

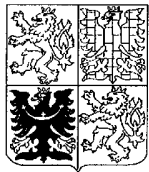
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4161

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.05.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.05.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/19821285**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.04.2001**
(Věstník č. 4/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/03272**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/58571**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 16/00

(71) Přihlašovatel:

BIOTECON GESELLSCHAFT FÜR
BIOTECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG UND
CONSULTING MBH, Berlin, DE;

(72) Původce:

Bigalke Hans, Hannover, DE;
Frevort Jürgen, Berlin, DE;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Hybridní protein pro zabránění granulace
žirných buněk a jeho použití**

(57) Anotace:

Popisuje se hybridní protein, zahrnující nebo sestávající z (i) o sobě známého proteinu, který se váže o sobě známým způsobem na žirné buňky a/nebo basofily a/nebo je jimi zachycen a (ii) o sobě známé proteázy, která štěpí jeden nebo několik proteinů sekrečního aparátu žirných buněk a/nebo basofilů.

Hybridní protein pro zabránění granulace žírných buněk a jeho použití

Oblast techniky

Vynález se týká hybridního proteinu pro zabránění granulace žírných buněk a jeho použití.

Dosavadní stav techniky

Alergické reakce okamžitého typu jsou charakteristické tím, že dotyční pacienti vytvořili antitělíska typu IgR vůči alergenům /například pylům, roztočům v domácím prachu, zvířecím chlupům/. Tato antitělíska necirkulují pouze v krvi, ale jsou vázána také na buňky tkání, které mají specifický receptor pro část IgE-molekuly, Fc-fragment, v membráně plasmy /Fishman a. Lorberboum-Galski, 1997; Hamawy, M.M. 1997/. Buňky s IgE-receptory jsou výlučně žírné buňky a basofily. Tyto buňky jsou buňky efektoru pro alergické reakce okamžitého typu. Tyto buňky obsahují vesikula, která obsahují vasoaktivní aminy, stejně tak jako prostaglandiny a leukotriny/ deriváty kyseliny arachové/. Uvolňování těchto látek, které vede k degranulaci žírných buněk, se děje specifickým a nespecifickým mechanismem. Jestliže se buňky mechanicky rozruší, například škrábnutím na kůži, uvolní se nespecificky histamin. Kůže rány zčervená. Tvoří se otoky /edemy/ a kůže svědí /triple response/. Látky, které uvolňují specificky histamin jsou účinné v relativně malých koncentracích a vyvolávají následující řetězec symptomů: aktivaci fosfolipázy C, - tvorbu second messenger diacylglycerolu a 'IP3', mobilizaci vápníku z buněčných zásob, splynutí granulí s membránou buňky- exocytózu granulí bez cytolýzy- výměnu sodíku za pozitivně nabitý histamin z komplexu s heparinem

a zásaditým proteinem - uvolňování histaminu z matrice granule. Jestliže dojde ke styku mezi žírnými buňkami alergika a alergenem, tak se IgE-molekuly navážou na povrch buňky tohoto alergenu. Jestliže se naváže dostatečný počet molekul alergenu dojde k agregaci receptorů v membráně plasmy. Agregace je specifickým popudem pro vyvolání výše popsané kaskády signálů uvnitř buňky. Uvolněné látky vyvolají alergické příznaky /zánět spojivek, rýmu, astma, otok hrdla, žopřivku, snížení tlaku krve až do výrazného anafylaktického šoku/. Peptidy, které jsou obsaženy ve včelím jedu, jako například mast cell degranulating peptide /MOD/, vyvolávají rovněž degranulaci žírných buněk. I některá léčiva způsobují specifické uvolnění histaminu jako nežádoucí účinek. U lidí je uvolňování histaminu popsáno pro prostředky pro uvolňování svalů, dextrany, kyselinu acetylosalicylovou /Aspirin/, morfin, antibiotika, kontrastní prostředky pro rtg, cizí séra atd.

Jestliže se zabrání splnutí vesikul s membránou plasmy, tak nedojde k uvolnění aminů a kyseliny arachové. Následně se nespustí žádná alergická reakce. Procesu sekrece popřípadě uvolňování se účastní řada proteinů / fúzní proteiny/, které mohou být vázány na membrány sekrečních vesikul a/nebo na membránu plasmy. Mohou se také nacházet v cytosolu. K těmto proteinem patří SNAP 25, synaptobrevin /VAMP/ a syntaxin popřípadě jejich isoformy. Tyto proteiny tvoří komplex /fúzní komplex/, který fixuje sekreční vesikul na vnitřní straně membrány plasmy. Fixace předchází splnutí vesikula s membránou plasmy, která byla vyvolána vtokem Ca^{++} zprostředkovaným IgE. Inaktivací jednoho z proteinů, patrně proteolytickým štěpením, se zabrání tomu, aby se vytvořil komplex.

U nervových buněk jsou jak je známo uvedené fúzní pro-

teiny cílové molekuly /substráty/ lehkých řetězců neurotoxinů, které jsou vyráběny bacilem *Clostridium botulinum* /Ahnert-Hilger a. Bigalke, 1995 und Bigalke, 1999 in press/. V této době je také známo sedm typů toxinů botulinu /A,B,C1, D, E, F a G/. Zmíněný synaptobrevin je kromě toho i cílovou molekulou pro TeNT /Link et al.,1993/, který je produkován *Clostridium tetani*, stejně tak jako pro proteázu z *Meisseria gonorrhoeae* /Binscheck et al., 1995/. Toxiny, kromě těch, které byly jmenovány jako poslední, sestávají nejméně ze dvou funkčních domén. C-terminální část proteinu /těžký řetězec/ je zodpovědná za svou vazbu na nervovou buňku, zatím co N-terminální část /lehký řetězec/ se vyznačuje výše popsanou vysoce specifickou proteolytickou aktivitou. Toxiny se vážou přes svůj těžký řetězec na nerovové buňky a následující translokací do cytosolu, kde se štěpí jeden nebo více uvedených fúzních proteinů, které jsou konstituční pro fúzní komplex. Po štěpení stávajícího proteinu se zabrání sekreci acetylcholinu popřípadě jiných přenašečů z nervových buněk /Binscheck und Wellhoner, 1997/.

Zábrana vytřepání přenašeče se již terapeuticky využívá pro léčení dystonických poruch hybnosti stejně tak jako pro potlačení nadměrných parasymptomatických aktivit /Benecke und Kessler, 1995/. Pro Clostridien-neurotoxiny nejsou známy žádné jiné biologické substráty kromě fúzních proteinů. Těžké řetězce mají vysokou afinitu k periferním nervovým buňkám, takže se s nimi svázané lehké řetězce se dostanou pouze do těchto buněk a v nich jsou účinné- ačkoliv jiné typy buněk, ve kterých probíhají sekreční procesy, mají výše uvedené substráty, ale žádný mechanismus pro přijetí proteázy /Marxen et al.,1989/. například žírné buňky a basofily.

Podstata vynálezu

Jedna forma provedení vynálezu se týká hybridního proteinu zahrnujícího nebo sestávajícího z

/i/ jednoho o sobě známého proteinu, který se váže o sobě známým způsobem na žírné buňky a/nebo basofily a/nebo je jimi zachycován,

/ii/ o sobě známé proteázy, která štěpí jeden nebo několik proteinu sekrečního aparátu žírných buněk a/nebo basofily-

Další forma vynálezu se týká hybridního proteinu zahrnujícího nebo sestávajícího z

/i/ proteinu, který se váže na žírné buňky a/nebo basofily a/nebo je jimi zachycován, přičemž protein /i/ je vybrán z následující skupiny:

IgE:

fragment IgG, zejména fragment IgE-Fc;

antitělíska vůči IgE-receptoru žírných buněk a/nebo basofil;

Fragment antitělíska proti IgE-receptoru žírných buněk a/nebo basofil, zejména Fab-fragment;

Antitělíska proti kanálu draslíku specifickém pro žírné buňky; a inaktivní, ale navazující se MCD-peptid, a

/ii/ proteázy, zejména o sobě známé proteázy, která štěpí jeden nebo několik proteinů sekrečního aparátu žírných buněk a/nebo basofil:

Další forma provedení vynálezu se týká hybridního proteinu, zahrnujícího nebo sestávajícího z:

/i/ proteinu, zejména o sobě známého proteinu, který se váže na žírné buňky a/nebo basofily a/nebo je jimi zachycován, zejména o sobě známým způsobem, a

/ii/ proteázy, která štěpí jeden nebo několik proteinů sekrečního aparátu žirných buněk a/nebo basofil, přičemž proteáza /ii/ je vybrána z následující skupiny:

lehký řetězec toxinu *Clostridium botulinum*, zejména typu A, B, Cl, D, E, F nebo G;

katalytický aktivní fragment lehkého řetězce toxinu *Clostridium botulinum*, zejména typu A, B, C, D, E, F nebo G;

lehký řetězec toxinu tetanu /TeNT/;

katalyticky aktivní fragment lehkého řetězce toxinu tetanu;

IgA-proteáza *Neisseria gonorrhoeae*; a

katalytické domeny IgA-proteázy *Neisseria gonorrhoeae*.

Hybridní protein podle vynálezu může být charakterizován tím, že protein /i/ je vybrán z výše uvedené skupiny proteinu a proteáza /ii/ je vybrána rovněž z výše uvedené skupiny proteáz.

Hybridní protein podle vynálezu může být dále charakterizován tím, že dodatečně k lehkému řetězci toxinu *Clostridium botulinum* nebo toxinu tetanu je i N-terminální část těžkého řetězce dotyčného toxinu /H_N-fragment/ nebo jeho fragment částí hybridního proteinu.

Konečně se forma provedení vynálezu týká použití hybridního proteinu podle vynálezu pro zabránění granulace žirných buněk.

Jestliže by se usmrtily všechny žirné buňky, vystavlo by nebezpečí, že dojde k alergickému šoku, když by odumřelé žirné buňky uvolnily nahromaděné endogenní aminy. Dále simuluje úbytek počtu žirných buněk novou syntézu těchto buněk, které jsou potom opět k dispozici pro alergické reakce. Hybridní protein podle vynálezu se tím liší

základně od známého konjugátu IgE-Fc/pseudomonas-exotoxinu, který inhibuje svou ADP-ribosylilovou aktivitou syntézu proteinu a tím vyvolává smrt buněk /Fishman a. Lorberboum-Galski, 1997/. Naproti tomu měslouží hybridní protein podle vynálezu pro usmrcení žirných buněk. Buňky zůstávají spíše po působení vitální a ztrácí pouze schopnost uvolňovat vasokonstriktivní aminy. Nedochozí ke stimulaci nové syntézy. Při terapeutickém použití se zabráni možným toxickým vedlejším účinkům, které je možné očekávat u konjugátu, který je založen na kompletním cytotoxickém toxinu Pseudomonas nebo ne srovnatelném cytotoxinu.

Předmětem vynálezu může být tedy konjugát /hybridní protein/, sestávající z /i/ proteinu nebo peptidu /transportní protein/peptid/ s vysokou afinitou k žirným buňkám/basofilům a /ii/ specifické proteázy, který blokuje degranulaci popřípadě sekreční mechanismus buněk. Konjugát slouží k léčení /profylaxi alergických reakcí.okamžitého typu.

/i/ Jako vysoce affinní, žirné buňky vázající složka konjugátu se používá zejména Immunglobulin typu E /IgE/ popřípadě jeho fragmenty / například Fc-fragment/. Dále se používají i antitělíska proti specifickým povrchovým molekulám žirných buněk/basofil, které se vážou selektivně na jejich membránu plasmy. Především splňují tento účel ajtitělíska proti IgE-receptoru. Dále se mají používat inaktivní, ale vázající mutanty mast cell-degranulating peptidu jako transportní peptid v hybridním proteinu. Tyto transportní peptidy/-proteiny slouží k tomu, aby vyplavily proteázu do buněk. Tato proteáza štěpí ve fúzním komplexu žirných buněk vysoce specifické proteiny, které zavádějí degranulační mechanismus buněk.

/ii/ Jako vysoce specifická proteáza slouží metalloproteináza, například lehký řetězec toxinu botulinu typu A, B,

C, D, E, F nebo G /BoNT/X/ stejně tak jako toxin tetanu /TeNT/ nebo IgA-proteáza z *Neisseria gonorrhoeae*. Tyto proteázy štěpí synaptosomal-associated protein /MR 25.000/ /SNAP 25/, Synaptobrevin nebo Syntaxin. Jestliže se štěpí pouze jeden ze jmenovaných proteinů/peptidů, zabrání se degranulaci žírných buněk. Potom nedojde již k žádné sekreci histaminu, prostaglandinů a leukotrienů, a nemůže již dojít k alergickým symptomům.

V předloženém vynálezu se mohou netoxické lehké řetězce toxinů spojovat s transportními proteiny, které se vážou výlučně na žírné buňky popřípadě basofily a proto jsou pouze těmito zachyceny, přičemž lehké řetězce se tak řečeno dostanou současně do takovýchto buněk jako jezdci po skluzavce. Do nervových buněk nebo jiných typů buněk organismu nemohou vniknout, takže účinek na žírné buňky a basofily zůstane omezený. Jestliže je jeden z těchto substrátů proteologicky rozrušen, neobjeví se po styku této IgE obsahujících buněk s alergeny nebo jedním ze shora uvedených léčiv žádné alergické symptomy.

Jako proteiny vázající specificky žírné buňky se používají:

- 1/ immunoglobuliny typu E, jejich fragmenty typu Fc,
- 2/ antitělíska proti receptoru IgE,
- 3/ mast cell-degranulating peptide a
- 4/ antitělíska proti kanálu draslíku specifickém pro žírné buňky.

K uvedeným proteinům lze poukázat na následující stav techniky:

- | | |
|-------------------|---------------|
| - IgE | Helman /1995/ |
| - fragment IgE-Fc | Helman /1995/ |

- antitělíska proti IgE-receptoru žírných buněk/basofil, antitělíska proti kanálu draslíku specifickém pro žírné buňky, Fab-fragment antitělíska; při tom se jedná o standardní způsoby, které jsou popsány v:

MCD peptid

Gmachel a. Krell /1995/

- inaktivní ale vázající mutanty

Mutovaný peptid se vyrobí standardním způsobem:

Nichol D.S.T. /1995/

- lehké řetězce různých toxinů botulinu typu A až G:

Binz et al. /1990/

- lehký řetězec toxinu tetanu

Eisel et al. /1989/

- IgA-proteáza

Bruscheck et al. /1995/

Spojení obou složek / transportního proteinu a proteázy/ se provádí různými způsoby:

Nejdříve se lehký řetězec toxinu chromatograficky čistí. Lehký řetězec je zcela netoxický, protože po oddělení od těžkého řetězce, neurotropního transportního proteinu, se nemůže dostat do nervových buněk a extracelulární / mimobuněčný/ extrakt není přítomný. Lehký řetězec se potom spojí chemicky s proteiny čtyř vázajících žírných buněk na konjugát, který se dostane do cytosolu žírných buněk. Tam štěpí lehký řetězec jejich substrát, načež je blokována sekrece histaminu a jiných látek. Druhá cesta syntézy konjugátu spočívá v tom, že gen pro lehký řetězec se spojí s genem pro jeden ze čtyř proteinů spojujících žírnou buňku, takže se ve vhodných hostitelských buňkách exprimuje hybridní protein. Tento biotechnologicky vy-

ráběný hybridní protein by měl analogicky jako konjugát vyrobený ze dvou proteinových složek blokovat sekreční proces ze žírných buněk.

Výroba hybridních proteinů je sama o sobě známým způsobem, zejména v oblasti léčení nádorů /Vogel, C.W., 1987; Magerstadt, M., 1991/. V tomto terapeutickém konceptu se antitělísko proti povrchovým proteinům buněk nádoru spojí s cytotoxickým proteinem, například ricinem, toxinem záškrtu, aby se usmrtily rakovinové buňky. Nové na tomto představeném způsobu podle vynálezu je použití specifických proteáz popřípadě proteolytických domén v hybridních proteinech pro zabránění degranulace žírných buněk a tím pro antialergickou terapii. S těmito hybridními proteiny se dá nejenom zabránit silně ovlivňujícím alergickým symptomům /senné rýmě, astmatu a neurodermitidám / vleklým ohraničeným svědivým zánětům kůže//, tyto by se mohly také podávat i profylakticky pro zabránění alergických reakcí v rámci terapie pomocí život zahraňujících léčiv. Kromě toho by mohly zabránit alergickým symptomům, ke kterým dochází při desensibilizaci.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1:

Syntéza hybridního proteinu z IgE a lehkého řetězce BoNT/ A

Vyčištěný toxin botulinu /5,0 mg/ typu A byl po ekvilibraci v 15 mM tetraboritanu sodného a 30 mM fosforečnanu, pH=8,4, nanesen na QAE-sephadexový sloupec /1,0x3,0 cm/, ekvilibrovaný stejným pufrům. Sloupec byl potom promyt 10 ml 120 mM dithioerythrolu, 2 M močoviny a 1 mM EDTA a přes noc inkubován. Potom se lehký řetězec

eluoval ze sloupce 10 mM borátového pufru a dialyzován proti 20 mM fosforečnanu, pH = 7,0.

Immunoglobulin E /Ratte/ se koupil. 10 mg immunoglobulinu se štěpily 50 ug papainu v 1 ml fosforečnanového pufru /4 °C přes noc/. F_c -fragment se čistil přes gelový filtrační sloupec Sephakryl S200, 3,0 mg vyčištěného F_c -fragmentu se inkubovaly 16 hodin se 3,0 mg vyčištěného lehkého řetězce toxinu botulinu s 10 mM bifunkčního agens dithiobissukcinimidylpropionátu ve 2 ml fosforečnanu sodného, pH=7,0. Takto zesyntetizovaný hybridní protein se čistil gelovou filtrací /Sephacryl S200/ a jeho čistota se analyzovala SDS-gelovou elektroforézou.

Zábrana degranulace žírných buněk se zkouší ve dvou pokusných vsázkách. V první vsázce se inkubují žírné buňky z krys s hybridní molekulou, a potom se stimulovalo uvolňování histaminu. Stimulace se provádí specifickými liberatory histaminu, jako MCD-peptidem a Concanavalinem A / poslední je poukusně využitá látka/, popřípadě přímým zvýšením intracelulární koncentrace vápníku. Poslední se získá injekcí vápníku do jednotlivé žírné buňky. Tím se zosílí výše popsaná kaskáda signálů, neboť zvýšení koncentrace vápníku je krokem v sekrečním procesu, po kterém následuje fúze vesikul. Degranulace žírné buňky, které zobrazuje ošet uvolňování histaminu, se sleduje ve fázově kontrastním mikroskopu. Dále se uvolněný histamin může kvantifikovat pomocí měření fluorescence. Konečně se může stabilizovat elektrofyzilogicky zvětšení žírné buňky, které je způsobeno uložením membrán vesikula do membrány plasmy při degranulaci. V buňkách ošetřených hybridním proteinem nedojde v protikladu ke kontrolním buňkám 1. žádná morfologická změna, 2. nedojde k žádnému zesílení fluorescence v přesahu buněk a 3. nedojde k žádnému zvětšení buněk. Tím se může

prokázat, že uvolňování histaminu je blokováno hybridním proteinem.

Ve druhé vsázce se hybridní protein injikuje živým krysám. Krysy se po několika dnech usmrtí a jejich žírné buňky se získají obvyklými metodami. Degranulace popřípadě uvolňování histaminu se stanovuje stejně jako je to výše popsáno. V této vsázce se zkouší, jestli se konjugát může i v živém zvířeti dostat do kompartmentu, ve kterém se nacházejí žírné buňky, a zda je tam inaktivuje.

Příklad 2

Výroba rekombinantního hybridního proteinu spojením genu pro lehký řetězec *Clostridium botulinum* typ A s genem pro imunoglobulin E popřípadě jeho fragmenty /Fc-fragment/

Gen pro lehký řetězec toxinu botulinu A se izoluje pomocí vhodného primeru přes PCR / polymerase chain reaction/. K tomu se použije kultura *Clostridium botulinum* typu A, ze které se připravuje DNA. Z publikované sekvence genu toxinu /Hinz et al./ se odvozuje primární pár a pomocí PCR se amplifikuje gen pro lehkou podjednotku. Potom se tento gen klonuje podle údajů výrobce v komerčním expresním vektoru pQE.

Gen pro F_c-fragment humánního imunoglobulinu E /Helman L./, se izoloval pomocí PCR z komerční banky cDNA a v konstrukt vektoru se fúzuje s genem pro lehký řetězec toxinu A botulinu.

S tímto konstruktem se transformují kompetentní M15 buňky /*E. coli*/. Vzhledem k tomu, že tomto expresním systému jsou insertované geny opatřeny "his-tag", čistí se rekombinantní protein přes Ni-afinitní sloupec. Na důklad-

né čištění navazuje gelová filtrace přes Sephacryl 5300. Testování biologické aktivity se provádělo opět na izolovaných žírných buňkách in vitro.

Příklad 3

Výroba rekombinantního hybridního proteinu spojením genu pro lehkou podjednotku toxinu tetanu s mutovaným genem pro mast cell degranulating peptide /MCD/

"Sekvence pro "Mast Cell Degranulating Peptide", 22mer je známa /Gmachl/, M, und Kreil, G./. Na základě toho se syntetizuje korespondující oligonukleotid.

Pro izolaci sekvence lehké podjednotky toxinu tetanu byla vytvořena kultura C₊ tetani a z té byla získána DNA. Ze známé sekvence kyseliny nukleové toxinu tetanu byl získán primér pro PCR a tím gen pro lehkou podjednotku toxinu.

Jak je popsáno v příkladu 1, byly obě sekvence kyseliny nukleové fúzovány v expresním vektoru pQU a potom v E. coli. Hybridní protein, který byl opět opatřen his-tag se čistil afinitní chromatografií a následující gelovou chromatografií. Vyčištěný gen pro Mast Cell Degranulating Peptide se chemicky syntetizoval s bodovou mutací v aktivní doméně peptidu. Gen se spojil s genem pro lehký řetězec toxinu tetanu. Hybridní protein se exprimoval v E. coli a čistil. Takto vyrobený hybridní protein se zkoušel v Mastcell-Degranulating-Assay.

Příklad 4

Výroba rekombinantního hybridního proteinu pomocí spojení genu pro F_c-fragment IgE s genem pro IgA₁-proteázu

Gen pro F_c -fragment IgE, se izoluje stejně jako to bylo popsáno v příkladu 1.

Gen pro IgA-proteázu z N-gonorrhoeae je znám. Z toho se odvodí prímér, a z preparace kyseliny nukleové z N-gonorrhoeae byl pomocí PCR získán gen pro specifickou proteázu.

Obě kyseliny byly intergrovány v komerčním vektoru podle údajů výrobce a hybridní protein se čistil afinitní chromatografií /viz příklad 2/.

Inhibitorická aktivita se prokazovala opět na izolovaných žirných buňkách /viz výše/.

Příklad 5

Výroba hybridního proteinu, který sestává z Fab-fragmentu antitělíska proti IgE-receptoru a lehkého řetězce toxinu typu B botulinu.

Monoklonované antitělíska proti IgE-receptoru na žirných buňkách se koupilo a chromatograficky se dočistilo. 0,5 mg antitělíska se konjugovalo s 0,4 g vyčištěného lehkého řetězce toxinu B botulinu. Lehká podjednotka byla po preparaci neurotoxinu, stejným způsobem jako to bylo popsáno v příkladu 1, izolována štěpením neurotoxinu a následujícím čištěním přes iontoměničovou chromatografii.

Oba proteiny /lehká podjednotka toxinu typu F a monoklonované antitělíska/ se spolu spojily s bifunkčním činidlem. Za tím účelem se izolované proteiny inkubovaly s 10 mM maleinimidobenzoyl-N-hydroxysukcinimidoesteru. Hybridní protein se potom čistil gelovou filtrací přes Sephacryl S300 aby se zbavil nekonjugovaných proteinů.

Na izolovaných žirných buňkách se opět ukázalo, že syntetizovaný hybridní protein inhibuje sekreci histaminu.

vztah k jiným patentům

Patent No. 4902495

IgE Fc directed delivery systems

Novel Agent Controlling Cell Activity

PCT Anmeldung WO 94/21300

Literatura:

- 1) Ahnert-Hilger G., Bigalke H. (1995)
Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning.
Progress in Neurobiology 46: 83-96
- 2) Benecke R., Kessler K.R. (1995)
Botulinumtoxin A
Akt. Neurol. 22: 209-213
- 3) Bigalke, H. (1999 in press)
Clostridial Toxins, Handbook of Experimental Pharmacology and
Toxicology, Ed. Just & Aktories, Springer Verlag.
- 4) Binscheck T., Bartels F., Bergel H., Bigalke H., Yamasaki S.,
Hayashi T.,
Niemann H., Polner J. (1995)
IgA protease from Neisseria gonorrhoeae inhibits exocytosis in
bovine chromaffin cells like tetanus toxin.
J. biol. Chem. 270: 1770-1774
- 5) Binscheck T., Wellhöner H.H. (1997)
Tetanus and botulinum toxins - zinc proteases - synaptotagmin -
exocytosis.
In: Toxins and signal transduction
(Eds.: Gutman Y., Lazarovici P.) 1: 457-487
- 6) Binz, T. , Kurazono, H., M., Frevert, J. , Wernars, K. &
Niemann, H. (1990)
The complete sequence of botulinum toxin A and comparison with
other clostridial neurotoxins

J.Biol.Chem. 265: 9153-9158

7) Cardoso, F. & Jancovic, J. (1995)
Clinical use of botulinum neurotoxins

Current Topics Microbiol.Imunol. 195: 123-141

8) Fishman, A., Lorberboum-Galski, H. (1997)

Targeted elimination of cells expressing the high-affinity
receptor for IgE (Fc epsilon RI) by a Pseudomonas exotoxin-based
chimeric protein

Eur.J.Immunol., 27:486-494

9) Gmachl, M. & Kreil, G. (1995)

The precursors of the bee venom constituents apamin and MCE
peptide are encoded by two genes in tandem which share the same
3'-exon

J.Biol.Chem. 270 (21): 12704-12708

10) Helman, L. (1995)

Characterization of four novel epsilon chain mRNA and a
comparative analysis of genes for immunoglobulin E in rodents
and man

Eur. J. Immunol. 23 (1):, 159-167

11) Liddel & Weeks (1995)

Antikörper-Techniken

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

12) Link E., Edelmann I., Chou J., Binz T., Yamasaki S., Eisel
U., Baumert M.,

Südhof T.C., Niemann H. & Jahn R. (1992)

Tetanus toxin action: Inhibition of neurotransmitter release
linked to synaptobrevin proteolysis.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 189: 18423-26

13) Magerstadt, M. (1991)

Antibody conjugates and malignant diseases

CRC Press

14) Hamawy, M.M. (Ed.) 1997)

IgE Receptor (FcεRI) Function

In: Mast Cells and Basophils

Springer Verlag

15) Marxen P., Fuhrmann U., Bigalke H. (1989)

Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and botulinum
A neurotoxins on exocytosis in chromaffin
cells.

Toxicon 27: 849-859

16) Nichol D.S.T. (1995)
Gentechnische Methoden
Spektrum Akademischer Verlag

17) Vogel, C.-W. (Ed.) (1987)
Immunoconjugates: Antibody conjugates in radio-immaging anth
therapy of cancer
Oxford UP Inc.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Hybridní protein zahrnující nebo sestávající z
/i/ z jednoho o sobě známého proteinu, který se váže o sobě známým způsobem na žírné buňky a/nebo basofily a/nebo je jimi zachycen a
/ii/ o sobě známé proteázy, která štěpí jeden nebo několik proteinů sekrečního aparátu žírných buněk a/nebo basofilů.
2. Hybridní protein, zahrnující nebo sestávající z
/i/ proteinu, který se váže na žírné buňky a/nebo basofily a/nebo je jimi zachycen, přičemž protein /i/ je vybrán z následující skupiny
IgE,
fragmentu IgE, zejména fragmentu IgE-Fc,
antitělísk proti IgE-receptoru žírných buněk a/nebo basofilům,
fragment antitělíska proti IgE-receptoru žírných buněk a/nebo basofilům, zejména Fab-fragment,
antitělíska proti kanálu draslíku specifickém pro žírné buňky a inaktivního, ale vázajícího MCD-peptidu a
/ii/ proteázy, zejména o sobě známé proteázy, která štěpí jeden nebo několik proteinů sekrečního aparátu žírných buněk a/nebo basofil
3. Hybridní protein, zahrnující nebo sestávající z
/i/ proteinu, zejména o sobě známého proteinu, který se váže na žírné buňky a/nebo basofily a/nebo je jimi zachycen, zejména o sobě známým způsobem, a
/ii/ proteázy, která štěpí jeden nebo několik proteinů sekrečního aparátu žírných buněk a/nebo basofily, přičemž proteáza /ii/ je vybrána z následující skupiny:

- lehký řetězec toxinu Clostridium botulinum, zejména typu A, B, C, D, E, F nebo G,
- lehký řetězec toxinu tetanu /TeNT/,
- katalyticky aktivní fragment lehkého řetězce toxinu tetanu,
- IgA-proteáza Neisseria gonorrhoeae, a
- katalytické domény IgA-proteázy Neisseria gonorrhoeae.

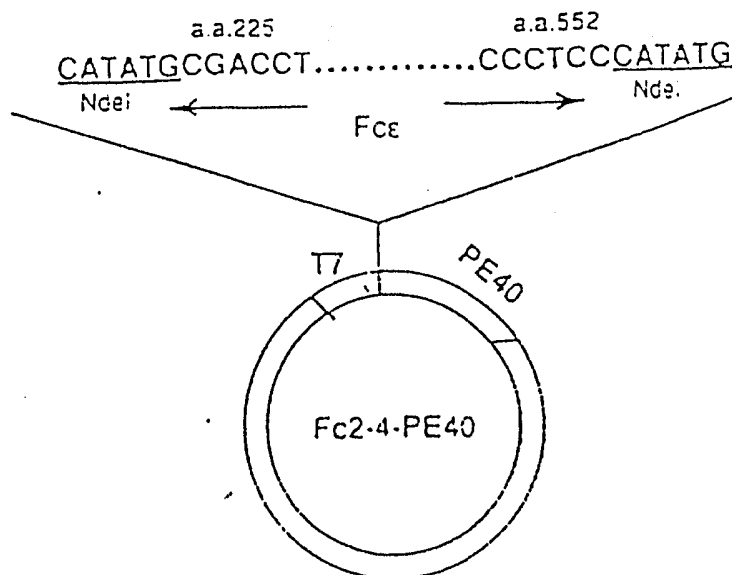
4. Hybridní protein podle nároku 2 nebo 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se protein /i/ vybere ze skupiny podle nároku 2 a proteáza se vybere ze skupiny podle nároku 3.

5. Hybridní protein podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dodatečně k lehkému řetězci toxinu Clostridium botulinum nebo toxinu tetanu je i N-terminální část těžkého řetězce dotyčného toxinu /H_N-fragment/ nebo jeho fragment částí hybridního proteinu.

6. Použití hybridního proteinu podle jednoho z nároků 1 až 5 pro inhibici degranulace žírných buněk.

PV 2000-4167

Figure 1



16.11.00

2/18

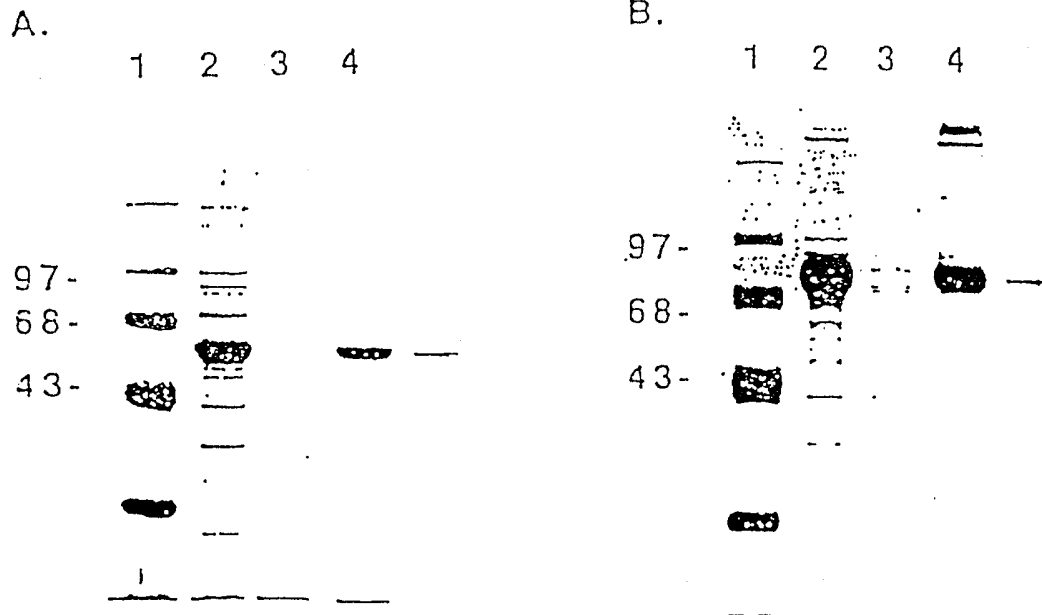


Figure 2

15.11.00

3/18

A. anti-PE

1 2

69—

46—

B. anti-IgE

1 2

69—

46—

Figure 3

16.11.00

4/18

4A.

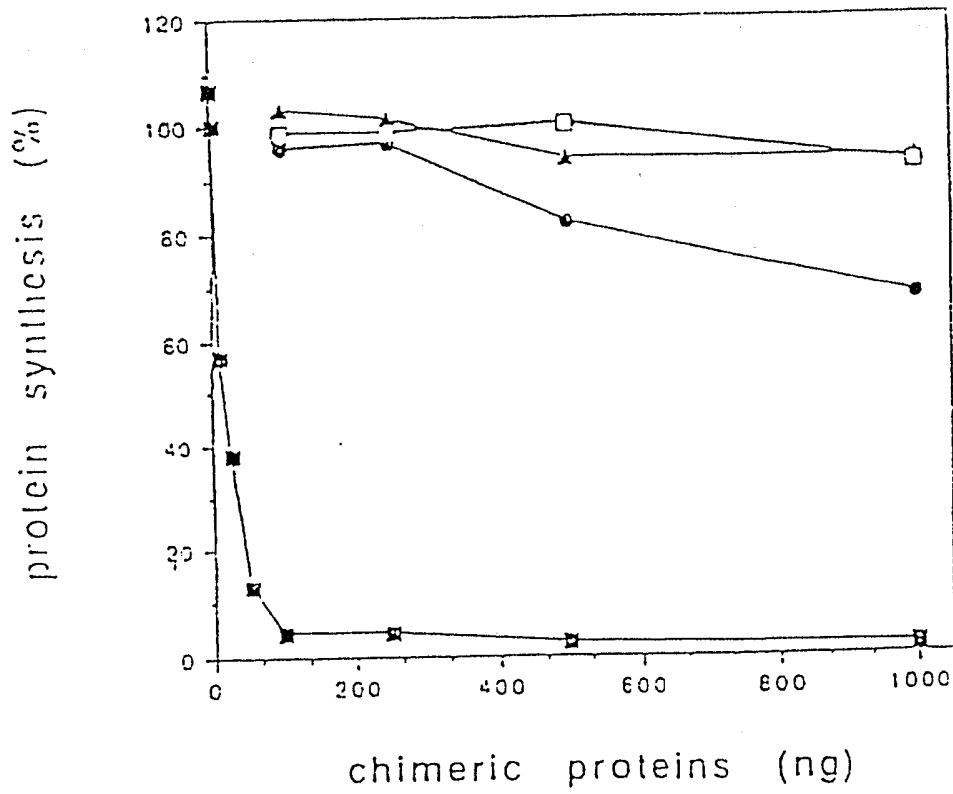
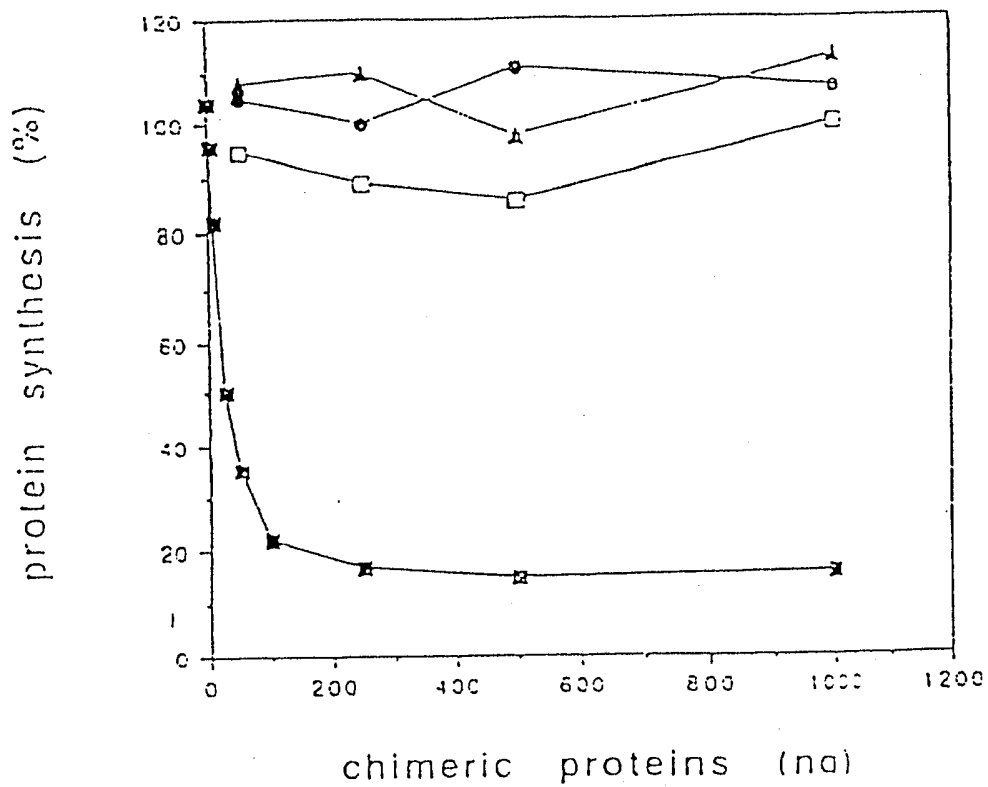


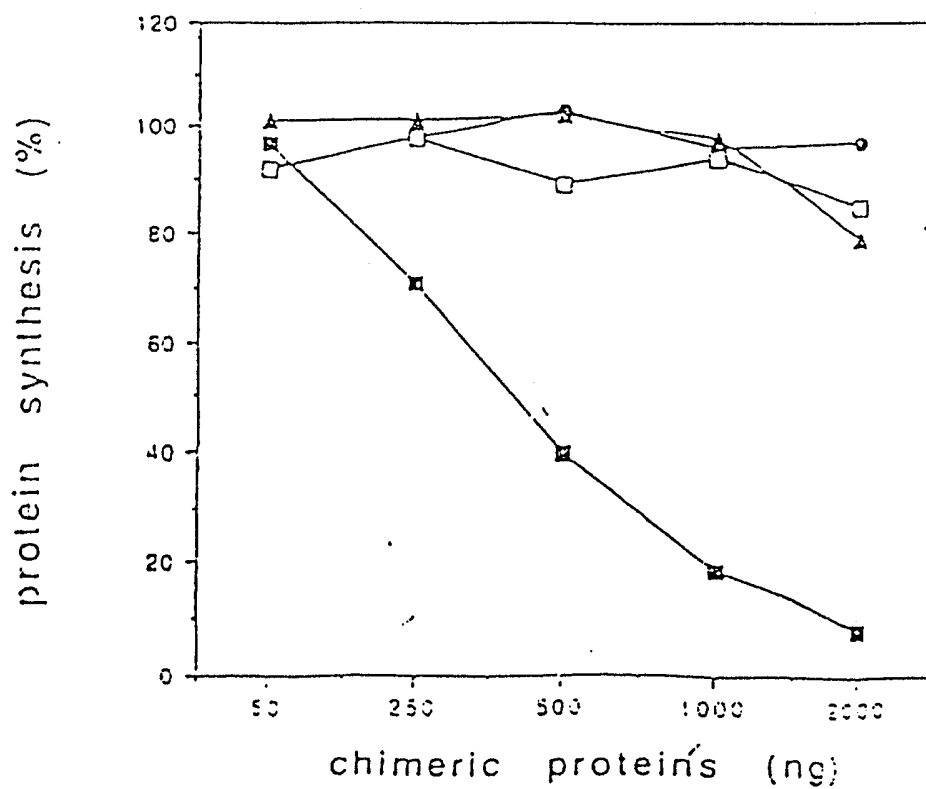
Figure 4

5/18

4B.



4C.



6/18

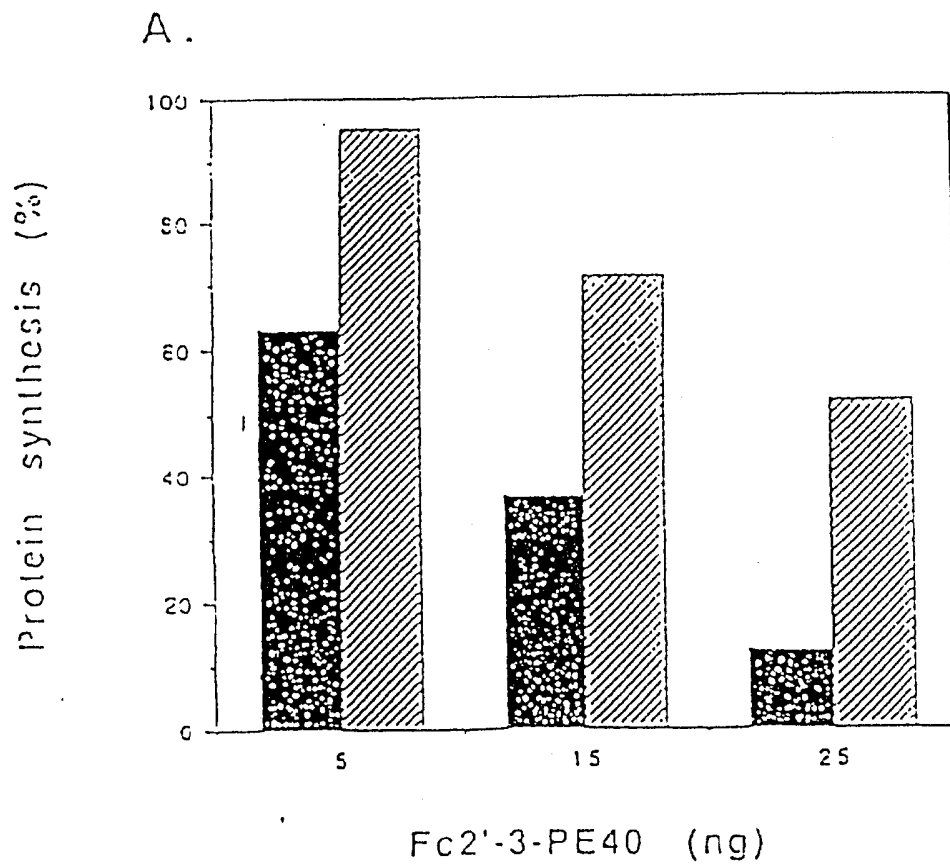
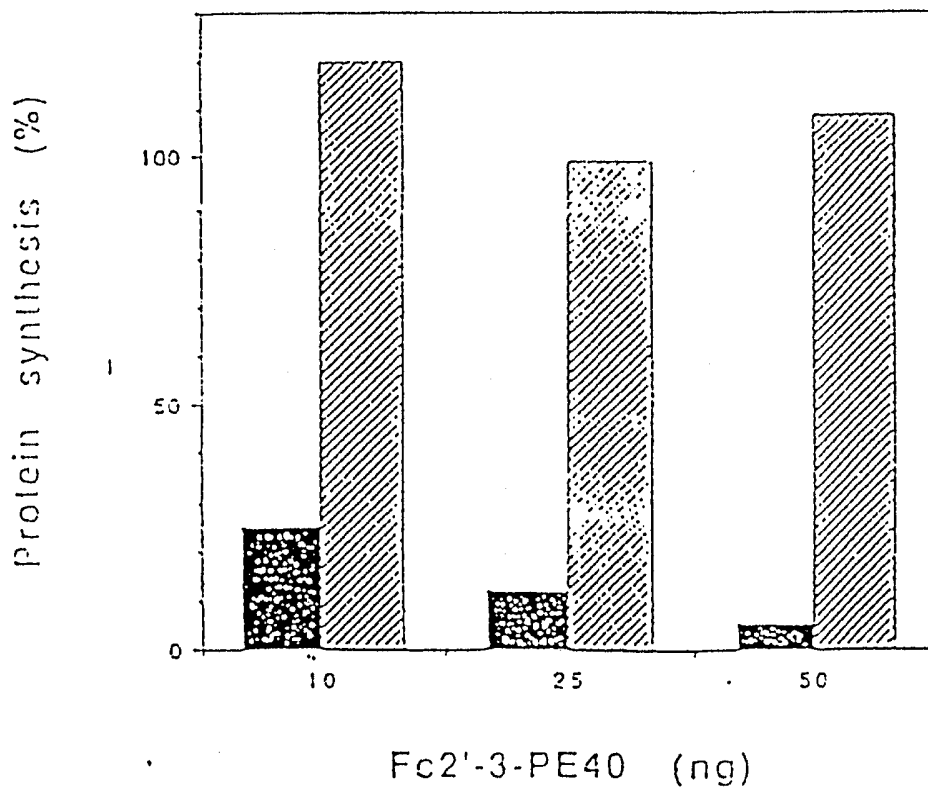


Figure 5

16.11.00

7/18

5 B.



16.11.00

8/18

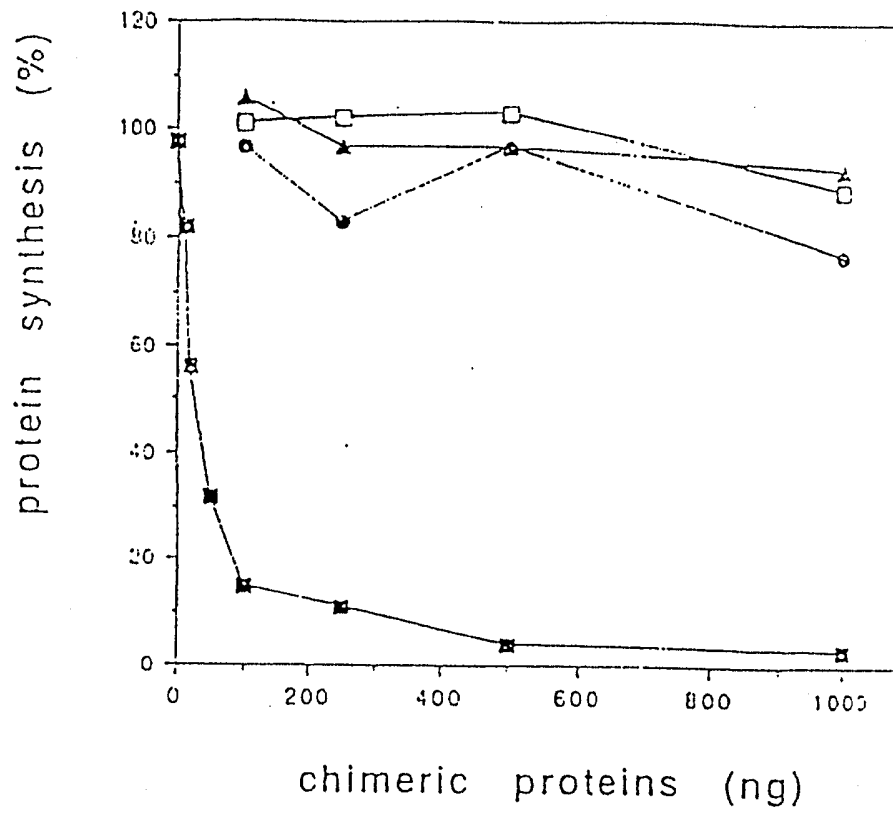


Figure 6

18.11.00

9/18

7A.

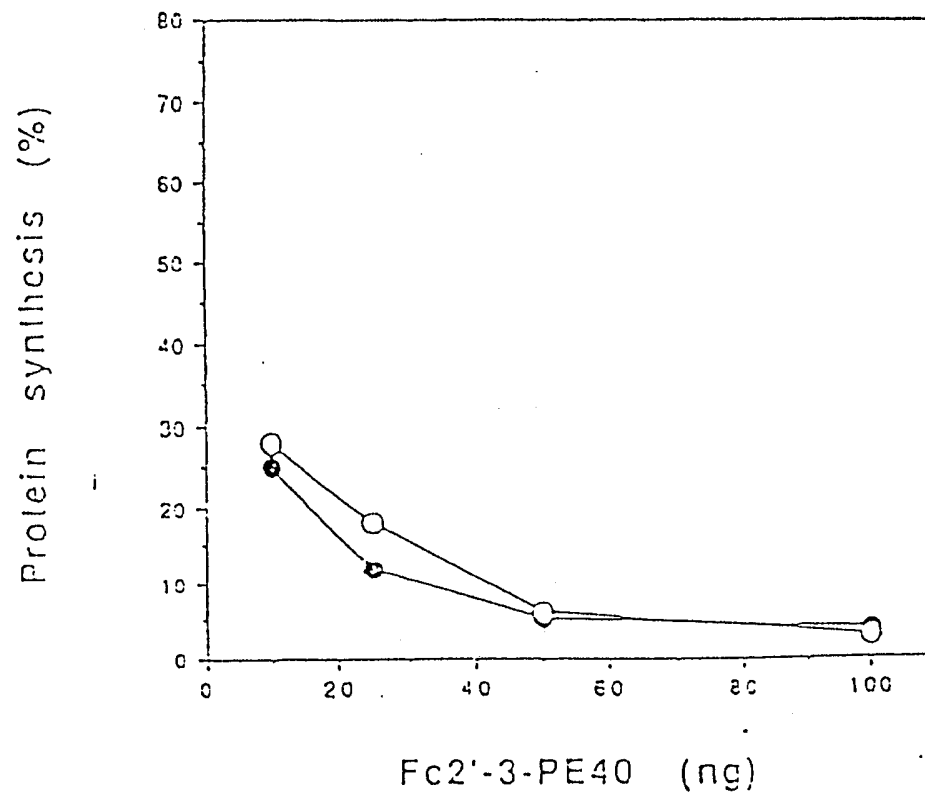
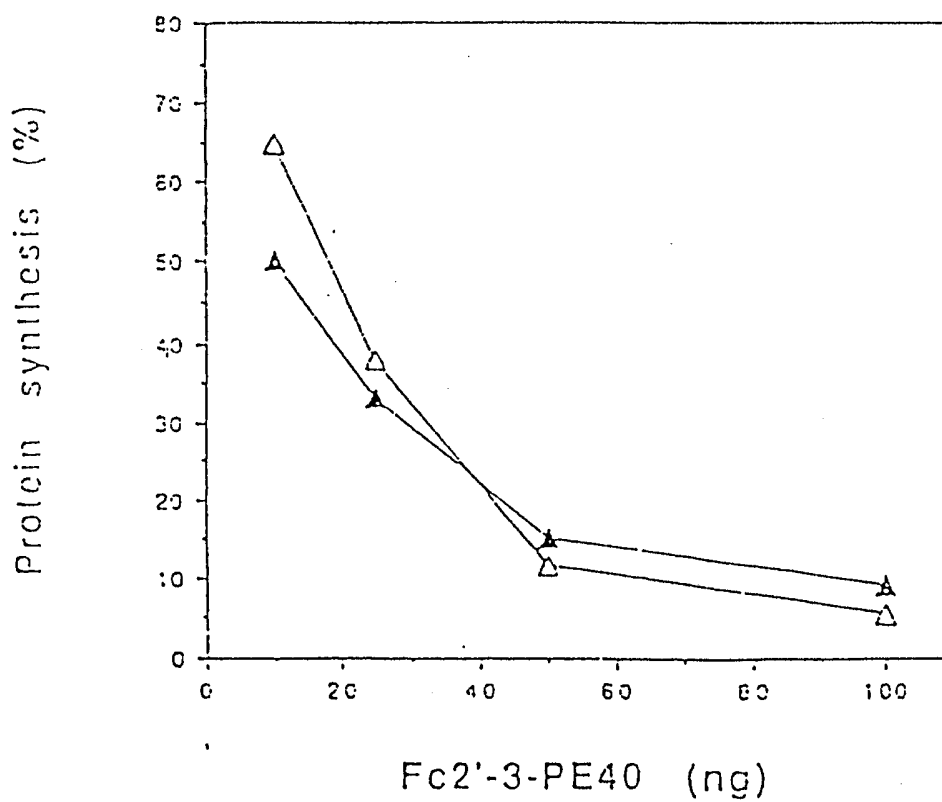


Figure 7A

16-11-00

10/18

7 B.



15.11.00

11/18

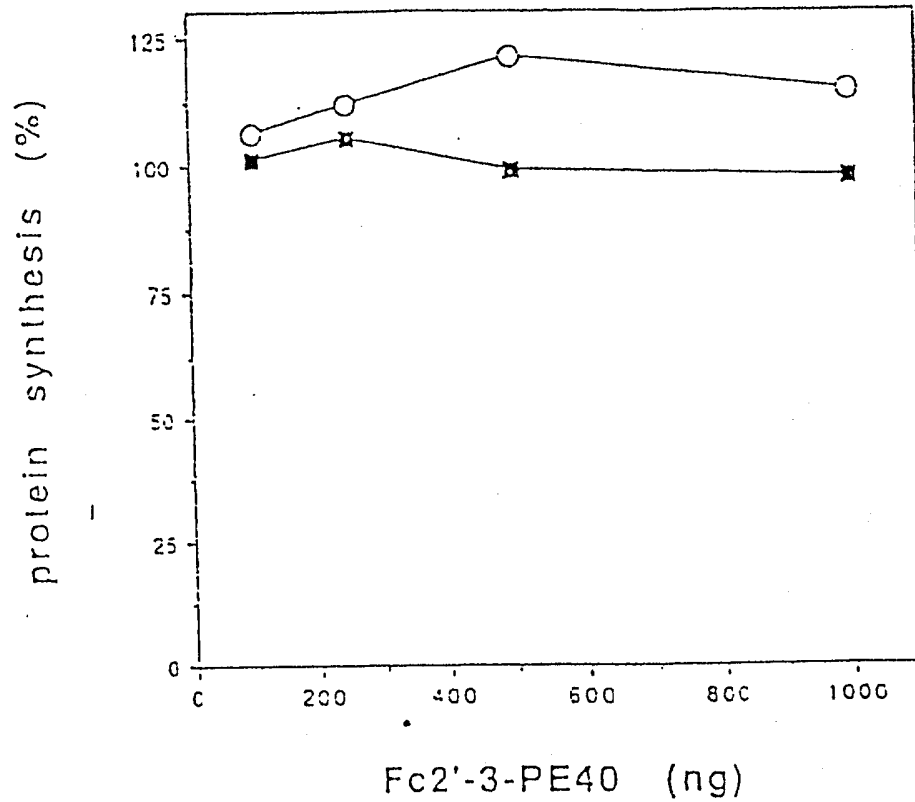


Figure 8

16.11.00

12/18

9 A.

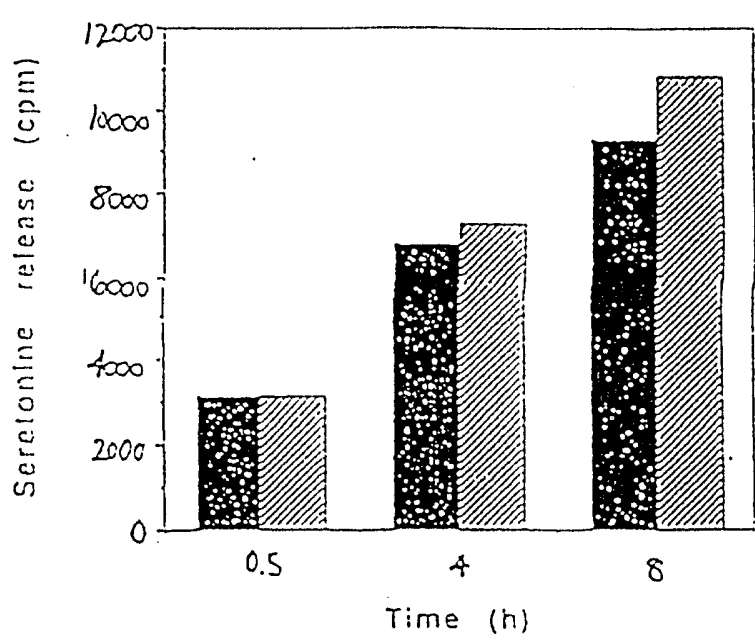


Figure 9: (A)

16.11.00

13/18

9B.

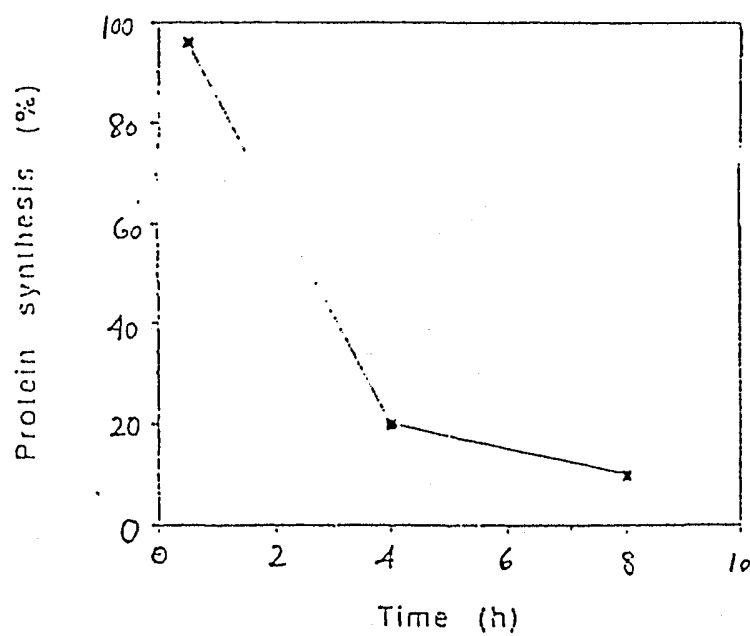
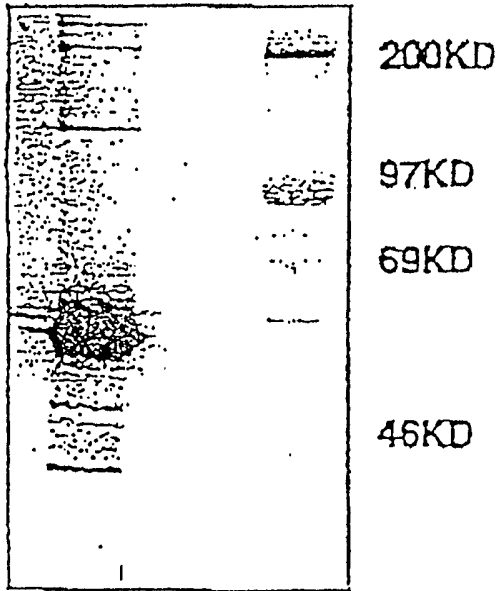


FIGURE 9(B)

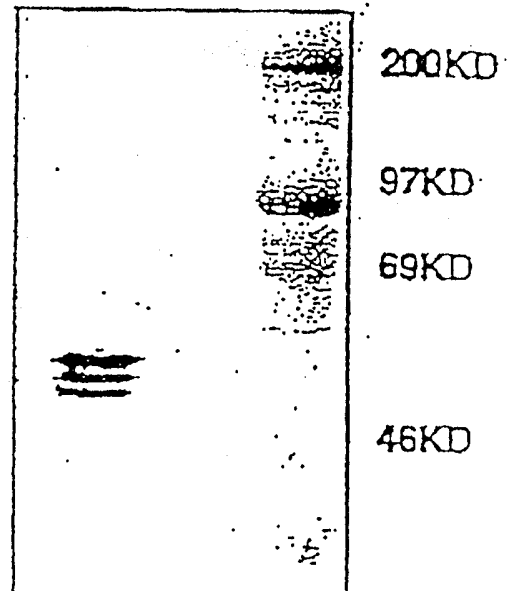
16.11.00

14/18

10A.



10B.



10 C.

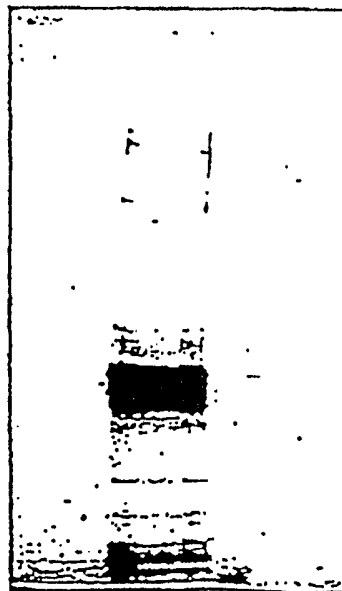


FIGURE 10

15.11.00

15/18

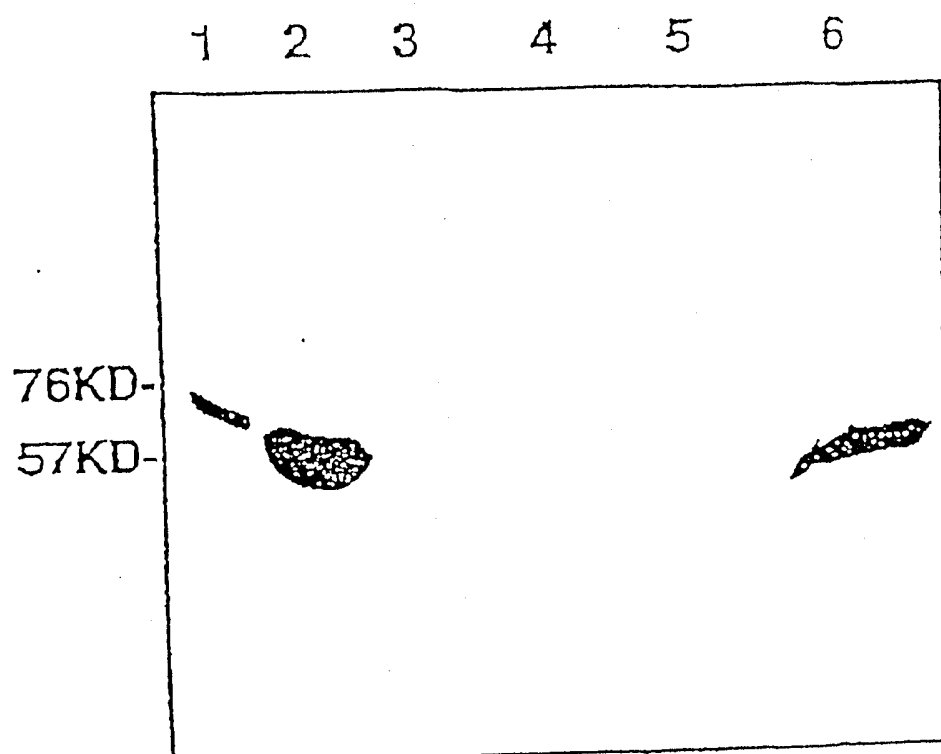


FIGURE 11

16.11.00

16/18

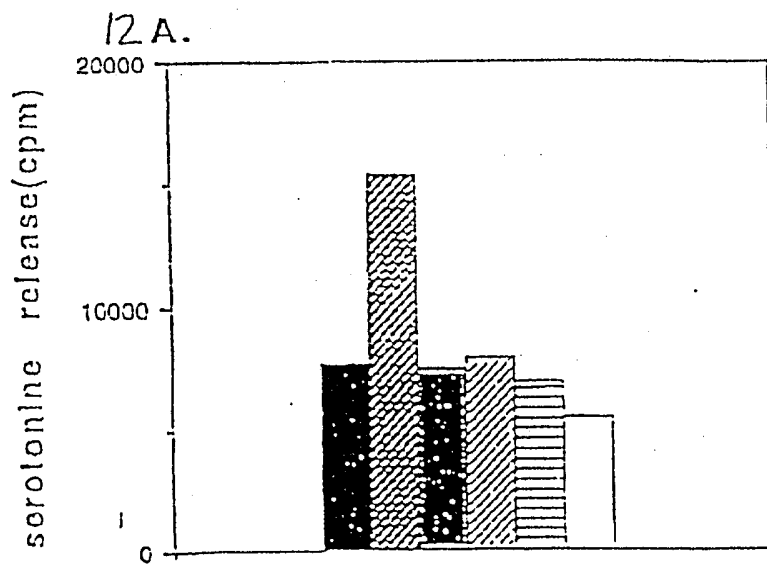


Figure 12 A

16.11.00

17/18

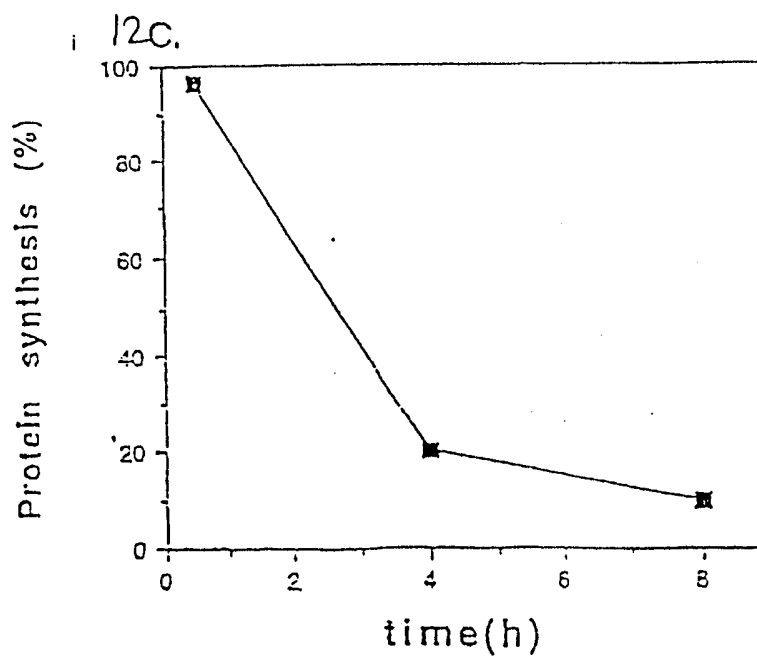
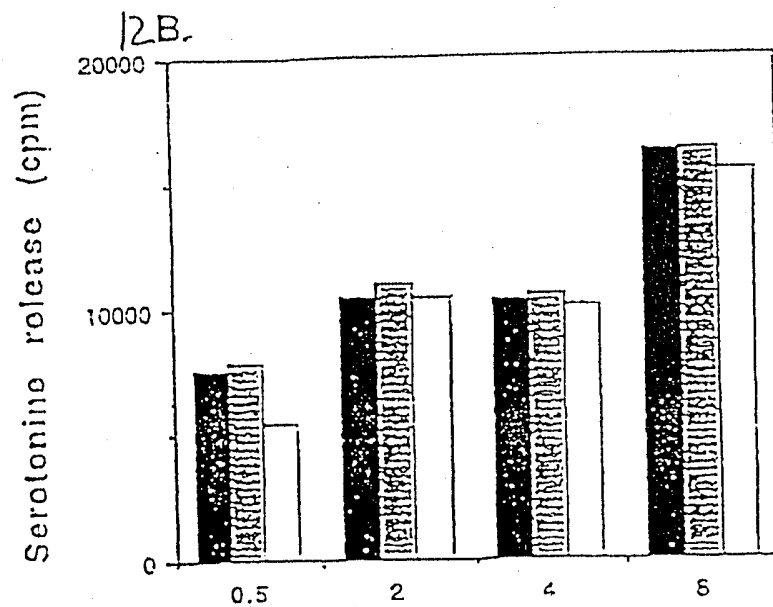


FIGURE 12 B,C

18/18

Table 1: Cytotoxicity of $FC_{2.3.5}-PE_{4.0}$ chimeric protein against various mouse cells

	Cell line	Cell Origin	ID ₅₀ (ng/ml)
TARGET CELLS	MC-9	Mast cells	50-100
	C57	Mast cells	100-125
	BMMC	Primary bone marrow-derived mast cells	
	Abelson	Transformed mast cells	1,200-1,500
	L ₁₀ A	B cell, non-secreting	>10,000
NON-TARGET CELLS	X ₁₀ B	B cell, non-secreting	>10,000
	UT	B cell, non-secreting	>10,000
	PD1.1	T cell, immature	>10,000
	EL-4	T cell, mature	>10,000
	Erythro-leukemia		>10,000
	HEMOPOETIC		
	CONNECTIVE TISSUE	L TK	1900
		Hepatoma	1500