met	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Thr	Gly	Met	Leu	Gln	Met	Ala	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln	Asn	Glu	Tyr	Phe
			20					25					30		
Asp	Ser	Leu	Asp	Val	Thr	Met	Leu	Gln	Met	Ala	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln
		35					40					45			
Asn	Glu	Tyr	Phe	Asp	Ser	Leu	Leu	His	Ala	Cys	Ile	Pro	Cys	Gln	Leu
	50					55					60				
Arg	Cys	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Leu	His	Ala	Cys	Ile
	65				70					75					80
Pro	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Gln
				85					90					95	
Arg	Tyr	Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Ser	Val	Lys	Gly	Gln	Arg	Tyr
			100					105					110		
Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Ser	Val	Lys	Gly	Val	Asp	Lys	Thr	His
		115				120						125			
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
	130					135					140				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
	145				150					155					160
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
				165					170					175	
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys

SK 288287 B6

Thr Lys Pro 180 Arg Glu Glu Gln Tyr 185 Asn Ser Tyr Val Val 190 Ser Val
195 200 205

<210> 4
<211> 540
<212> DNA
<213> homo sapien

<400> 4
atggagacag acacactcct gttatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccactggg 60
gacgtcacga tgttgacagat ggctgggcag tgctcccaaa atgaatattt tgacactttg 120
ttgcatgctt gcataccttg tcaacttcga tgttcttcta atactcctcc tctaacatgt 180
cagcggtatt gtaatgcaag tgtgaccaat tcagtgaaa gagtcgacaa aactcacaca 240
tgcccaccgt gccacgacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca 300
aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgctt ggtgggtggac 360
gtgagccacg aagaccctga ggtaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 420
aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacaaca cgtaccgtgt agtcagcgtc 480
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaaatgcaa ggtctccaac 540

<210> 5
<211> 140
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 5
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
1 5 10 15
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
20 25 30
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
35 40 45
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
50 55 60
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
85 90 95
Gly Ser Phe Phe Lys Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
100 105
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
115 120 125
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
130 135 140

<210> 6
<211> 369
<212> DNA
<213> homo sapien

<400> 6
aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 60
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 120
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatgag 180
cagcgggaga acaactacaa gaccacgctt cccgtgttgg actccgacgg ctctctcttc 240
ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatac 300
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccc 360
gggaaatga 369

<210> 7
<211> 184
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 7

Met	Leu	Gln	Met	Ala	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln	Asn	Glu	Tyr	Phe	Asp	Ser
1				5					10					15	
Leu	Leu	His	Ala	Cys	Ile	Pro	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn	Thr
			20					25					30		
Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Gln	Arg	Tyr	Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Ser
		35					40					45			
Val	Lys	Gly	Thr	Asn	Ala	Ile	Leu	Trp	Thr	Cys	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu
	50					55					60				
Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Val	Phe	Val	Leu	Met	Phe	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile
65				70						75				80	
Ser	Ser	Glu	Pro	Leu	Lys	Asp	Glu	Phe	Lys	Asn	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu
				85					90					95	
Leu	Gly	Met	Ala	Asn	Ile	Asp	Leu	Glu	Lys	Ser	Arg	Thr	Gly	Asp	Glu
			100					105					110		
Ile	Ile	Leu	Pro	Arg	Gly	Leu	Glu	Tyr	Thr	Val	Glu	Glu	Cys	Thr	Cys
		115					120					125			
Glu	Asp	Cys	Ile	Lys	Ser	Lys	Pro	Lys	Val	Asp	Ser	Asp	His	Cys	Phe
	130					135					140				
Pro	Leu	Pro	Ala	Met	Glu	Glu	Gly	Ala	Thr	Ile	Leu	Val	Thr	Thr	Lys
145					150					155					160
Thr	Asn	Asp	Tyr	Cys	Lys	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Thr	Glu
				165					170					175	
Ile	Glu	Lys	Ser	Ile	Ser	Ala	Arg								
			180												

<210> 8

<211> 995

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<400> 8

```

aagactcaaa cttagaaaact tgaattagat gtggtattca aatccttacg tgccgcgaag 60
acacagacag cccccgtaag aacccacgaa gcaggcgaag ttcattgttc tcaacattct 120
agetgctctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttccaggc 180
tgttctttct gtagctccct tgttttcttt ttgtgatcat gttgcagatg gctgggcagt 240
gctcccaaaa tgaatatttt gacagtttgt tgcattgctt cataccttgc caacttcgat 300
gttcttctaa tactcctcct ctaacatgtc agcgttattg taatgcaagt gtgaccaatt 360
cagtgaaggg aacgaatgcg attctctgga cctggttggg actgagctta ataatttctt 420
tggcagtttt cgtgctaatag tttttgctaa ggaagataag ctctgaacca ttaaaggacg 480
agtttaaaaa cacaggatca ggtctcctgg gcatggctaa cattgacctg gaaaagagca 540
ggactggtga tgaatattt cttccgagag gcctcgagta cacgggtggaa gaatgcacct 600
gtgaagactg catcaagagc aaaccgaagg tcgactctga ccattgcttt ccactcccag 660
ctatggagga aggcgaacc attcttgtea ccacgaaaac gaatgactat tgcaagagcc 720
tgccagctgc tttgagtgc acggagatag agaaatcaat ttctgctagg taattaacca 780
tttcgactcg agcagtgcca ctttaaaaat cttttgtcag aatagatgat gtgtcagatc 840
tcttttaggat gactgtattt ttcagttgcc gatacagctt tttgtcctct aactgtggaa 900
actctttatg ttgatataat ttctctaggt tactgttggg agcttaatgg tagaaacttc 960
cttggtttca tgattaaagt cttttttttt cctga 995

```

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. a) Protilátka proti SEQ ID No:1; alebo
 - b) polypeptíd obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu pozostávajúcu z aminokyseliny 8 až aminokyseliny 41 zo SEQ ID NO:1 na použitie ako liečivo.
2. Použitie
 - a) protilátky proti SEQ ID No:1; alebo
 - 10 b) polypeptidu obsahujúceho aminokyselinovú sekvenciu pozostávajúcu z aminokyseliny 8 až aminokyseliny 41 zo SEQ ID NO:1 na prípravu farmaceutickej kompozície na liečenie autoimunitného ochorenia, lymfoproliferatívnych ochorení B-buniek alebo zápalu u cicavca.
3. Použitie podľa nároku 1 alebo 2, kde polypeptid ďalej obsahuje Fc doménu imunoglobulínu.

4. Použitie podľa nároku 3, kde imunoglobulín je IgG.
5. Použitie podľa nároku 4, kde imunoglobulín je ľudský.
6. Použitie podľa niektorého z nárokov 2 až 5, kde liečivo inhibuje rast B-buniek u cicavca.
7. Použitie podľa niektorého z nárokov 2 až 5, kde liečivo inhibuje tvorbu imunoglobulínu u cicavca.
- 5 8. Použitie podľa niektorého z nárokov 2 až 5, kde liečivo inhibuje rast B-buniek indukovaných dendritickými bunkami u cicavca.
9. Použitie podľa niektorého z nárokov 2 až 8, kde cicavcom je človek.

19 výkresov

1/19

Obr. 1

Sekvence

SEQ ID NO: 2 1 ATG TTG CAG ATG GCT GGG CAG TGC TOC CAA AAT GAA TAT TTT GAC AGT TTG TTG CAT GCT
 SEQ ID NO: 1 11 M L Q M A G Q C S Q N E Y F D S L L H A
 61 TGC ATA CCT TGT CAA CTT CGA TGT TCT TCT TCT AAT ACT CCT CTA ACA TGT CAG CGT TAT
 211 C I P C Q L R C S S N T P L T C Q R Y
 121 TGT AAT GCA AGT GTG ACC AAT TCA GTG AAA GGA ACG AAT GCG AAT CTC TGG ACC TGT TTG
 411 C N A S V T N S V K G T N A I L W T C L
 181 GGA CTG AGC TTA ATA AAT TCT TTG GCA GTT TTC GTG CTA ATG TTT TTG CTA AGG AAG ATA
 611 G L S L I I S L A V F V L M F L L R K I
 241 AGC TCT GAA CCA TTA AAG GAC GAG TTT AAA AAC ACA CGA TCA GGT CTC CTG GGC ATG GCT
 811 S S E P L K D E F K N T G S G L L G M A
 301 AAC AAT GAC CTG GAA AAG AGC AGG ACT GGT GAT GAA AAT AAT CTT CCG AGA GGC CTC GAG
 1011 N I D L E K S R T G D E I L P R G L E
 361 TAC ACG GTG GAA GAA TGC ACC TGT GAA GAC TGC ATC AAG AGC AAA CCG AAG GTC GAC TCT
 1211 Y T V E E C T C E D C I K S K P K V D S
 421 GAC CAT TGC TTT CCA CTC CCA GCT ATG GAG GAA GGC CCA ACC AAT CTT GTC ACC ACG AAA
 1411 D H C F P L P A M E E G A T I L V T T K
 481 ACG AAT GAC TAT TGC AAG AGC CTG CCA GCT GCT TTG AGT GCT ACG GAG ATA GAG AAA TCA
 1611 T N D Y C K S L P A A L S A T E I E K S
 541 AAT TCT GCT AGG TAA
 1811 I S A R *

Obr.	2A
Obr.	2B

2/19

Obr. 2A

1 ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG TTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTF CCA GGT TCC ACT GGT
 11 Sekvenca
 11 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
 61 GAC GTC ACG ATG TTG CAG ATG GCT GGG CAG TGC TTC CAA AAT GAA TAT TTT GAC AGT TTG
 11 M L Q M A G Q C S Q N E Y F D S L
 21 D V T M L Q M A G Q C S Q N E Y F D S L
 121 TTG CAT GCT TGC ATG CCT TGT CAA CTT CGA TGT TCT TCT AAT ACT OCT OCT CTA ACA TGT
 18 L H A C I P C Q L R C S S N T P P L T C
 41 L H A C I P C Q L R C S S N T P P L T C
 181 CAG CGT TAT TGT AAT CCA AGT GTG ACC AAT TCA GTG AAA GGA GTC GAC AAA ACT CAC ACA
 38 Q R Y C N A S V T N S V K G
 61 Q R Y C N A S V T N S V K G V D K T H T
 241 TGC CCA CCG TGC CCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA
 81 C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P
 301 AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TTC CCG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GAC
 101 K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D
 361 GTG AGC CAC GAA GAC OCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT
 121 V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H
 421 AAT GCC AAG ACA AAG CCG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC
 141 N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V
 481 CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TCC AAG GTC TTC AAC

3/19

Ohr. 2B

161† L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N
 541 AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TTC AAA GOC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
 181† K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E
 601 CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TTC CCG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTG AGC CTG
 201† P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L
 661 AOC TGC CIG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GOC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG
 221† T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
 721 CAG CCG GAG AAC ATC TAC AAG ACC AGC CCT CCC GTG TTG GAC TTC GAC GGC TTC TTC TTC
 241† Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F
 781 CTC TAC AGC AAG CAC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TCG CAG CAG GGG AAC GTG TTC TCA TGC
 261† L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C
 841 TTC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCC
 281† S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
 901 GGG AAA TGA
 301† G K •

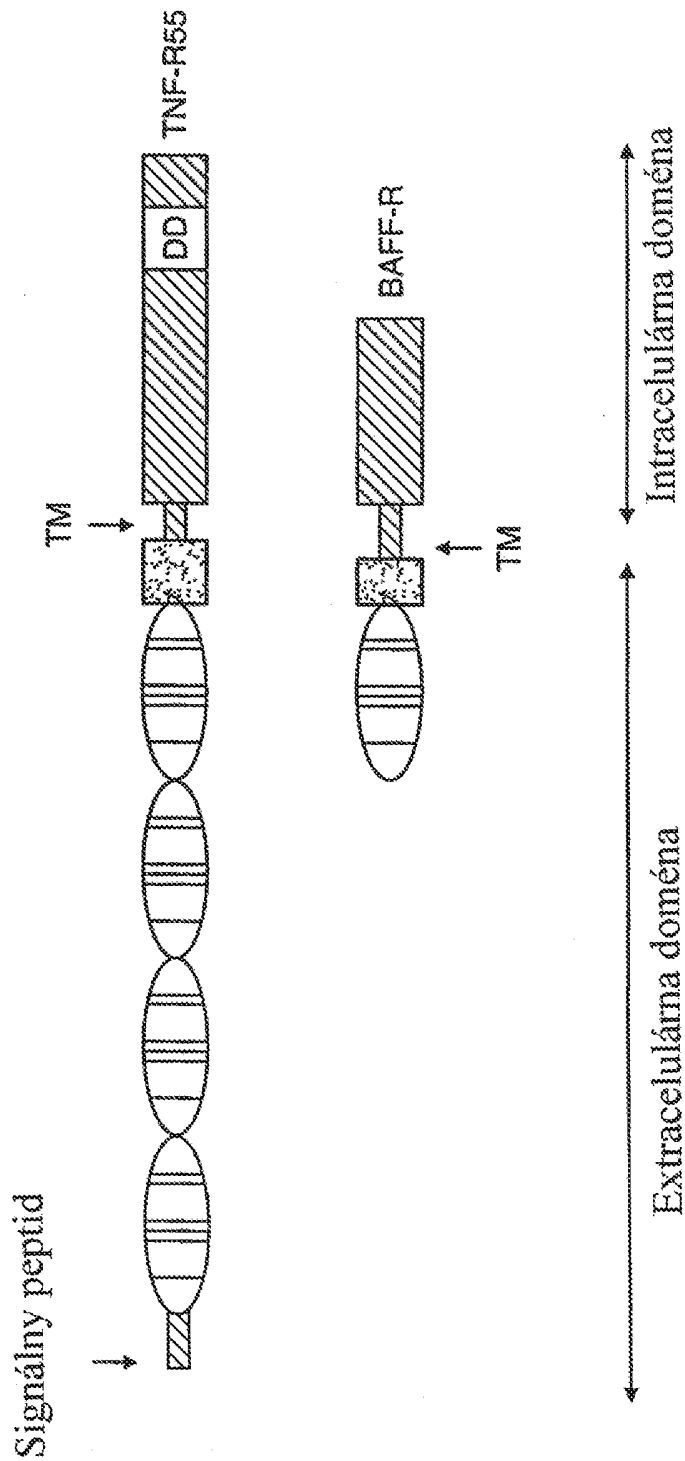
4/19

Obr. 3

				BsaAI	BbsI	
1	AAGACTCAAA	CTTAGAAACT	TGAATTAGAT	GTGGTATTCA	AATCCTTACG	TGCCGCGAAG
61	ACACAGACAG	CCCCCGTAAG	AACCCACGAA	GCAGGCGAAG	TTCATTGTTC	TCAACATTCT
			EcoFI			
121	AGCTGCTCCT	GCTGCATTTG	CTCTGGAATF	CTTGTAGAGA	TATTAATTGT	CCTTCCAGGC
	SfoI			BclI		
181	TGTTCTTTCT	GTAGCTCCCT	TGTTTTCTTT	TTGTGATCAT	GTTGCAGATG	GCTGGGCAGT
				I M L Q M A G Q		
	SspI		SphI		HincII	
241	GCTCCCAAAA	TGAATATTTT	GACAGTTTGT	TGCATGCTTG	CATACCTTGT	CAACTTCGAT
8	C S Q N	E Y F	D S L	L H A C	I P C	Q L R
			Pci I			
			A(III)			
301	GTTCTTCTAA	TACTCTCTCT	CTAACATGTC	AGCGTTATTG	TAATGCAAGT	GTGACCAATF
28	C S S N	T P P	L T C	Q R Y C	N A S	V T N
				BsmFI		
361	CAGTGAAAGG	AACGAATGCG	ATTCTCTGGA	CCTGTTTGGG	ACTGAGCTTA	ATAATTTCTT
48	S V K G	T N A	I L W	T C L G	L S L	I I S
421	TGGCAGTTTT	CGTGCTAATG	TTTTTGTCTAA	GGAAGATAAG	CTCTGAACCA	TTAAAGGACG
68	L A V F	V L M	F L L	R K I S	S E P	L K D
	DraI	Aiwi	BsaI			
481	AGTTTAAAAA	CACAGGATCA	GGTCTCCIGG	GCATGGCTAA	CAITGACCTG	GAAAAGAGCA
88	E F K N	T G S	G L L	G M A N	I D L	E K S
	XmnI		StuI	XhoI		
541	GGAAGGTTGA	TGAAATTAAT	CTTCCGAGAG	GOCTCGAGTA	CAOGGTGGAA	GAATGCAOCT
108	R T G D	E I I	L P R	G L E Y	T V E	E C T
				Sall		
				HincII		
	BbsI			AccI		
601	GTGAAGACTG	CATCAAGAGC	AAACCGAAGG	TGACTCTGA	CCATTGCTTT	CCACTCCCAG
128	C E D C	I K S	K P K	V D S D	H C F	P L P
661	CTATGGAGGA	AGGCGCAACC	ATTCTTGTCA	CCACGAAAAC	GAATGACTAT	TGCAAGAGCC
148	A M E E	G A T	I L V	T T K T	N D Y	C K S
	PvuII					
721	TGCCAGCTGC	TTTGAGTGCT	ACCGAGATAG	AGAAATCAAT	TTCTGCTAGG	TAATTAACCA
168	L P A A	L S A	T E I	E K S I	S A R	
	XhoI		DraI		EgII	
781	TTTCGACTCG	AGCAGTGCCA	CTTTAAAAAT	CTTTTGTTCAG	AATAGATGAT	GTGTCAGATC
841	TCTTTAGGAT	GACTGTATTT	TTCACTTGCC	GATACAGCTT	TTTGTCTCTT	AACTGTGGAA
						StyI
901	ACTCTTTATG	TTAGATATAT	TTCTCTAGGT	TACTGTGGG	AGCTTAATGG	TAGAAACTTC
961	CTTGGTTTCA	TGATTAAGT	CTTTTTTTTT	CCTGA		

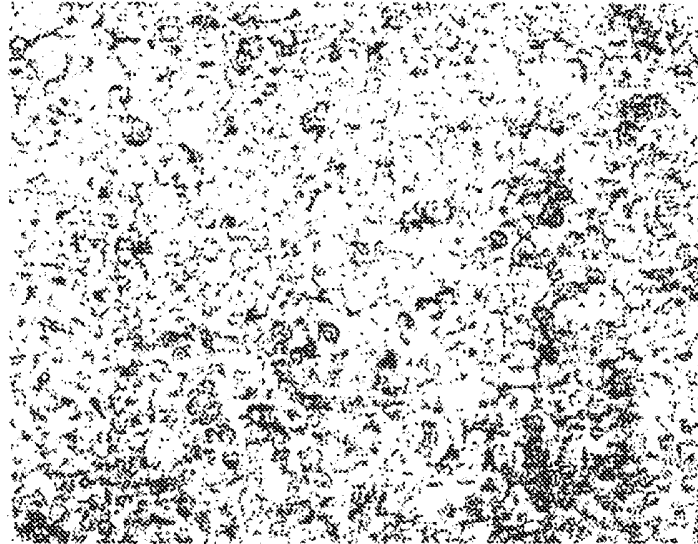
5/19

Obr. 4

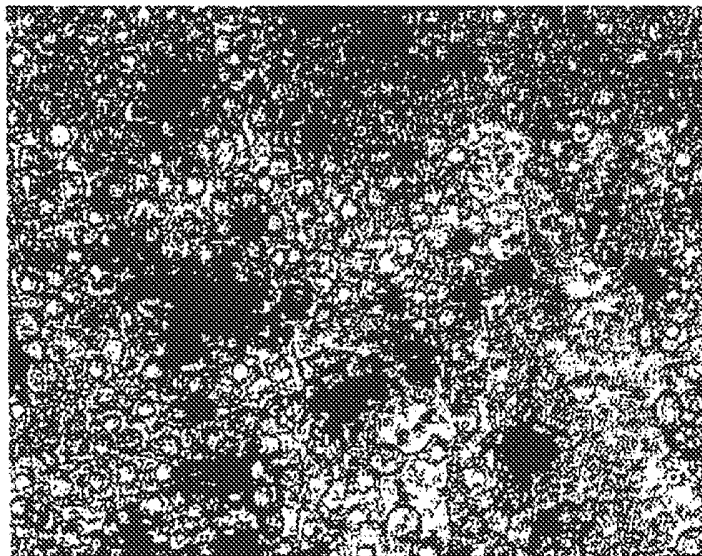


6/19

Obr. 5A

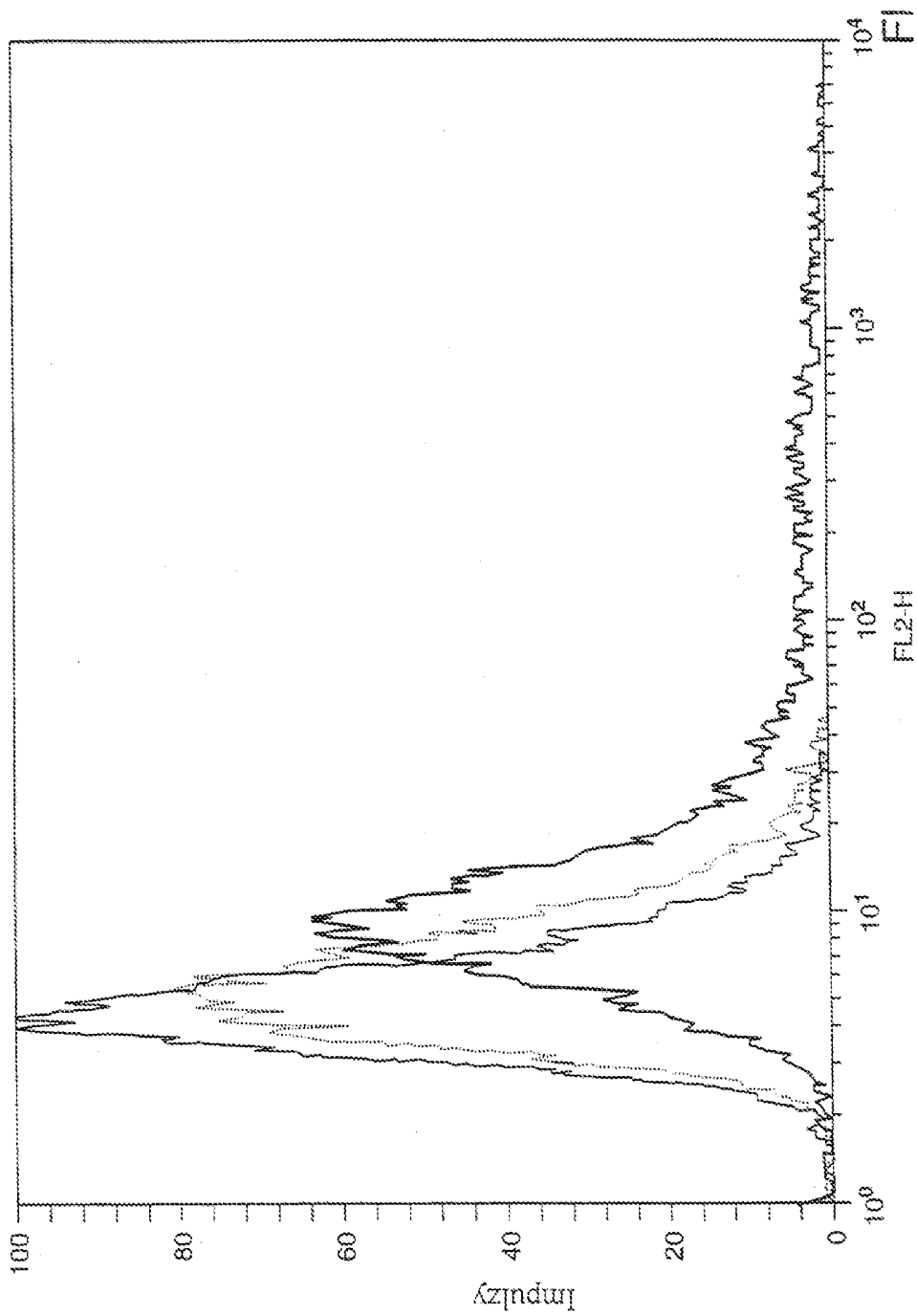


Obr. 5B

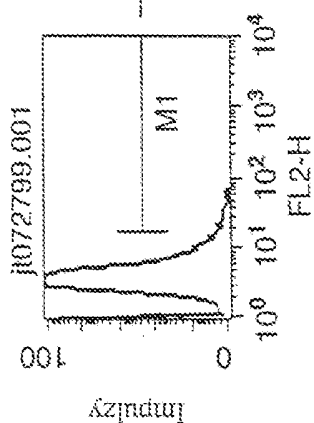


7/19

Ohr. 6A

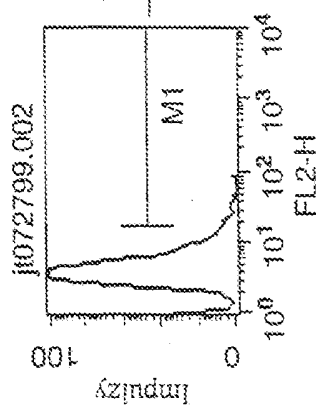


8/19



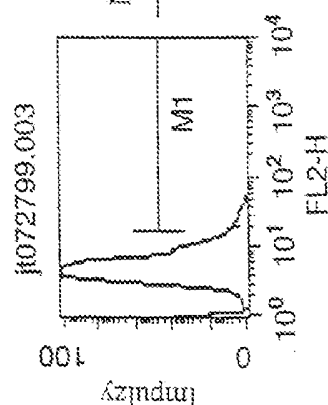
Marker	Ľavá	Pravá	Počet	%prepustené	%celkové	Priemer	Geometr. priemer	CV	Medián
All	1.	9910	10000	100.00	100.00	4.26	3.80	61.34	3.65
M1	17.	9910	65	0.65	0.65	23.23	22.44	30.37	20.35

Obr. 6B-1



Marker	Ľavá	Pravá	Počet	%prepustené	%celkové	Priemer	Geometr. priemer	CV	Medián
All	1.	9910	10000	100.00	100.00	4.61	4.11	61.98	3.89
M1	17.	9910	79	0.79	0.79	22.88	21.98	34.94	19.63

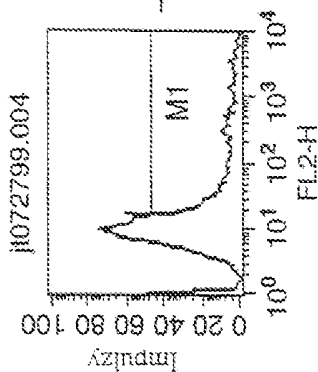
Obr. 6B-2



Marker	Ľavá	Pravá	Počet	%prepustené	%celkové	Priemer	Geometr. priemer	CV	Medián
All	1.	9910	10000	100.00	100.00	5.51	4.93	58.41	4.66
M1	17.	9910	130	1.30	1.30	23.55	22.98	23.39	22.57

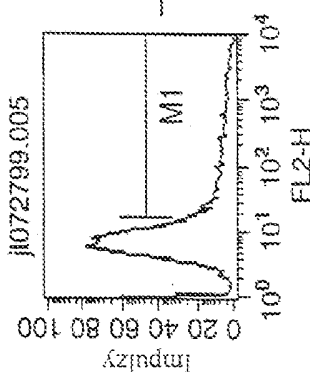
Obr. 6B-3

9/19



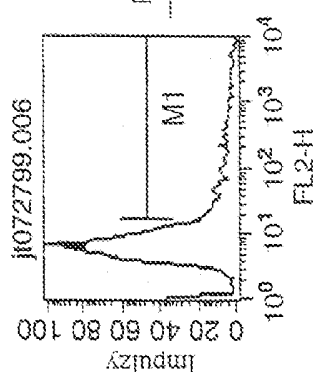
Marker	Ľavá	Pravá	Počet	%prepustené	%celkové	Priemer	Geometr. priemer	CV	Medián
All	1.	9910	10000	100.00	100.00	108.24	15.40	459.27	10.27
M1	17.	9910	2785	27.85	27.85	366.10	85.21	243.61	45.32

Obr. 6B-4



Marker	Ľavá	Pravá	Počet	%prepustené	%celkové	Priemer	Geometr. priemer	CV	Medián
All	1.	9910	10000	100.00	100.00	72.53	11.42	516.47	7.84
M1	17.	9910	2054	20.54	20.54	324.52	88.86	239.37	61.80

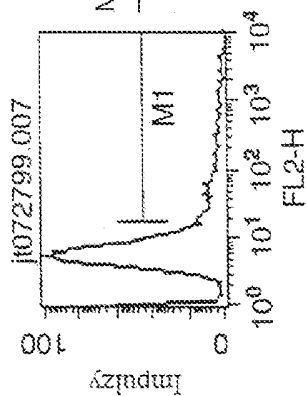
Obr. 6B-5



Marker	Ľavá	Pravá	Počet	%prepustené	%celkové	Priemer	Geometr. priemer	CV	Medián
All	1.	9910	10000	100.00	100.00	51.15	9.41	566.98	6.67
M1	17.	9910	1673	16.73	16.73	272.40	81.97	244.63	54.25

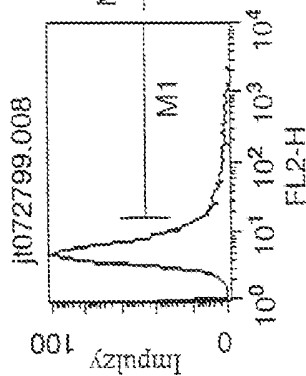
Obr. 6B-6

10/19



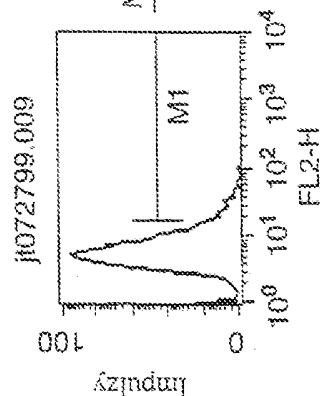
Marker	Ľavá	Pravá	Počet	%prepustené	%celkové	Priemer	Geometr. priemer	CV	Medián
All	1.	9910	10000	100.00	100.00	26.59	7.74	576.94	5.94
M1	17.	9910	1313	13.13	13.13	161.35	60.77	246.67	42.94

Obr. 6B-7



Marker	Ľavá	Pravá	Počet	%prepustené	%celkové	Priemer	Geometr. priemer	CV	Medián
All	1.	9910	10000	100.00	100.00	12.39	6.54	405.32	5.47
M1	17.	9910	876	8.76	8.76	78.94	43.41	195.84	33.68

Obr. 6B-8

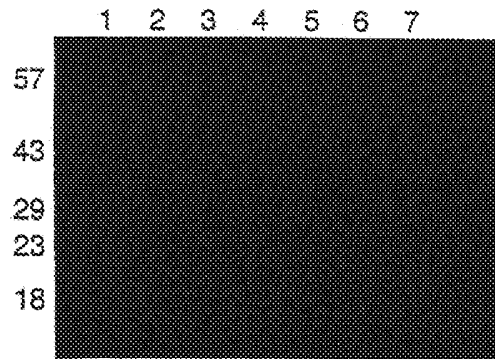


Marker	Ľavá	Pravá	Počet	%prepustené	%celkové	Priemer	Geometr. priemer	CV	Medián
All	1.	9910	10000	100.00	100.00	6.99	6.60	69.06	5.67
M1	17.	9910	393	3.93	3.93	24.33	23.31	33.76	21.48

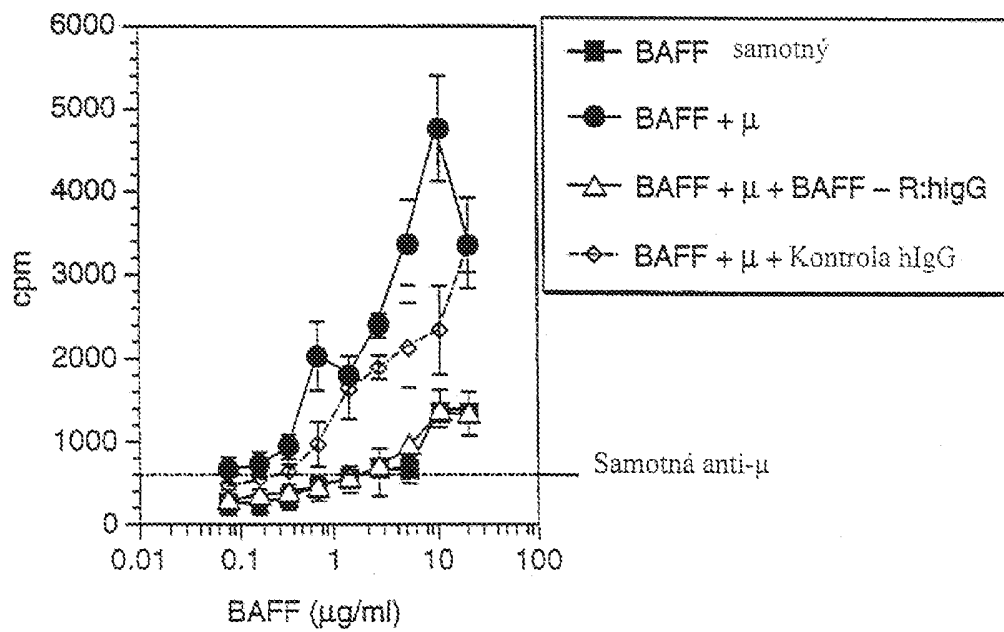
Obr. 6B-9

11/19

Obr. 7

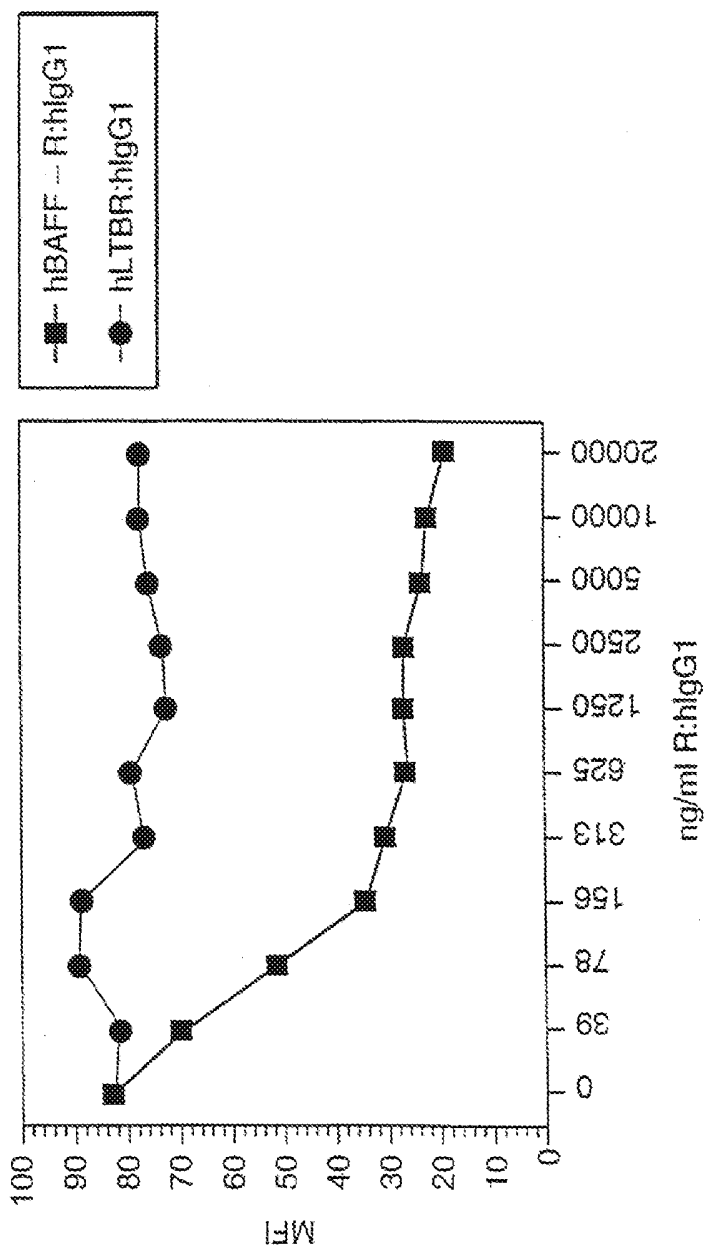


Obr. 8

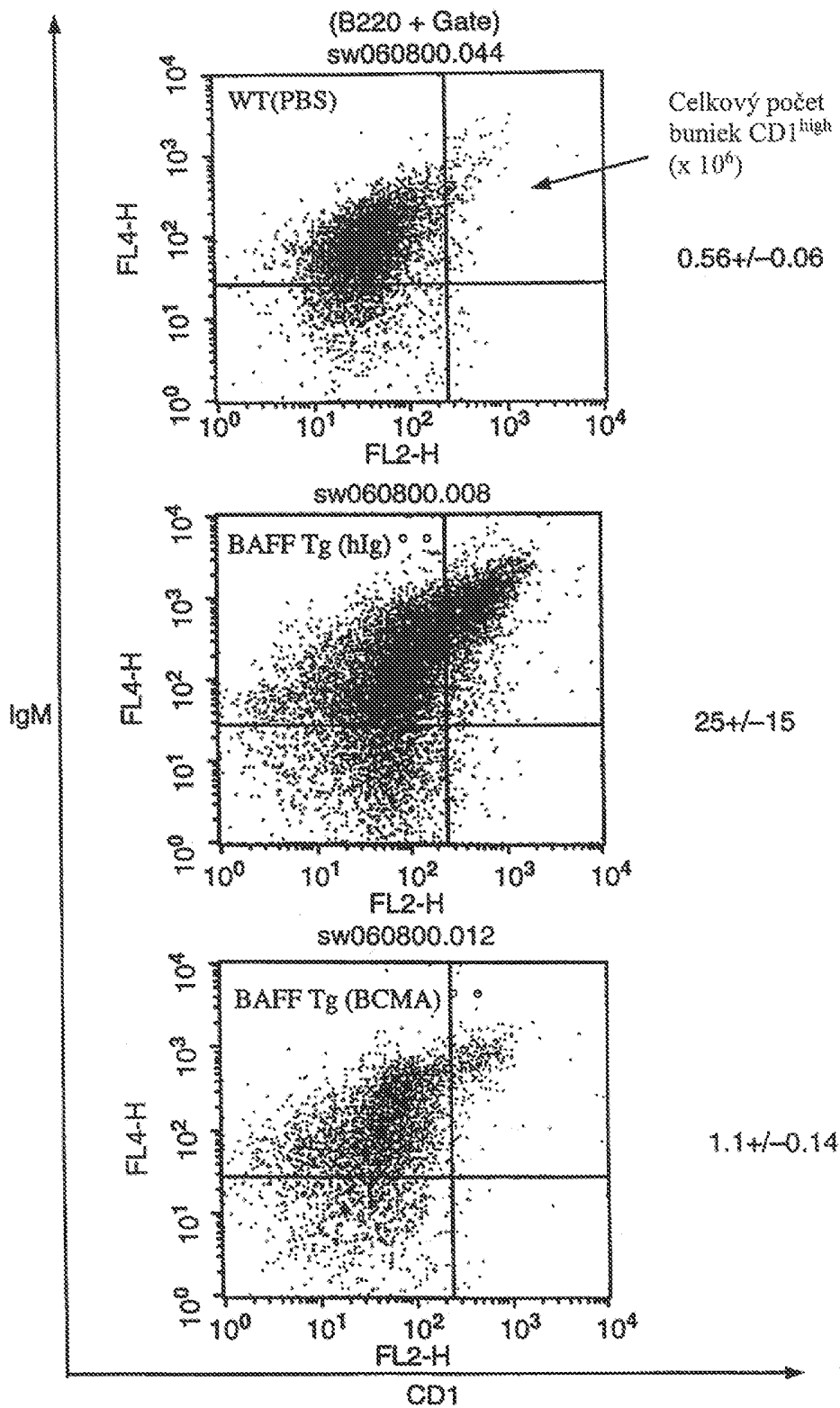


12/19

Obr. 9

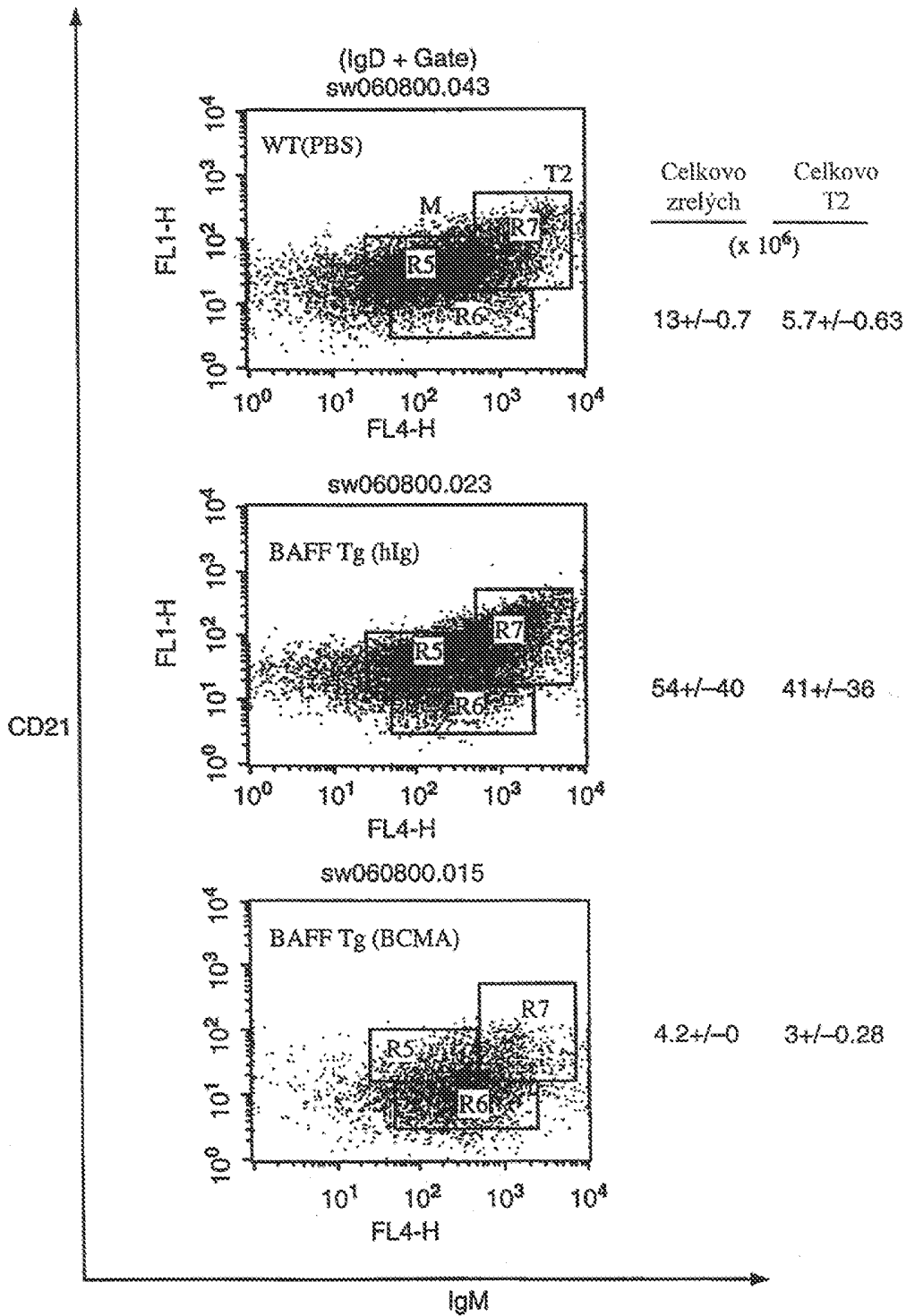


Obr. 10A

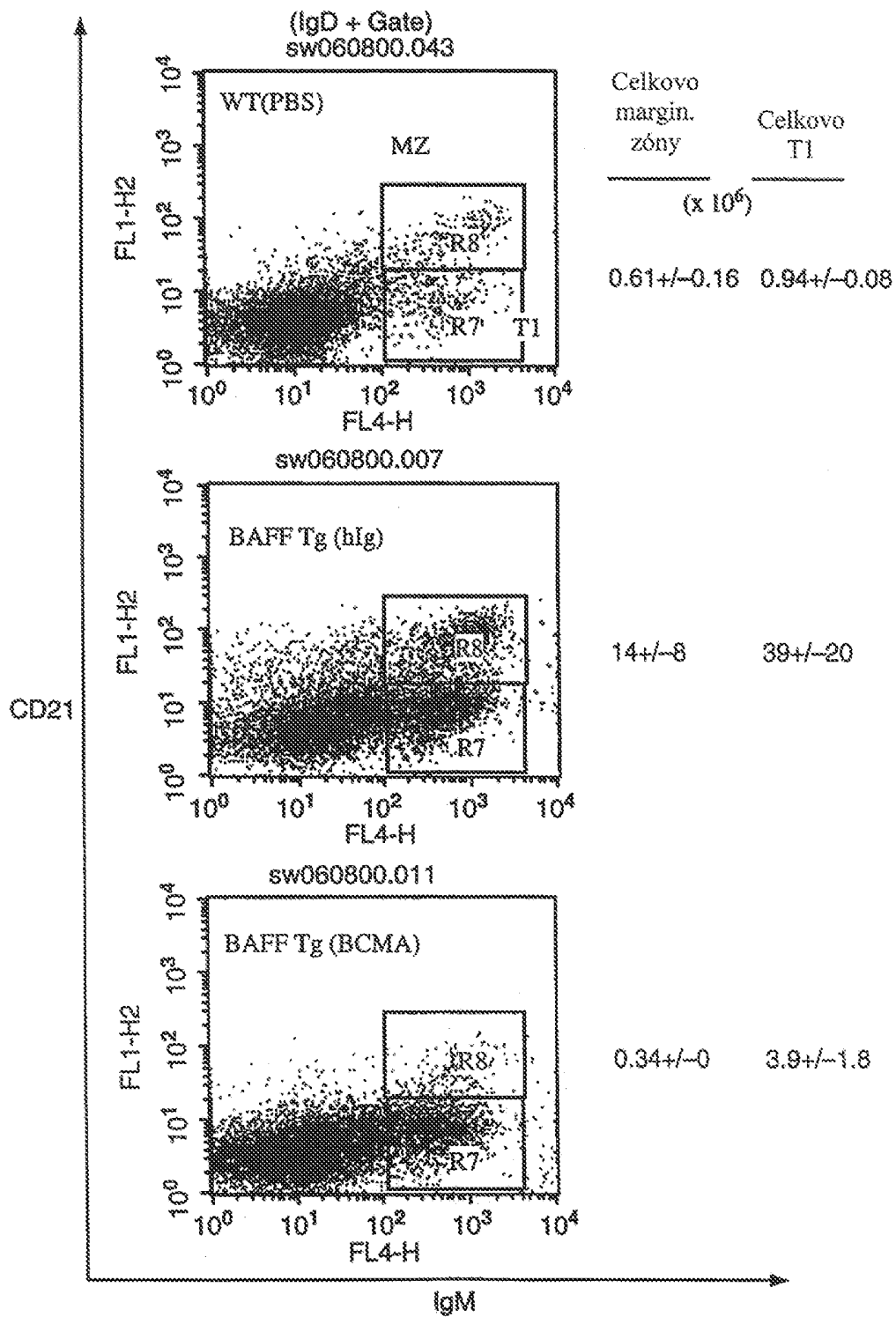


14/19

Obr. 10B

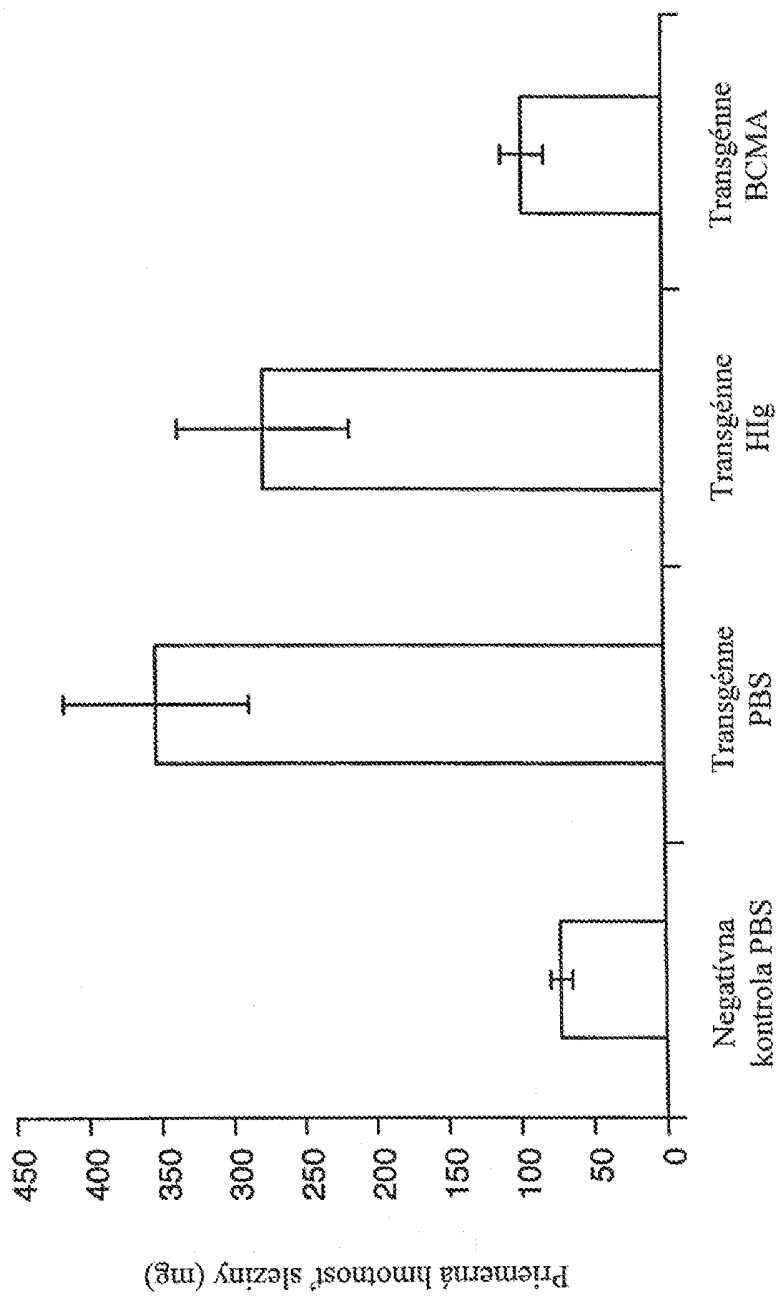


Obr. 10C



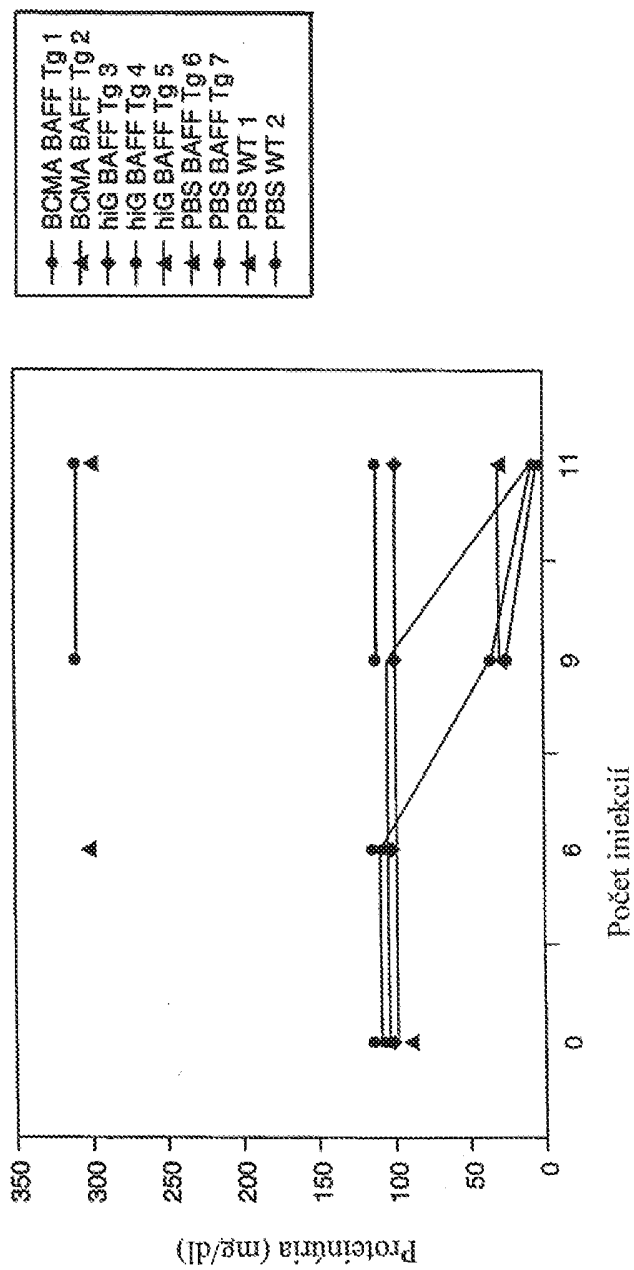
16/19

Obr. 11



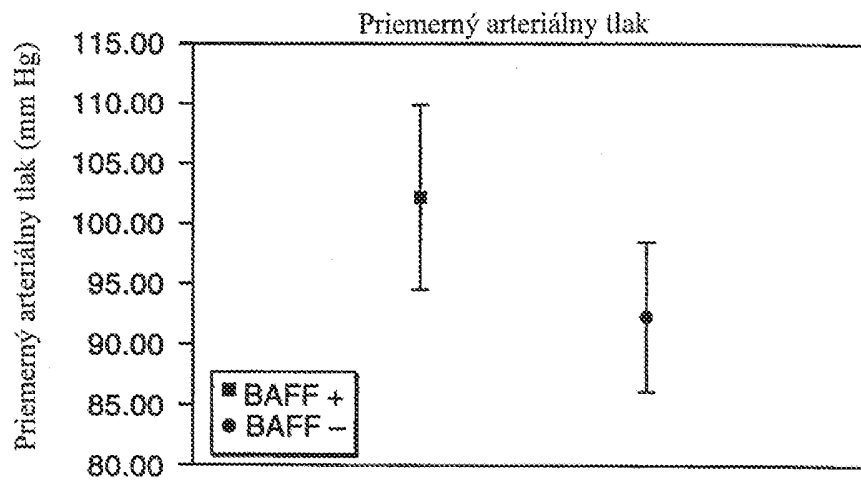
17/19

Obr. 12

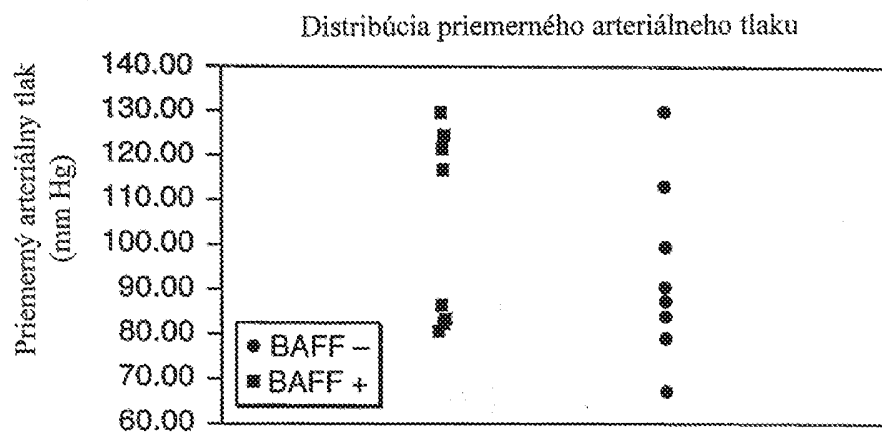


18/19

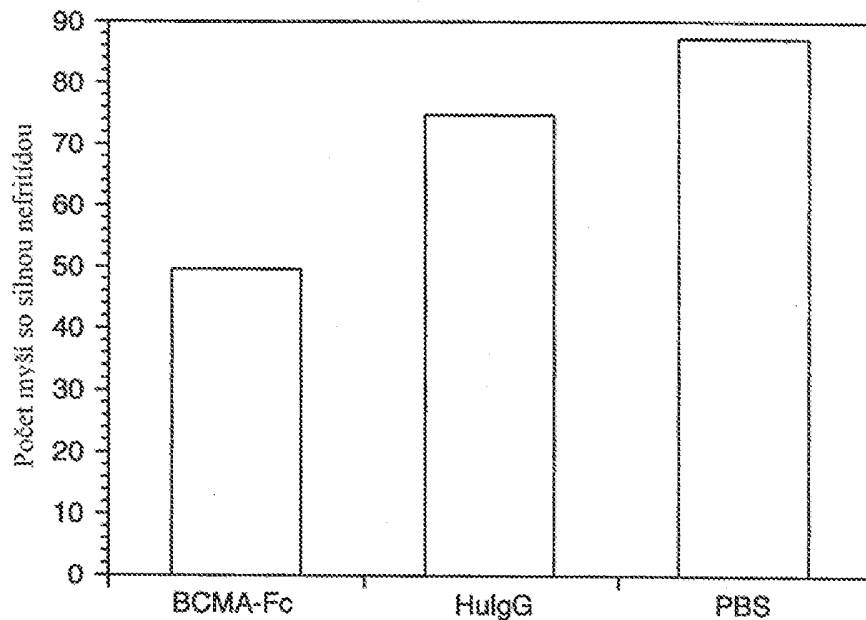
Obr. 13



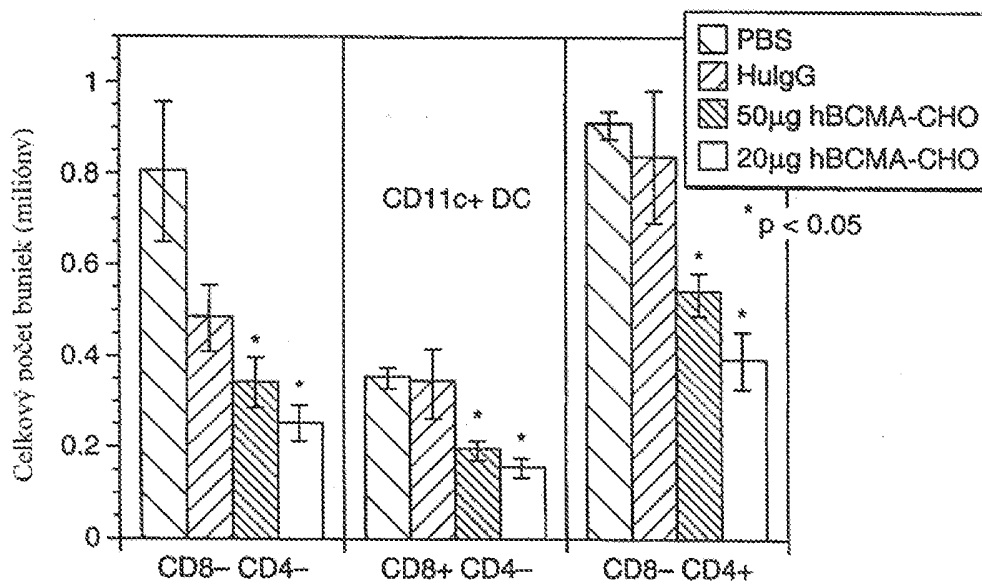
Obr. 14



Obr. 15



Obr. 16



Koniec dokumentu