



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 198 895** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 07 K 19/00, 14/31, A 61 K 47/48, 39/395**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

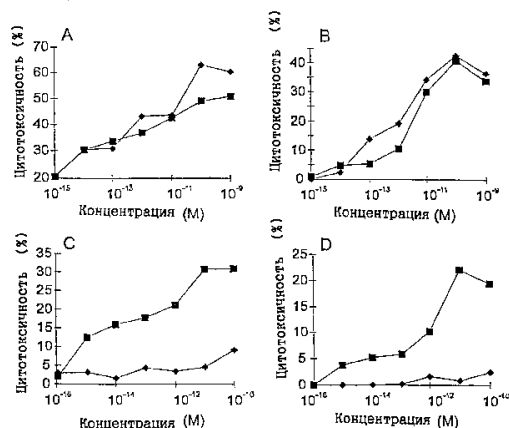
(21), (22) Заявка: 97121859/13, 26.03.1997
(24) Дата начала действия патента: 26.03.1997
(30) Приоритет: 29.03.1996 SE 9601245-5
(43) Дата публикации заявки: 10.01.2000
(46) Дата публикации: 20.02.2003
(56) Ссылки: WO 96/01650 A1, 25.01.1996. MARC BETTER et al., "Potent anti-CD5 ricin A chain immunoconjugates from bacterially produced Fab and F(ab')₂", Proc. Natl. Acad. Sci, January 1993, vl.90, p.457-461. EP 0682039 A1, 15.11.1995. RU 2125889 C1, 10.02.1999.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 29.12.1997
(86) Заявка РСТ: SE 97/00537 (26.03.1997)
(87) Публикация РСТ: WO 97/36932 (09.10.1997)
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Н.Г. Лебедевой, рег.№ 0112

(71) Заявитель:
ФАРМАЦИЯ ЭНД АПДЖОН АБ (SE)
(72) Изобретатель: АНТОНССОН Пер (SE), ХАНССОН Йохан (SE), БЬЕРК Пер (SE), ДОЛЬСТЕН Микаэль (SE), КАЛЛАНД Терье (IT), АБРАМСЕН Ларс (SE), ФОРСБЕРГ Йеран (SE)
(73) Патентообладатель:
ФАРМАЦИЯ ЭНД АПДЖОН АБ (SE)
(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) КОНЬЮГАТ, ОБЛАДАЮЩИЙ СПОСОБНОСТЬЮ АКТИВИРОВАТЬ ИММУННУЮ СИСТЕМУ, И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ УКАЗАННЫЙ КОНЬЮГАТ

(57)
Изобретение относится к функционально активным модифицированным суперантигенам. Представлены конъюгат, обладающий способностью активировать иммунную систему, и фармацевтическая композиция, включающая указанный конъюгат. Конъюгат имеет следующую формулу: T-B-SA(m), где Т представляет собой Fab-фрагмент антитела, направленного на специфический раковый антиген; В представляет собой ковалентную мостиковую связь и SA(m) представляет собой мутированный стафилококковый энтеротоксин E(SEE), в котором в регионе А заменен, по крайней мере, один аминокислотный остаток в положении 20, 21, 24 и 27 на аминокислотный остаток в соответствующем положении стафилококкового энтеротоксина A(SEA). Предлагаемый конъюгат может быть использован в качестве активного начала при

лечении различных заболеваний без побочных эффектов. 2 с. и 3 з.п. ф-лы, 2 табл., 14 ил.





(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 198 895** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 07 K 19/00, 14/31, A 61 K 47/48, 39/395**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 97121859/13, 26.03.1997
(24) Effective date for property rights: 26.03.1997
(30) Priority: 29.03.1996 SE 9601245-5
(43) Application published: 10.01.2000
(46) Date of publication: 20.02.2003
(85) Commencement of national phase: 29.12.1997
(86) PCT application:
SE 97/00537 (26.03.1997)
(87) PCT publication:
WO 97/36932 (09.10.1997)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры", пат.пов. N.G. Lebedevoy, reg.№ 0112

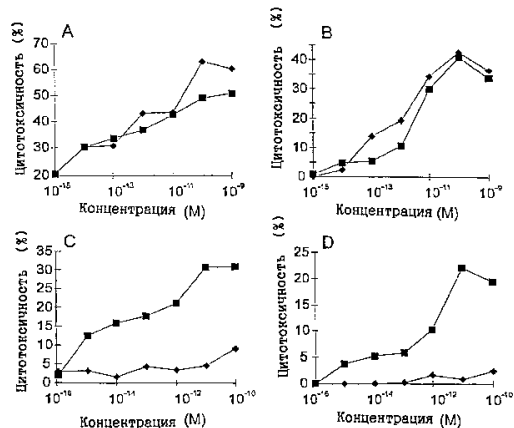
(71) Applicant:
FARMATsIA EhND APDZhON AB (SE)
(72) Inventor: ANTONSSON Per (SE),
KhANSSON Jokhan (SE), B'ERK Per
(SE), DOL'STEN Mikaehl' (SE), KALLAND Ter'e
(IT), ABRAMSEN Lars (SE), FORSBERG Jeran
(SE)
(73) Proprietor:
FARMATsIA EhND APDZhON AB (SE)
(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) CONJUGATE ELICITING ABILITY TO ACTIVATE IMMUNE SYSTEM AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING INDICATED CONJUGATE

(57) Abstract:

FIELD: medicine, immunology, pharmacy.
SUBSTANCE: invention relates to functionally active modified superantigens. Invention presents conjugate exhibiting ability to activate immune system and pharmaceutical composition comprising indicated antigen. Conjugate shows the following formula: T-B-SA(m) where T means Fab-fragment of antibody directed to specific cancer antigen; B means covalent bridge bond and SA(m) means mutated staphylococcus enterotoxin E(SEE) where at least one amino acid residue at positions 20, 21, 24 and 27 in region A is replaced for amino acid at corresponding position of staphylococcus enterotoxin A(SEA). The proposed conjugate can be used as active component in treatment of different diseases being without by-side effects. EFFECT:

valuable medicinal properties of conjugate.
5 cl, 2 tbl, 14 dwg



ФИГ. 1

Данная заявка претендует на приоритет на основании Шведской патентной заявки N 9601245-5, которая была зарегистрирована 29 марта 1996 года, и на основании заявки США 08/695692, которая была зарегистрирована 12 августа 1996 года, которые включены в качестве ссылки.

Область изобретения

Данное изобретение относится к функционально активным модифицированным суперантигенам, которые являются суперантигенами дикого типа (SA I), в которых один или несколько аминокислотных остатков заменены с сохранением при этом функции суперантигена. В случае, когда один или несколько замененных остатков (или их консервативный остаток) встречаются в соответствующих положениях в другом суперантигене дикого типа (SA II), модифицированный суперантиген называют химерой (иногда гибридом). Таким образом, химерные суперантигены будут содержать частичные последовательности/районы, происходящие по меньшей мере из двух различных суперантигенов дикого типа.

Под термином "соответствующие" имеют в виду, что остатки, частичные последовательности и районы, заменяющие друг друга, имеют функционально одно и то же положение в суперантигенах I и II, так что замена приводит к химерной форме, которая способна функционировать как суперантиген.

Терминологию "привитый/прививка/привитая часть/ (трансплантат)" используют в связи с частями полной последовательности суперантигена II, которые заменяют соответствующие части суперантигена I, даже если заменена только одна единственная аминокислота.

К модифицированным/химерным суперантигенам относятся также функциональные суперантигены, модифицированные другими путями, например модифицированные заменой аминокислот в участках, иных, чем относящиеся к данному изобретению, конъюгированные с отыскивающей мишень частью молекулы, в том числе также слитые формы, когда эта часть молекулы является полипептидом/белком. Порядок проведения этих модификаций может вариировать (см. ниже).

Суперантигены

Согласно самому первому определению (приблизительно 1988-1993), суперантигены представляют собой бактериальные или вирусные белки, способные связываться с антигенами главного комплекса гистосовместимости класса II (MHC class II) без предварительного внутриклеточного процессинга и активировать Т-клетки путем связывания с вариабельной областью β -цепи ($V\beta$) Т-клеточного рецептора (TCR). Это связывание приводит к рестриktированной семейством $V\beta$ активации относительно большей части/субпопуляции Т-клеток к лизису экспрессирующих MHC II клеток (суперантиген-зависимому клеточно-опосредованному цитолизу =SDCC).

Хорошо известными суперантигенами дикого типа, согласно этому определению, являются стафилококковые энтеротоксины (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SED, SEE, SEN.

Дальнейшими примерами являются Токсин 1 Синдрома Токсического Шока (TSST-1, также стафилококкового происхождения), Токсины Эксфолиации (Exft), Стрептококковые Пирогенные Экзотоксины A, B и C (SPE A, B, и C), белки мышиноного вируса молочной железы (MMTV), Стрептококковые белки M, Энтеротоксин Clostridial perfringens (CPET), суперантигены Mycoplasma arthritis и т.д. Обзор суперантигенов и их свойств дан Kotzin et al., 1993.

В самом начале 90-х годов было обнаружено, что активация и последующий лизис клеток могут происходить независимым от MHC класса II образом в случае, когда суперантиген конъюгирован с узнающей мишень частью молекулы, способной связываться со структурной клеточной поверхности (Dohlsten et al., WO9201470 и Abrahmsen et al., WO9601650). При инкубировании клеток-мишеней (несущей структуру-мишень для отыскивающей мишень части молекулы) и эффекторных клеток (Т-клеток) с конъюгатами, клетки-мишени становятся лизированными (суперантиген-антитело-зависимый клеточно-опосредованный цитолиз = SADCC) без необходимости экспрессии класса II. Поэтому концепция суперантигена наших дней, используемая в контексте данного изобретения, если нет иных указаний, включает в себя любое соединение (предпочтительно полипептидной структуры), которое способно связываться со структурой клеточной поверхности (структурой-мишенью) и с одной или несколькими цепями полиморфных TCR, в частности с цепью $V\beta$, с активированием тем самым субпопуляции Т-клеток, экспрессирующих специфическую цепь TCR, участвующую в этом связывании. Затем Т-клетки становятся цитотоксичными в отношении клеток, несущих эту клеточную структуру (структуру-мишень, клеток-мишеней). Обычно активированная субпопуляция Т-клеток составляет приблизительно 1-20% от общего числа Т-клеток индивидуума.

Предпосылки изобретения - Структурные и функциональные исследования, использующие мутированные и химерные суперантигены

Ранее были описаны химерные суперантигены, в том числе формы с точковыми мутациями (Kappler et al., WO 9314364, Kappler et al., 1992; Grossman et al., 1991; Hufnagle et al., 1991; Hartwig et al., 1993; Fraser et al., 1993; Mollick et al., 1993; Irwin et al., 1992; Hudson et al., 1993; и Blanco et al., 1990). Mollick et al. и Hudson et al. показывают на основании исследований химер, что $V\beta$ -специфичность SEA и SEE основана на определенных аминокислотных последовательностях, присутствующих в карбоксиконцевом районе (т. е. аминокислотных остатках 200, 206 и 207). Кроме $V\beta$ -специфичности, в основном зависящий от этого района, Mollick et al. смогли также показать, что для полного воспроизведения SEE-подобной активности SEA, содержащего SEE-прививки, в отношении $V\beta 8$ был необходим фрагмент, содержащий 70 N-концевых аминокислотных остатков из SEE. Этот фрагмент содержит части SEE-подобного сайта

связывания α -цепи MHC класса II, и химерные молекулы SEA/SEE, содержащие эту часть из SEE, ингибировали связывание SEA с DR1 MHC класса II SEE-подобным образом.

Недавно были описаны химеры SEA/SEE, образованные обменом районов, принимающих участие в связывании TCR V β (Lamphaer et al., J. Immunol. 156 (March 15, 1996) 2178-2185). Слитый белок суперантиген SEE/Fab-антитела, в котором домены SEE, участвующие во взаимодействии с T-клетками, были заменены соответствующими негомлогичными доменами SEA, обсуждались на ABRF'96: Biomolecular Techniques, Holyday Inn Golden Gateway, San Francisco, California March 30 - April 2, 1996 (Bjork et al., M45).

Предпосылки изобретения - Терапевтическое использование суперантигенов

Для терапии предлагались неконъюгированные суперантигены с лечебным действием, предпочтительно осуществляемым через общую активацию иммунной системы (Kalland et al., WO9104053; Terman et al., WO9110680 и WO9324136; Newall et al., 1991).

Также предлагалось использование модифицированных суперантигенов, конъюгированных с отыскивающими мишень частями молекулы (Dohlsten et al., WO9201470; Abrahmsen et al., WO9601650, включенные здесь в качестве ссылок). Это делало возможным более широкое терапевтическое использование активации T-клеток через V β . Исследованные до сих пор конъюгаты имели пониженное сродство с классом II, что в свою очередь приводило к снижению тяжелой системной токсичности, обычно связанной с суперантигенами дикого типа.

Terman et al. (WO9110680 и WO9324136) в дополнительных рекомендациях предлагал терапию рака с применением модифицированных суперантигенов и фрагментов суперантигенов.

Kappler et al. (WO 9314634) предложили использовать неконъюгированные суперантигены (SEB), мутированные для элиминации их способности V β -связывания или связывания MHC класса II (в контексте вакцин и для нейтрализации токсических эффектов суперантигенов. Abrahmsen et al. (WO9601650) предложили терапию рака конъюгированными суперантигенами, обладающими модифицированной, предпочтительно уменьшенной, способностью связываться с антигенами класса II. Модификации включали одиночные мутации, а также конструкцию химер между различными суперантигенами.

Проблемы, которые должны были быть решены данным изобретением

Сыворотки популяций человека обычно содержат высокие титры антител против суперантигенов. Например, для стафилококковых суперантигенов относительные титры:

TSST-1>SEB>SEC1>SE3>SEC2>SEA>SED>SEE. Эти относительные титры свидетельствуют о проблемах иммуногенности и проблемах с нейтрализующими антителами в случае, когда SE вводятся парентерально. На основании

лишь этих проблем SEE должен был бы быть предпочтительным стафилококковым суперантигеном. Однако в ходе исследований со слитыми белками мы обнаружили, что способность T-клеточной независимой от MHCC класса II цитотоксичности, суперантиген-антитело-зависимой цитотоксичности (SADCC) конъюгатов SEE является слабой. Титры антител к SE (антител-SE) также указывают на то, что может быть выгодно модифицировать суперантиген "высокого титра", чтобы он был более подобен суперантигену "низкого титра".

Цели данного изобретения

Первой целью является улучшение ранее известных суперантигенов в отношении снижения их иммуногенности и реакции с нейтрализующими антителами.

Второй целью является обеспечение суперантигенов с меньшими побочными действиями при использовании их в качестве лекарственного средства.

Третьей целью является обеспечение улучшенных суперантигенов, которые могут быть использованы в качестве активного начала в лечение млекопитающих, страдающих от раковых опухолей, аутоиммунных заболеваний, инвазий паразитами, вирусных инфекций или других заболеваний, связанных с клетками, которые экспрессируют на их поверхности антигены MHC класса II и/или структуры, которые являются специфическими для соответствующего заболевания и связываются с узнающей мишень частью, включенных в суперантиген.

Открытие, которое привело к данному изобретению

Анализ гомологии последовательностей SEA и SEE (фиг.2) обнаружил, что неидентичные аминокислотные остатки сконцентрированы в 8 различных районах. Вне этих 8 районов, составляющих до 34% последовательности, идентичность двух SE равна 97%, причем замены консервативных аминокислот ответственны за остальные различия. Четыре из этих районов структурно близки к двум сайтам связывания MHC класса II (B: AA 37-50, D: 71-78, E: 136-149 и G: 189-195) и, по-видимому, не взаимодействует с TCR. Дополнительные четыре района (A: AA 20-27, C: 60-62, F: 161-176 и H: 200-207) расположены на конце молекулы, вблизи возможного сайта связывания TCR, который, как считают, находится в канавке между двумя субдоменами. Путем прививки индивидуальных районов (замены аминокислотных остатков, которые отличаются) мы теперь нашли, что свойство SEA-конъюгатов индуцировать цитотоксическую ответную реакцию, а также усиливать пролиферативную ответную реакцию в отсутствие MHC класса II, обусловлено одним районом в домене связывания TCR SEA. Этот район (A) может переноситься в SEE и оказывать сильное влияние на активность в отсутствие класса II, хотя имеет ограниченное влияние на V β -специфичность суперантигена (фиг. 6, таблица 2). По-видимому, все районы (A, C, F и H) участвуют, прямо или косвенно, во взаимодействии с TCR, проявляющемся в измененном стимулирующем действии на мышинные T-клеточные гибридомы (таблица

2).

Вследствие аналогичного способа действия понятно, что подобное структурное разделение этих TCR V β -связывающих свойств относится также к суперантигенам, аналогичным SEA и SEE. То же самое можно сказать и в отношении других типов суперантигенов, в которых связывающие структуры организованы по-иному. Наше открытие позволило нам наметить в общих чертах конструирование химерных суперантигенов, потенциально очень ценных в качестве терапевтических средств.

Изобретение

Первый аспект данного изобретения представляет собой способ лечения заболевания млекопитающего путем активации его иммунной системы посредством введения терапевтически эффективного (иммуноактивирующего) количества модифицированного, предпочтительно химерного, суперантигена. Предпочтительным млекопитающим является человек. Заболевания, о которых идет речь, в основном связаны с клетками, экспрессирующими на их поверхности структуру-мишень, связывающуюся с суперантигеном. В большинстве случаев эта структура-мишень отличается от эпитопа TCR, обычно связывающегося с суперантигенами. Связывание со структурой-мишенью делает возможными также связывание с TCR и активацию Т-клеток. Иллюстративными примерами являются антигены MHC класса II и другие структуры клеточной поверхности, которые могут экспрессироваться на клетках, связанных с ходом заболеваний. Иллюстративными заболеваниями являются злокачественные опухоли, включающие раковые опухоли любого типа (такие как карцинома, саркома, меланома, лимфома и т. д.), вирусные инфекции, паразитарные инвазии и аутоиммунные заболевания. Рак, который может быть подвергнут лечению, может быть локализован в ободочной кишке, молочной железе, шейке матки, почке, желудке, тонкой кишке, двенадцатиперстной кишке, простате, яичке, коже, легком, печени, поджелудочной железе, скелете и т. д., в том числе также метастазирование в различных местоположениях. Активный ингредиент данного изобретения применим также для форм раковых заболеваний, резистентных ко множеству лекарственных средств. Клетки, экспрессирующие структуру-мишень, могут также быть клетками, которые некоторым образом контролируют или регулируют развитие подвергаемого лечению заболевания.

Характерной особенностью этого способа является то, что в нем используют модифицированный суперантиген, в которых один или несколько аминокислотных остатков в районе (районе I), обеспечивающем связывание с субпопуляцией Т-клеток через полиморфную цепь TCR, в частности TCRV β , в суперантигене дикого типа (SA I), замены соответствующим аминокислотным остатком, сохраняющим активность модифицированного таким образом суперантигена. Предпочтительные в настоящее время варианты относятся к химерному суперантигену, в котором один или несколько аминокислотных остатков в районе

(районе I) первого суперантигена дикого типа были заменены соответствующими одним или несколькими аминокислотными остатками в соответствующем районе (районе II) второго суперантигена дикого типа (SA II). Районы I и II различаются по аминокислотным последовательностям. Суперантигены I и II были выбраны таким образом, что районы I и II могут заменять друг друга без уничтожения функции суперантигенов. В этой связи следует считать фактом, что некоторый район I может быть в отдельности неспособным к замене на соответствующий район другого суперантигена дикого типа, хотя при замене вместе с другими районами, определяющими связывание TCR и активацию Т-клеток, результатом является функционально активный суперантиген. Рассматриваемые районы обычно содержат менее 20 остатков, в частности, для суперантигенов, аналогичных SEA. Таким образом, заменяющий аминокислотный остаток отличается от заменяемого остатка и, как должно быть понятно, включает также консервативные замены и замены других аминокислот, приводящие к функционально активным модифицированным суперантигенам, делающим возможными связывание с TCRV β и активацию субпопуляции Т-клеток. Это означает, что модифицированные в соответствии с данным изобретением суперантигены в широком смысле включают любой модифицированный суперантиген, в котором одна или несколько аминокислот в вышеупомянутых районах были функционально заменены.

Термин "консервативная замена" относится к замене аминокислотного остатка химически подобным остатком, например гидрофобного остатка другим гидрофобным остатком, заряженного остатка другим, но одинаково заряженным остатком и т. д.

В качестве суперантигенов I, II и т. д. к моменту заявления о приоритете предпочтительными были стафилококковые энтеротоксины, в частности энтеротоксины, которые координируют цинк, т. е. SEA, SEE, SED и, возможно, также SEN.

Рассматриваемые районы могут иметь любую из вышеупомянутых функций (см. раздел с заголовком "Открытие, которое привело к данному изобретению" и Экспериментальную часть):

1. Сильное влияние на активность суперантигена как таковую и ограниченное действие на TCR-специфичность, в частности, на V β -специфичность. Для суперантигенов SEA-типа это означает район A (положения аминокислот 20-27).

2. Глубокое влияние на специфичность в отношении связывания с полиморфными цепями TCR, такими как V β -цепь. Для суперантигенов SEA-типа это означает район C (положения аминокислот 60-62), F (положения аминокислот 110-126) и H (положения аминокислот 200-207).

Для SEA-подобных суперантигенов это означает одну или несколько замен (применительно к прививке из SEA в SEE; SEE/A-химерам)

Район A: R20G, N21T, S24G, R27K

Район C: G60D, P62S

Район F: H111R, H1 14Q, G115Y, F117Y, G118N, S124V, G126D

Район H: D200G, P206S, D207N

В момент заявления приоритета было предпочтительно проводить все замены для каждого района. Для других суперантигенов могли бы также проводиться аналогичные замены между соответствующими положениями/районами.

В типичном случае можно было бы начинать с одного первого суперантигена, подобного SEE и SED, и затем заменять один или несколько его уникальных V β -связывающих районов соответствующим районом (районами) второго суперантигена (например, SEA), причем первый и второй суперантигены предпочтительно выбирают таким образом, что титр антител в нормальных сыворотках человека для первого суперантигена ниже, чем для второго суперантигена. Для химер SEA и SEE наилучшие способы соответствуют химерам SEE/A-A, SEE/A-AH, SEA/E-BDEG с абсолютной предпочтительностью для SEE/A-A. См. Экспериментальную часть и фигуры.

Вместе с районами F, C, F и H могут быть также заменены аминокислотные остатки в других частях. Одним типом обмена является обмен для уменьшения способности связывания класса II, так как это свойство связано с обычными побочными эффектами, встречающимися при терапии с использованием суперантигенов (общей иммунной активацией с сопутствующим системным высвобождением фактора некроза опухолей (TNF) и интерферона- γ). Для таких суперантигенов, как SEA, SED и SEE, положения, которые важны для способности координировать ионы цинка, могут быть предпочтительно изменены, т.е., например, положения 225 и 227 в мутации H225A SEA и, особенно, D227A, имеют положительное влияние на уменьшение токсичных побочных эффектов (см. Abrahmsen et al., WO09601650 и Fraser et al., 1993).

Другие замены могут быть выполнены по всей молекуле, если они не нарушают функции суперантигена, например, консервативные замены, в частности, вне районов, участвующих в связывании с классом II и TCR. Изменение в последовательности ДНК для изменения связывания MHC класса II или любое другое изменение на уровне ДНК может быть выполнено либо перед изменением в районах обеспечения связывания с TCR, либо после изменения. Эти другие типы модификации могут быть с тем же успехом введены перед заменой аминокислот в районе I. Таким образом, в контексте данного изобретения концепция использования "суперантигена дикого типа" в начале модификации согласно формуле изобретения первично относится к аминокислотной последовательности дикого типа в районе I, вне которого могут иметь место предыдущие модификации.

Конструирование химерных и мутированных суперантигенов можно проводить в соответствии со способами, хорошо известными в этой области. Переключение от района, специфического для одного суперантигена, к соответствующему району в другом суперантигене производят на геномном уровне, и оно может выполняться заменой всей последовательности или точковыми мутациями тех специфических оснований,

которые требуются для получения в результате желательной аминокислотной последовательности. См., например, экспериментальную часть и также цитированные выше ссылки предшествующего уровня знаний. Термин "мутация" включает замену, встраивание или удаление одного или нескольких аминокислотных остатков путем модификации последовательности ДНК, кодирующей белок, который должен быть мутирован.

Суперантиген для использования в способе данного изобретения может быть неконъюгированным суперантигеном, модифицированным, как описано выше, т.е. модифицированным суперантигеном, не имеющим специфически присоединенной узнающей мишень части молекулы, но имеющим явную способность связываться как с антигенами MHC класса II, так и с субпопуляцией Т-клеток через TCR. Более предпочтительно модифицированный суперантиген, предпочтительно, химерный суперантиген, конъюгирован с узнающей мишень частью молекулы. В последнем случае предпочтительными вариантами являются "гибриды" (слияния) между узнающей мишень частью и модифицированным суперантигеном. Эти конъюгаты как таковые являются новыми и представляют собой отдельный аспект данного изобретения.

Структуры конъюгатов данного изобретения аналогичны известным ранее конъюгатам антитело/суперантиген (Dohisten et al., WO9201470; Abrahmsen et al., WO09601650, обе публикации включены в качестве ссылки), т.е. конъюгаты часто подчиняются формуле

T-B-SA(m)

где Т обозначает отыскивающую мишень часть молекулы, SA(m) является модифицированным, предпочтительно химерным, суперантигеном, описанным выше, и В является ковалентной мостиковой связью, соединяющей Т и SA(m) вместе. Т может в принципе содержать дополнительные суперантигенные части молекулы (SA(m), а SA(m) дополнительные узнающие мишень части молекулы, хотя в предпочтительных конъюгатах имеются только одна узнающая мишень часть и одна часть, являющаяся модифицированным антигеном, как описано выше.

Т может быть в принципе любой структурой, которая способна связываться со структурой поверхности клетки, предпочтительно специфической для заболевания структурой. Структура, против которой направлен Т, обычно отличается от (а) эпитопа V β -цепи, с которым связывается SA(m), и (б) эпитопов MHC класса II, с которыми связываются суперантигены. Узнающую мишень часть первично выбирают среди интерлейкинов (например, интерлейкин-2), гормонов, антител, в том числе антигенсвязывающих фрагментов антител, факторов роста и т. д. См., например, Woodworth, Preclinical and Clinical development of Cytokine toxins, presented at the conference "Molecular approaches to cancer Immunotherapy", Ashville, North Carolina, November 7-11, 1993).

К моменту заявления приоритета было предпочтительно, чтобы Т был антителом

(полноразмерным антителом, Fab, F(ab)₂, Fv, одноцепочечным антителом и любым другим антигенсвязывающим фрагментом антитела), с особым предпочтением активных фрагментов антител (таких как Fab), направленных на так называемый эпитоп C242 (Lindholm et al., WO9301303), или более предпочтительно на связывающий эпитоп для антитела 5T4, специфического для рака легких (Stem et al., WO8907947). Однако это не исключает того, что другие специфические для рака антитела могут функционировать также хорошо или даже лучше. Термин "антитело" включает как моноклональные, так и поликлональные варианты, предпочтительно моноклональные препараты.

Т может быть также направлен на уникальные структуры на более или менее здоровых клетках, которые регулируют или контролируют развитие заболевания.

Мостиковая связь В может быть выбрана, как описано ранее (Dohlstien et al., WO9201470; и Abrahmsen et al., WO9601650), т.е. В предпочтительно является гидрофильным и обнаруживает одну или несколько структур, выбранных из амида, тиозфира, дисульфида и т. д. Наиболее известными мостиковыми связями являются связи, полученные рекомбинантными способами, т.е. конъюгирование в этом случае имеет место на геномном уровне. В таких случаях предпочтительны олигопептидные мостики, содержащие гидрофильные аминокислотные остатки, такие как Gln, Ser, Gly, Glu, Pro, His и Arg. Особенно предпочтительными В являются пептидные мостики, состоящие из 1-10 аминокислотных остатков, с абсолютной предпочтительностью для 3-7 аминокислотных остатков. Типичным мостиком является трипептид GlyGlyPro, SEQ ID N1.

Получение новых конъюгатов данного изобретения может проводиться в принципе в соответствии с двумя основными путями реакций: 1. Рекомбинантные способы и 2. Химическое связывание узнающей мишень части Т с модифицированным, предпочтительно химерным, суперантигеном (SA(m)), описанным выше. Эти способы хорошо известны исследователям с обычной квалификацией и включают в себя большое количество вариантов.

Химическое связывание модифицированного неконъюгированного суперантигена с отыскивающей мишень частью Т часто используют функциональные группы (например, первичные аминогруппы или карбоксигруппы), которые присутствуют во многих положениях в этих соединениях. Из этого следует, что конечный продукт будет содержать смесь молекул конъюгата, отличающихся по положениям связывания, а также гетеро- и гомоконъюгаты.

Для рекомбинантных конъюгатов (слитых белков) полученный материал конъюгата будет однородным в отношении положения связывания. Либо аминоконец химерного суперантигена будет связан с карбоксиконцом узнающей мишень части, либо наоборот, для антител, таких как интактные антитела и антигенсвязывающие фрагменты (Fab, Fv, одноцепочечные антитела и т.д.), для слияния могут быть использованы либо легкая цепь,

либо тяжелая цепь. В настоящее время предпочтительны рекомбинантные конъюгаты, наиболее предпочтительно Fab-фрагменты, и связывание аминоконца химерного суперантигена с первым константным доменом тяжелой цепи антитела (CH1), без исключения аналогичного связывания с легкой цепью или с доменами VH и VL, которое также может дать вполне хорошие результаты.

Основная клетка-хозяин для широкомасштабного рекомбинантного получения модифицированных суперантигенов данного изобретения (как слитных форм, так и не-конъюгированных форм) является E.coli. Этот хозяин обеспечивает в принципе два пути: внутриклеточное продуцирование и секрецию. Последний вариант является предпочтительным, так как он обеспечивает очистку правильно уложенных белков из периплазмы и из культурной среды. Вышесказанное не исключает того, что можно получать активные конъюгаты также и в других клетках-хозяевах, например в эукариотических клетках, таких как дрожжи или клетки млекопитающих.

Фармацевтические композиции, доза и пути введения

Третьим аспектом данного изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие модифицированные, предпочтительно химерные, суперантигены данного изобретения, описанные выше (как конъюгированные, так и неконъюгированные формы). Рассматриваемые композиции известны в данной области, за исключением того, что теперь они содержат суперантиген данного изобретения. Так, эти композиции могут быть в форме лиофилизированного состоящего из частиц материала, стерильного асептически приготовленного раствора, таблетки, ампулы и т.д. Могут присутствовать носители, такие как вода (предпочтительно забуференная до физиологически приемлемой величины pH, например, при помощи PBS (забуференного фосфатом физиологического раствора, ЗФР)) или другой твердый или жидкий материал. В общих чертах, эти композиции готовят с использованием конъюгата, смешанного, связанного или иным образом комбинированного с одним или несколькими водорастворимыми или нерастворимыми в воде водными или неводными носителями (или растворенного в них), если необходимо, вместе с подходящими добавками и адъювантами. Обязательным является то, что носители и условия не должны оказывать неблагоприятного действия на активность модифицированного суперантигена.

Обычно суперантиген данного изобретения должен продаваться и вводиться в заранее распределенных дозах, каждая из которых содержит эффективное количество конъюгата, которое на основании представленного здесь результата должно находиться в диапазоне 10 нг - 50 мг, например, в диапазоне 10 нг - 1 мг или в диапазоне 10 мкг - 50 мг. Точная доза будет варьировать от случая к случаю в зависимости от веса и возраста пациента, пути введения, типа заболевания, отыскивающей мишень части молекулы, суперантигена, связи (-B-) и т. д.

Пути введения являются обычно применяемыми в данной области путями, т.е. убивающее клетки-мишени эффективное количество или терапевтически активное количество суперантигена, модифицированного в соответствии с изобретением, приводят в контакт с клетками-мишенями. Для описанных выше показаний это большей частью означает парентеральное введение, такое как инъекция или инфузия (подкожная, внутривенная, внутриартериальная, внутримышечная, внутрибрюшинная) млекопитающему, например человеку. Рассматриваемые модифицированные, предпочтительно химерные, суперантигены могут вводиться местно или системно.

Под термином "убивающее мишень эффективное количество" подразумевают, что это количество является эффективным в активации и нацеливании Т-клеток для разрушения клеток-мишеней.

Предпочтительный путь введения в момент заявления приоритета соответствует пути введения, обсуждаемому для конъюгатов суперантигенов согласно Dohlsten et al., WO9201470 и Abrahmsen et al., WO9601650. Это означает 1-5-часовую внутривенную инфузию (предпочтительно 4-часовую) в день вместе с жаропонижающим средством (парацетамолом). Введение должно повторяться в течение нескольких дней, например, в течение 4 дней, с соблюдением осторожности в отношении риска усиления образования антител, направленных против конъюгата.

Суперантигены данного изобретения могут вводиться либо в качестве основной терапии, либо, в предпочтительных схемах, в качестве адъювантной (дополнительной) терапии в соединении с хирургией или другими лекарственными средствами.

В контексте терапии мы обнаружили, что препараты антител, которые являются чистыми в отношении нековалентно связанных тяжелых и легких цепей антител, обеспечивают преимущества в сравнении с препаратами, содержащими антитела, в которых эти цепи связаны вместе через цистиновые связи. Четвертым аспектом данного изобретения является терапевтическое использование препарата антител, в частности препарата Fab, в котором цистиновые остатки, связывающие цепи вместе, были заменены аминокислотой, не позволяющей образование дисульфидных связей, например серином. Наиболее предпочтительными специфическими антителами для этого аспекта изобретения были в момент заявления приоритета C 242 mab (Lindholm et al., WO9301302) и 5T4 mab, как описано в цитированных выше ссылках. В предпочтительных вариантах одна из цепей антитела слита с суперантигеном, который способен активировать субпопуляцию Т-клеток V β -специфическим образом, как описано выше. Суперантиген может быть антигеном дикого типа, химерой или вариантом с точковой мутацией (и их комбинациями), описанными выше или Dohlsten et al., WO9201470 и Abrahmsen et al., WO9601650. Этот аспект изобретения включает также фармацевтические композиции, описанные выше, но содержащие препарат антител, описанных в данном

аспекте изобретения, вместо химерного суперантигена.

В момент заявления приоритета было предпочтительно использовать фрагмент Fab антитела 5T4 (Stem et al., WO8907947) в сочетании с химерой SEE/A-A с мутацией D227A. Предпочтительный фрагмент Fab был мутирован в обеих цепях в положении, обеспечивающем межцепочечные дисульфидные связи (Ser вместо Cys). Для увеличения выхода слитого с антителом белка при продуцировании его в *E. coli*, мутации также проводили в V κ -цепи при определенных положениях. См. экспериментальную часть.

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

Конструирование химерных генов SEA/SEE

Конструирование химер SEA/SEE выполняли с использованием способа на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), перекрывающегося удлинения последовательности (Horton et al.). ПЦР проводили cU1Tma (Perkin-Elmer) в соответствии с рекомендациями изготовителей. Продуцируемые ПЦР фрагменты клонировали в PCR-script (Stratagene, USA) и секвенировали для проверки правильности последовательности. Затем химерные гены суперантигенов субклонировали в экспрессирующий вектор рКР889 (Abrahmsen et al., 1995), соединяя эти конструкции SE с частью тяжелой цепи с фрагментом Fab мышинового моноклонального антитела C215. Рекомбинантные слитые белки SEA и SEE получали в виде полноразмерных полипептидов в соответствии с консенсусной последовательностью для отщепления сигнального пептида (von Heijne 1986).

Экспрессия и очистка белка

Штамм UL635 *Escherichia coli* K 12 использовали для экспрессии слитых белков Fab-SE и мутантов SEA, описанных ранее (Abrahmsen et al., 1995). Слитые белки Fab-SE собирали центрифугированием при 5000 g и фракции супернатанта подвергали очистке на Протеин G-Сепарозе (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), как описано ранее (Abrahmsen et al., 1995). Чистота аффинно очищенных вариантов Fab-SE была >90% при анализе с применением электрофореза в ДСН-ПААГ.

Клетки

Линию клеток В-клеточной лимфомы человека Raji и карциномы ободочной кишки человека Colo 205 культивировали в полной R-среде (среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco BRL, Life Technologies, Ltd. Paisley Scotland), 1 mM глутамин; HyClone Europe, Ltd. Cramlington, 5 $\cdot$ 10 $^{-5}$ M β -меркаптоэтанол; ICN Biomedicals INC. Costa Mesa CA, 0,1 M NaHCO $_3$; Seromed Biochrome, 1 $\cdot$ 10 $^{-2}$ M Hepes-буфера; HyClone Europe, Ltd. Cramlington, 0,1 мг/мл гентамицина; Biological Industries Kibbutz Beit Haemek Izrael, 1 $\cdot$ 10 $^{-3}$ M пипувата натрия; HyClone Europe, Ltd. Cramlington). Клетки CHO, трансфицированные молекулами C215 и CD80 человека, культивировали в полной R-среде с добавлением 0,5 мг/мл Геницитина (G418) Gibco BRL, Life Technologies, Ltd. Paisley Scotland). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBM) получали из

гепаринизированной крови здоровых доноров. Клетки выделяли центрифугированием в градиенте плотности через Ficoll-Paque, как описано ранее (Dohlstén et al., 1991). Т-лимфоциты человека очищали до гомогенности положительной селекцией с использованием колонок MiniMACS в сочетании с магнитными гранулами, покрытыми моноклональными антителами, специфическими для CD4 и CD8 человека (Miltenyl Biotec GmbH, Germany), в соответствии с инструкциями изготовителей. Реагирующие с SEA и SEE (SEA- и SEE-реактивные) клеточные линии человека получали, как описано ранее (Dohlstén et al., 1994). Экспрессирующую TCR V β 22 клеточную линию человека получали из первично стимулированной реагирующей с SEA клеточной линии при помощи положительного отбора с магнитными гранулами (Dynabeads, Dynal A.S., Norway), покрытыми моноклональными антителами, специфическими для TCR V β 22 (Immunotech, France). Обогащенные клетки содержали >95% TCR V β 22⁺ Т-клеток, как определено проточной цитометрией (данные не показаны). Мышиные Т-клеточные гибридомы (11B3, 2B4 и 11.40) получали, как описано (Fleury et al., 1991).

Тест на цитотоксичность

Цитотоксичность измеряли в стандартном тесте высвобождения ⁵¹Cr после 4 или 6 часов, как описано ранее (Dohlstén et al., 1991). Клетки Colo205 или Raji человека использовали в качестве клеток-мишеней. Эффекторными клетками, SEA- или SEE-реактивными линиями Т-клеток человека или линии TCR V β 22⁺-клеток человека добавляли при отношении эффектора к мишени 30:1. ⁵¹Cr-меченные клетки-мишени использовали в тестах на цитотоксичность при 2500 клеток/200 мл полной среды в лунках микротитрационного планшета с V-дном. Гибриды C215Fab-SEA/E добавляли при различных концентрациях, как указано, и высвобождение ⁵¹Cr измеряли в счетчике Гейгера. Удельную цитотоксичность в процентах рассчитывали как 100х[(экспериментальное высвобождение в имп/мин-фонное высвобождение в имп/мин)/(общее высвобождение в имп/мин-фонное высвобождение в имп/мин)].

Тесты пролиферации лимфоцитов

Для измерения пролиферации 10⁵ Т-клеток-респондеров человека инкубировали при 37°C с 10⁴ облученными (20000 рад) стимулирующими клетками в 200 мл полной среды в 96-луночном микротитрационном планшете с U-дном с различными количествами гибридов C215Fab-SEA/E в течение 72 часов. Пролиферацию оценивали по включению [³H]-тимидина, как описано (Dohlstén et al., 1988).

Анализ индуцированного Fab-SAg продуцирования ИЛ-2

Клетки мышинной гибридомы Т-Т (10⁵) инкубировали в 200 мл полной среды R-среды с химерными белками C215Fab-SEA/E в присутствии 2•10⁴ стимулирующих клеток Raji. После 48 часов супернатанта собирали и анализировали на присутствие мышино-

ИЛ-2. Вкратце, содержание цитокина анализировали с использованием крысиных mAb против мышинового цитокина в качестве связывающих антител. Очищенные крысиные антитела против мышинового ИЛ-2, крысиный ИЛ-2 были приобретены из PharMingen (San Diego, CA). Меченные биотином mAb против цитокина, набор Vectastain ABC (Vector Laboratories, CA) использовали для обнаружения цитокинов. Поглощение определяли в Иммуноридеере (ImmunoReader NJ2000, InterMed Roskilde, Denmark) при 405 или 450 нм.

Мутирование 5T4Fab

Конструирование вектора для экспрессии 5T4Fab-SEA в E. coli

Кодирующие Fv части 5T4 клонировали из гибридомы 5T4, полученной от доктора Петера Стерна (Stern et al., WO8907947). Более подробно: кДНК получали из мРНК, районы целых переменных доменов и части сигнальных последовательностей, а также первый константный домен тяжелой цепи и константный домен легкой цепи амплифицировали при помощи ПЦР. Олигонуклеотиды

5'-CAATTTTCTTGTCCACCTTGGTGC-3' (SEQ ID N 2) и

5'-ACTAGTCGACATGGATGGAGCTTATCATly TCTT-3' (SEQ ID N 3) использовали для тяжелой цепи с получением фрагмента 553 п. н., тогда как олигонуклеотиды

5'-ACTAGTCGACATGGGCITCAAGATGGAGTC ACAkwyuCWGG-3' (SEQ ID N 4) и

5'-GCGCCGTCGTAGAATTAACACTCATTCCTGT TGAA-3' (SEQ ID N 5) использовали для легкой цепи с получением фрагмента 724 п. н. для каждой цепи секвенировали три различных клон и нашли, что они были идентичными. Фрагменты ДНК, пригодные для

встраивания в экспрессирующий вектор (gef), получали во второй стадии ПЦР. Для сборки Fab-экспрессионной плазмиды переменные области 5T4 сливали с последовательностями, кодирующими

константные области, из мышинового IgG1/k антитела C242 mab (Lindholm et al., WO9301302). Район, кодирующий суперантиген, произведенный из стафилококкового энтеротоксина A(SEA), присоединяли после тяжелой цепи.

Подтвержденная последовательность для V κ -цепи каркаса антитела 5T4 представлена в результатах.

Мутагенез 5T4

Семь аминокислотных замен вводили в районы, кодирующие каркас антител. Это были Phe10Ser, Thr45Lys, Ile63Ser, Tyr67Ser, Phe73Leu, Thr77Ser и Leu78Val. Подобным образом, остатки Cys в каждой цепи, участвующие в образовании междоменной дисульфидной связи, были заменены

остатками серина, что приводило к мутации Cys458Ser в тяжелой цепи и Cys214Ser в легкой цепи. Эти мутации вводили при помощи мутагенеза на основе ПЦР и полученную последовательность ДНК подтверждали секвенированием.

Экспрессия в ферменте и очистка 5T4Fab-SEA

Экспрессионная плаزمида содержит ген устойчивости к канамицину и lacUV5-промотор, который может индуцироваться IPTG. Слитые белки очищали из осветленной культуральной среды с

использованием Протеин G-Сефарозы и SP-Сефарозы (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) и переводили в цитратный буфер при помощи Сефадекса G-25 в основном, как описано. Характеристика при помощи электрофореза в ДСН-ПААГ, обратнофазовой ВЖХ (ВЖХ в обращенной фазе) и масс-спектрометрии показала, что очищенный слитый белок имел чистоту 95% и имел правильную молекулярную массу.

РЕЗУЛЬТАТЫ: Модификации суперантигена

Суперантиген-зависимую клеточную цитотоксичность (SDCC) C215Fab/SEA и C215Fab-SEE против MHC класса II⁺-клеток Raji анализировали с применением SEA- и SEE-реактивных Т-клеток человека в качестве эффекторных клеточных линий. Несмотря на различие в V β -специфичности между SEA и SEE оба суперантигена обнаруживали индукцию сравнимой степени цитотоксичности с обеими эффекторными клеточными линиями (фиг. 1). Для различения между эффектами предоставления MHC класса II и прямыми действиями SEA и SEE в узнавании TCR их исследовали в тесте суперантиген-антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (SADCC) против экспрессирующих C215 клеток Colo205. В этом тесте Fab-часть направляет слитый белок к экспрессирующим C215 клеткам-мишеням и приводит к предоставлению слитых молекул SE цитотоксическим Т-клеткам (CTL) независимо от молекул MHC класса II (Dohlsten et al., 1994). Несмотря на > 80% идентичность аминокислотной последовательности между SEA и SEE, взаимодействие с TCR SEA и SEE обнаруживает качественные различия в этом типе теста. Слитый белок C215Fab-SEA сохраняет его способность направлять SEA- и SEE-реактивные CTL против MHC класса II⁺-клеток-мишеней (фиг.1), тогда как C215Fab-SEE не может индуцировать цитотоксичность в отношении MHC класса II⁺-клеток-мишеней ни с SEA⁺, ни с SEE-реактивными CTL (фиг.1).

Ранее сообщалось другими исследователями, что различие в V β -специфичности между SEA и SEE первично связано с различиями в трех аминокислотах в петле, предшествующей спирали α 5, и в спирали α 5 (Irwin et al., 1992, Hudson et al., 1993, Fraser et al., 1993 и Mollick et al., 1993). Различие в отношении взаимодействия с TCR, сообщенное в этом исследовании, не связано с измененной TCR V β -специфичностью, поскольку способность C215Fab-SEA индуцировать MHC класса II-независимую цитотоксичность не ограничивается SEA-реактивными CTL, но также наблюдается с SEE-реактивными CTL.

Анализ гомологии последовательности SEA и SEE (фиг.2) обнаруживает, что неидентичные аминокислотные остатки сконцентрированы в восьми различных районах. Вне этих восьми районов, составляющих до 34% последовательности, идентичность двух SE равна 97%, причем за остальные различия ответственны консервативные аминокислотные замены. Четыре из негомологических районов структурно близки к двум сайтам связывания

MHC класса II (B, D, E и G) и они, по-видимому, не взаимодействуют с TCR (фиг.3). Дополнительные четыре района (A: AA 20-27, C: 60-62, F: 161-176 и H: 200-207) локализованы на конце молекулы (фиг. 3), вблизи сайта связывания TCR, расположенного в канавке между двумя субдоменами (Kappler et al., 1992). Для исследования качественного различия в узнавании TCR между SEA и SEE мы изготовили гибридные белки прививкой районов из SEA и SEE в виде химер одного района (SEE/A-A, -C, -F, H) в виде гибридов двух районов (SEE/a-AH) и прививкой районов, локализованных вблизи сайтов связывания MHC класса II на SEE в SEA (SEA/E-BDEG) (фиг.4). Все эти химерные SE экспрессировались в виде слитых белков с C215Fab для обнаружения различий в отношении их активности в отсутствие MHC класса II.

Гибридные белки SEA/E, слитые с C215Fab-частью, обнаруживают различие в Fab-нацеленных тестах цитотоксичности

SDCC-активность гибридных белков C215Fab-SEE/A против MHC класса II⁺-клеток Raji анализировали с использованием SEA-реактивных Т-клеток человека в качестве эффекторов. Величины EC₅₀ всех гибридов C215Fab-SE, а также C215Fab-SEAwt и -SEEwt (wt=дикого типа) находятся в пределах ошибок (например, 10⁻¹²-10⁻¹¹ М, фиг.5). Единственным детектируемым различием является слегка пониженное плато для гибрида C215Fab-SEE/A-AH, указывающее на потерю Т-клеток. С другой стороны, в SADCC-эксперименте, где цитотоксичность направлена на линию MHC класса II⁺/C215⁺-клеток Colo 205, только гибриды C215Fab-SEE/A-A, C215Fab-SEE/A-AH и C215Fab-SEE/E-BDEG индуцировали цитотоксичность, сравнимую с цитотоксичностью C215Fab-SEAwt (фиг.5). Гибрид C215Fab-SEE/A-F способен индуцировать C215-направленную цитотоксичность при более высоких концентрациях (EC₅₀>10⁻¹⁰ М). Хотя гибрид C215Fab-SEE/A-AH способен индуцировать C215-направленную цитотоксичность с такой же EC₅₀, что и C215Fab-SEAwt (например, EC₅₀ 10⁻¹³ М), абсолютный уровень цитотоксичности значительно уменьшается (фиг.5). Это различие могло бы быть следствием ограниченной V β -специфичности C215Fab-SEE/A-AH, хотя способность индуцировать C215-направленную цитотоксичность преобладает в отвечающей субпопуляции Т-клеток. Для дальнейшего исследования этой идеи мы приготовили V β 22-олигоклональную линию CTL человека. V β 22 человека аналогичны V β 3 мышей в том отношении, что они представляют собой семейство V β , специфическое для SEA и неспецифическое для SEE. Ранее было показано (Mollick et al., 1993), что основной вклад V β SEA и SEE первично связан с различием в трех аминокислотах между SEA и SEE в районе H (AA 200-207). В SDCC-тестах против MHC класса II⁺-клеток Raji (мишеней) с использованием V β 22-олигоклональной линии CTL в качестве эффекторов только гибриды, содержащие

район SEA-H, способны давать C215Fab-SEAwт-подобную ответную реакцию (например, C215Fab-SEE/A-H, C215Fab-SEE/-AH и C215Fab-SEA/E-BDEG, фиг.6). Гибрид C215Fab-SEA/A-A, который способен индуцировать полный SDCC-ответ со всеми популяциями CTL в качестве эффекторов, в этом тесте сильно понижен как в отношении полумаксимальной концентрации, так и в отношении плато (фиг.6). Когда цитотоксичность V β 22 CTL направлена на линию MHC класса II*/C215⁺-клеток Colo 205, только гибриды, содержащие как SEA-A, так и SEA-H (например, C215Fab-SEE/A-AH и C215Fab-SEE/E-BDEG) районы, способны индуцировать цитотоксический ответ, сравнимый с ответом, индуцируемым C215Fab-SEAwт (фиг.6). Гибрид, содержащий только район A SEA (C215 Fab-SEE/A-A), индуцирует более низкий уровень цитотоксичности со сравнимой величиной ЕС₅₀. Это указывает на то, что оставшаяся активность, наблюдаемая с гибридом C215Fab-SEE/A-AH, в тесте SADCC с популяцией целых Т-клеток в качестве эффекторов не является следствием индуцированного гибридом ответа в рестриктированной популяции Т-клеток. Более вероятным объяснением этого наблюдения является то, что способность индуцировать SADCC-ответ гибридных белков C215Fab SE первично связана с районом SEA-A и с меньшим вкладом со стороны районов SEA-H и -F. Нет доказательства, что это качество ограничивается только какой-либо субпопуляцией Т-клеток в объединенной SEA-SEE-отвечающей популяции Т-клеток, так как гибрид C215Fab-SEA способен индуцировать тот же самый ответ с SEE-реактивными CTL, и гибрид C215Fab-SEE/A-A способен полностью воспроизводить ответ, наблюдаемый с C215Fab-SEA.

Гибридные белки SEA/E, слитые с C215Fab-частью, обнаруживают различие в Fab-нацеленных тестах пролиферации

Ранее было показано, что очищенные покоящиеся Т-клетки человека индуцируются в отношении пролиферации при предоставлении C215Fab-SEA на линии MHC класса II*/C215/CD80⁺-клеток (Lando et al., 1993). Однако способность C215Fab-SEA индуцировать MHC II*-независимую пролиферацию заметно уменьшается с C215FabSEE (Таблица 1). Для исследования, связано ли это различие в качестве также с районом A SEA, как это наблюдали в SADCC-тестах, мы исследовали пролиферативную активность гибридов C215Fab-SE, предоставляемых либо CHO-DR1⁺/CD80⁺, либо CHO-C215⁺/CB80⁺ трансфицированными клеточными линиями, на очищенных покоящихся Т-клетках человека. При предоставлении конъюгатов Fab-SE на CHO-DR1⁺/CD80⁺ не было различий между различными белками SE (данные не показаны). Однако прививки районов A, C и H SEA в SEE усиливает пролиферативную активность по сравнению с C215Fab-SEE. Наилучшие результаты были получены путем прививки районов A и H SEA, что указывает

на важную роль района A, как это наблюдали для MHC класса II-независимой цитотоксичности. Возможно, что при применении негативной селекции различия между Fab-SEA и -SEE были более значительными.

V β -специфичность SE-гибридов

Для дальнейшего исследования, связаны ли гибридные слитые белки C215Fab-SEA/SEE с определенной V β -специфичностью, мы использовали SEA-реактивные мышинные Т-клеточные гибридомы, экспрессирующие V β 1, V β 3 и V β 11. Из полученных данных очевидно, что все исследованные районы, прямо или опосредованно, влияют на взаимодействие с TCR. При прививке районов C и F SEA в C215Fab-SEE активность в отношении SEA- и SEE-перекрестно реактивной V β 1-гибридомы I1B3 уничтожается. Те же самые химеры, по-видимому, не влияют или оказывают небольшое влияние на активность V β 3- и V β 11-гибридом (2.B4 и 11.40) по сравнению с C215Fab-SEE. При прививке района A SEA в C215Fab-SEE активность в отношении V β 3 (2.B4) увеличивается по меньшей мере в 10 раз в сравнении с C215Fab-SEE. Более заметно выраженные эффекты наблюдаются с той же клеточной линией при прививке района H SEA в C215Fab-SEE. Этот более сильный эффект в отношении влияния района H SEA на V β 3-специфичность отмечался также в более ранних исследованиях (Mollick et al., 1993). Однако та же самая химера (C215Fab-SEE/A-H), по-видимому, уменьшает активность в отношении SEA/SEE-перекрестно реактивных V β 1- и V β 11-гибридом (I1B3 и 11.40) в 10 раз. В заключение можно отметить, что взаимодействие с SEA с TCR, по-видимому, включает в себя все вариabельные районы A, C, F и H SEA-SEE.

Серореактивность

Серореактивность в пробах сывороток человека в отношении химерных SE исследовали как в объединенных пробах из различных частей света, так и в индивидуальных пробах сывороток. Путем прививки обоих районов A и H SEA в SEE мы получили промежуточную серореактивность (фиг.8). Сходную серореактивность наблюдали также против химеры C215Fab-SEE/A. Однако отдельные прививки района A SEA (C215Fab-SEE/A-A) дали C215Fab-SEE-подобную серореактивность, что свидетельствует о том, что за SEA-АН ответственен район H SEA. Это указывает на то, что район H SEA является доминирующим антигенным эпитопом в SEA. Серореактивность объединенных проб сывороток из других частей света (Японии и США), а также 14 отдельных проб из Швеции подтверждает один и тот же общий характер результатов (не показано).

РЕЗУЛЬТАТЫ: Мутации Fab-части слитых белков

Экспрессия конструкций 5T4FabSEA

Было обнаружено, что уровень продуцирования 5T4Fab-SEA в E. coli в ферменте значительно ниже, чем в других конструкциях Fab-суперантиген, исследованных в нашей лаборатории. Поэтому были введены два типа

модификаций для увеличения уровня продуцирования. Во-первых, были введены семь различных точковых мутаций в каркасную область легкой цепи. Это были Phe10Ser, Thr45Lys, Ile63Ser, Tyr67Ser, Phe73Leu, Thr77Ser и Leu78Val. Во-вторых, остатки цистеина, образующие дисульфидную связь, соединяющую тяжелую и легкую цепи, были заменены остатками серина. Последняя модификация привела к трехкратному увеличению, а 7 точковых мутаций привели к дополнительному 12-кратному увеличению уровня продуцирования. Кроме значительно увеличенного уровня продуцирования, удаление дисульфидной связи также привело к получению более гомогенного продукта, поскольку исключена возможность реакции реакционноспособных тиоловых групп с другими содержащими тиол агентами.

Модифицированную молекулу 5T4 проверяли на сродство с ее антигеном, а также на биологическую активность в SADCC-тестах. В этих тестах не смогли обнаружить различий между мутантной формой и формой дикого типа.

Мутацию Cys/Ser получали также в тяжелых и легких цепях фрагментов Fab нескольких других моноклональных антител. Продукты становились гомогенными и полностью сохраняли их способность связывания антигена.

Последовательность района каркасной области антитела для Vk-цепи 5T4:

DAVMTQTPTF LLVSAGDRVTITCKASQSVS NDVAMVQQKP
GQSPILLISY 50
TSSRYAGVPD RFIGSGYGTID FTITISILQA EDLAVYFCOO
DYNSPFTFGG 100 GTKLEIK (SEQ ID N6)

Подчеркнутые последовательности являются CDR. Положения, выделенные точкой, были мутированы: Phe10Ser, Thr45Lys, Ile63Ser, Ile63Thr, Tyr67Ser, Phe73Leu, Thr77Ser и Leu78Val.

Таблица 1. (см. в конце текста).

Подписи к фигурам

Фиг. 1. MHC класса II-зависимая и -независимая цитотоксичность с SEE- и SEA-CTL человека

MHC класса II-зависимая клеточная цитотоксичность (A и B) и C215-зависимая клеточная цитотоксичность (C и D) с молекулами C215Fab-SEA (■) и C215Fab-SEE (◇) в качестве эффекторных молекул.

Цитотоксичность анализировали в стандартном 4-часовом тесте высвобождения ⁵¹Cr с использованием SEE-реактивной линии Т-клеток человека (A и C) и SEA- реактивной линии Т-клеток человека (B и D). Клеточными линиями-мишенями были MHC класса II⁺-клеток Raji (A и B) и MHC класса II⁺/C215⁺-клеток Colo 205 (C и D). Представлены данные из отдельных тестов, которые представляют два (A и C) - пять (B и D) независимых экспериментов.

Фиг.2. Анализ гомологии первичной структуры SEA и SEE

Вариабельные районы SEA/SEE вблизи сайта связывания TCR (A, C, F и H) и вариабельные районы вблизи двух сайтов связывания MHC класса II.

Фиг.3. Эскиз модели SEA

Модель (Molscript model, Kraulis, 1991) кристалла SEA (Schad et al., 1995). Вариабельные районы SEA/SEE вблизи сайта связывания TCR (A, C, F и H) и вариабельные районы вблизи двух сайтов связывания MHC класса II. Ион цинка в виде круглого шарика.

Фиг.4. Схематическое представление химерных молекул SE

Отрезки последовательности SEA понижены. Вариабельные районы SEA/SEE обозначены A, B, C, D, F, G и H.

Фиг. 5. MHC класса II-зависимая и -независимая цитотоксичность с SEA-CTL человека

(A) MHC класса II-зависимая клеточная цитотоксичность и (B) C215-зависимая клеточная цитотоксичность C215Fab-SEE/A-A (◇), C215Fab-SEE/A-C (□),

C215Fab-SEE/A-F (◇), C215Fab-SEE/A-H

(●), C215Fab-SEE/A-AH (Δ) и C215Fab-SEA/E-BDEG (O). Цитотоксичность анализировали в стандартном 4-часовом тесте высвобождения ⁵¹Cr с использованием SEA- реактивной линии Т-клеток человека. Клеточными линиями-мишенями были MHC класса II⁺-клеток Raji (A) и MHC класса II⁺/C215⁺-клеток Colo 205 (B). Представлены данные из отдельных тестов, которые представляют пять независимых экспериментов.

Фиг. 6. MHC класса II-зависимая и -независимая цитотоксичность с V β⁺CTL человека

(A) MHC класса II-зависимая клеточная цитотоксичность и (B) C215-зависимая клеточная цитотоксичность C215Fab-SEA (■), C215Fab-SEE (◇), C215Fab-SEE/A-A

(◇), C215Fab-SEE/A-C (□),

C215Fab-SEE/A-F (◇), C215Fab-SEE/A-H

(●), C215Fab-SEE/A-AH (Δ) и C215Fab-SEA/E-BDEG (O) в качестве эффекторных молекул. Цитотоксичность анализировали в стандартном 4-часовом

тесте высвобождения ⁵¹Cr с использованием Vβ22-отобранной SEA- реактивной линии Т-клеток человека. Клеточными

линиями-мишенями были MHC класса II⁺-клеток Raji (A) и MHC класса II⁺/C215⁺-клеток Colo 205 (B). Представлены данные из отдельных тестов, которые представляют два независимых эксперимента.

Фиг. 7. MHC класса II-зависимая и -независимая пролиферация (не представленная в приоритетных заявках)

Действие гибридов Fab-SE на MHC класса II-зависимую (A) и -независимую (B) пролиферацию Т-клеток. Очищенные Т-клетки человека стимулировали в течение 96 часов C215Fab-SEA (■), C215Fab-SEE (◇),

C215Fab-SEE/A-A (◇),

C215Fab-SEE/A-C (□), C215Fab-SEE/A-F (◇), C215Fab-SEE/A-H (●),

C215Fab-SEE/A-AH (Δ) и C215Fab-SEA/E-BDEG (O) представленными на МНС класса II⁺/C215⁺CHO-DR4/C215-трансфектантах (A) и МНС класса II⁻/C215⁺CHO-CD80/C215- трансфектантах (B). После 72 часов клетки импульсно-метили [3H]-тимидином в течение 24 часов и включенную метку измеряли и представляли в виде полумаксимальной концентрации (EC₅₀). Представлены данные из отдельных тестов, которые представляют два независимых эксперимента.

Фиг.8. Серореактивность в пуле Ig человека

Пул из >5000 сывороток из здоровых доноров в Южной Европе против слитых белков. Серийно разведенному Ig человека давали взаимодействовать в течение 1 часа при комнатной температуре с C215Fab-SEAwt, C215Fab-SEEwt, C215Fab-SEE/A-A, C215Fab-SEE/A-H и C215Fab-SEE/A-AH, иммобилизованными на микротитрационных планшетах при концентрации 1 нг/лунку. Коррекцию на связывание с сывороточными белками делали вычитанием OD-величины для C215Fab в каждой точке. Каждая точка представляет собой среднее из двух повторностей (двух проб). Дальнейшие детали см. в Материалах и способах.

Таблица 1. Очищенные Т-клетки человека стимулировали в течение 96 часов соответствующими C242Fab-SE, представленными на МНС класса II-негативных CHO-CD80/C215-трансфектантах. После 72 часов клетки импульсно-метили ³H-тимидином в течение 24 часов и включенную метку измеряли и представляли в виде полумаксимальной концентрации (EC₅₀).

Таблица 2. Мышиные Т-клеточные гибридомы стимулировали в течение 48 часов или химерным Fab-конъюгированным суперантигеном. Активность измеряли в виде продуцирования ИЛ-2 и представляли в виде полумаксимальной концентрации (EC₅₀).

Работа в течение года приоритета

В попытке сведения к минимуму токсичности слитого белка (суперантиген-антитело) C215Fab-SEE/A-A химеру SEE/A-A мутировали в сайтах связывания Класса II, как описано в WO9601650 и сливали с C215Fab. Были получены конструкции C215Fab-SEE/A-A-D227A, C215Fab-SEE/A-A-F47A/D227A, C215Fab-SEE/A-A-H187A/D227A, C215Fab-SEE/A-A-W130A/D227A, C215Fab-SEE/A-A-D70A/D227A, C215Fab-SEE/A-A-N50S/D227A, C215Fab-SEE/A-A-N50S/D70A/D227A, C215Fab-SEE/A-A F47Y/D227A и C215Fab-SEE/A-A-D70R/D227A. Все слитые белки испытывали на способность индуцировать пролиферацию PBMC человека

для индентификации мутантов, имеющих пониженную активность по сравнению с C215Fab-SEE/A-A-D227A. Пониженную пролиферативную активность наблюдали для C215Fab-SEE/A-A-F47A/D227A, C215Fab-SEE/A-A-F47Y/D227A, и C215Fab-SEE/A-A-D70R/D227A. Некоторые из химерных слитых белков испытывали также на титр антител в нормальной сыворотке человека (C215Fab-SEE/A-A-D227A, C215Fab-SEE/A-A-D70A/D227A и C215Fab-SEE/A-A-D70R/D227A). Проводили сравнение с C215Fab-SEA-D227A и C215Fab-SEE-D227A. Относительно C215Fab-SEA-D227A титр был гораздо ниже для каждой испытанной химеры. Относительно C215Fab-SEE-D227A титр был слегка выше для каждой химеры.

Это означает замены в положениях, соответствующих одной или нескольким, предпочтительно двум, из положений 47, 50, 70, 130, 187, 227, согласно нумерации в SEQ ID N 7 и 8 на фиг.2.

Поскольку многие различные варианты и изменения могут быть сделаны в объеме описанной здесь концепции изобретения и поскольку могут быть сделаны модификации в описанных здесь подробно вариантах в соответствии с предусмотренными требованиями закона к формуле изобретения, должно быть понятно, что описанные здесь детали должны интерпретироваться как иллюстративные, а не как ограничительные.

Формула изобретения:

1. Конъюгат, обладающий способностью активировать иммунную систему и имеющий формулу

T-B-SA(m),

где Т представляет собой Fab-фрагмент антитела, направленного на специфический раковый антиген;

В представляет собой ковалентную мостиковую связь;

SA(m) представляет собой мутированный стафилококковый энтеротоксин E(SEE), в котором в регионе А заменен, по крайней мере, один аминокислотный остаток в положении 20, 21, 24 и 27 на аминокислотный остаток в соответствующем положении стафилококкового энтеротоксина A(SEA), как указано на фиг. 2.

2. Конъюгат по п.1, в котором указанные аминокислотные замены представляют собой следующие аминокислотные замены: R20G, N21T, S24G и R27K.

3. Конъюгат по п. 1 или 2, который дополнительно содержит замещение аминокислотного остатка в положении 227.

4. Конъюгат по п.3, в котором произведена замена аминокислотного остатка D227A.

5. Фармацевтическая композиция, предназначенная для активации иммунной системы, включающая эффективное количество конъюгата по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.

Список литературы

Abrahmsén L et al (1995) Characterization of two distinct MHC Class II binding sites in the superantigen staphylococcal enterotoxin A. EMBO J 14:2978-86.

Abrahmsén et al (1996) WO9601650 (patent application). A conjugate between a modified superantigen and a target-seeking compound and the use of the conjugate.

Antonsson P et al (1996) Staphylococcal enterotoxin A and E chimera with reduced seroreactivity and retained ability to target cytotoxic T cells for use in tumor therapy. ABRF '96: Biomolecular Techniques, Holiday Inn Golden Gateway, San Francisco, California. March 30-April 2, 1996.

Dohlsten et al (1988) Two subsets of human peripheral blood CD4+ T helper cells differing in the capacity to produce IL-2 and interferon-gamma can be defined by the Leu-18 and UCHL1 monoclonal antibodies. Eur J Immunol 18:1173-1178.

Blanco et al (1990) Mutants of staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1: Mitogenicity and recognition by a neutralizing monoclonal antibody. Infect. Immun. 58 (1990) 3020-3028.

Dohlsten M et al (1994) Monoclonal antibody-superantigen fusion proteins: Tumor specific agents for T cell based tumor therapy. Proc Natl Acad Sci USA 91:8945-8949.

Dohlsten M et al (1991) Monoclonal antibody-targeted superantigens: A different class of anti-tumor agents. Proc Natl Acad Sci USA 88:9287-9291.

RU 2198895 C2

RU 2198895 C2

Dohlsten et al (1992) WO9201470 (patent application). Target specific antibody -superantigen conjugates and their preparation.

Fleury S et al (1991) Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: class II antigens. Cell 66:1037-49.

Fraser JD et al (1993) Structural model of Staphylococcal enterotoxin A interactions with MHC class II antigens. In: Huber, BT Palmer, E (eds) Current Communications in Cell and Molecular Biology 7. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp 7-29.

Grossman et al (1991) Mutation of the disulfide loop in staphylococcal enterotoxin A. Consequences for T cell recognition. J Immunol 147:3274-3281.

Hartwig UF et al (1993) Mutations affecting MHC class II binding of the superantigen streptococcal erythrogenic toxin A. Int. Immunol. 5 (8) 869-875.

Horton RM et al (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. Biotechniques 8:528-535

Hudson et al (1993) Two adjacent residues in staphylococcal enterotoxins A and E determine T cell receptor V beta specificity. J Exp Med 177:175-184.

Hufnagle WO et al (1991) The carboxyl-terminal region of staphylococcal enterotoxin type A is required for a fully active molecule. Infect Immun 59:2126-2134.

Irwin MJ et al (1992) Enterotoxin residues determining T-cell receptor Vb binding specificity. Nature 359:841-3

- Kalland et al (1991) WO 9104053 (patent application).
Pharmaceutical composition that makes cells expressing MHC Class II antigens targets for cytotoxic cells.
- Kappler JW et al (1992) Mutations defining functional regions of the superantigen staphylococcal enterotoxin B. J Exp Med 175:387-396
- Kappler et al (1993) WO9314634 (patent application). Protective effects of mutated superantigens.
- Kotzin BL et al (1993) Superantigens and their potential role in human disease. Adv Immunol 54:99-166.
- Kraulis PJ (1991) MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. J Appl Cryst 24:946-950.
- Lamphear JG et al (1996) Residues near the amino and carboxy termini of staphylococcal enterotoxin E independently mediate TCRV β -specific interactions. J Immunol 156: 2178-2185 (March 15, 1996)
- Lando PA et al (1993) Co-stimulation with B7 and targeted superantigen is required for MHC class II-independent T-cell proliferation but not cytotoxicity. Immunology 80: 236-241.
- Lindholm et al (1993) 9301302 (patent application). Tumor, carbohydrate antigen specific monoclonal antibody and cell line.
- Mollick JA et al (1993) Localization of a site on bacterial superantigens that determines T cell receptor beta chain specificity. J Exp Med 177:283-293.
- Newall et al (1991) In vivo T-cell activation by staphylococcal enterotoxin B prevents outgrowth of a malignant tumor. Proc Natl Acad Sci USA 88 1074-1078

Schad EM et al (1995) Crystal structure of the superantigen, Staphylococcal enterotoxin type A. EMBO J 14:3292-3301

Stern et al (1989) WO8907947 (patent application). Improvements relating to anigens.

Terman et al (1991) WO9110680 (patent application). Tumor killing effects of enterotoxins and related compounds.

Terman et al (1993) WO9324136 (patent application). Tumor killing effects of enterotoxins and related compounds.

von Heijne, G (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucleic Acid Res, 14, 1483-1490.

RU 2198895 C2

RU 2198895 C2

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 3 аминокислоты
- (B) ТИП: аминокислота
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 1:

Gly Gly Pro
1

(3) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 24 п. н.
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 2:

CAATTTTCTT GTCCACCTTG GTGC

(4) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 35 п. н.
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 3:

ASTAGTCSGAC ATGGATGGAG CTITATCATI YTCTT

RU 2198895 C2

RU 2198895 C2

(5) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 41 п. н.
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 4:

АСТАГТСГАС АТГГГСІТСА АГАТГГАГТС АСАКWYUCWG G

(6) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА 34 п. н.
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 5:

GCGCCGTCTA GAATTAACAC TCATTCCTGT TGAA

(7) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 6:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 107 аминокислот
- (B) ТИП: аминокислота
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 6:

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

Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Thr	Leu	Gln	Ala
				75					80
Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln
				85					90
Asp	Tyr	Asn	Ser	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly
				95					100
Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys			
				105					

(8) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 233 аминокислоты

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(x) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 7:

Ser	Glu	Lys	Ser	Glu	Glu	Ile	Asn	Glu	Lys	Asp	Leu
				5					10		
Arg	Lys	Lys	Ser	Glu	Leu	Gln	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly
		15					20				
Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Lys	Ala
25					30					35	
Lys	Thr	Glu	Asn	Lys	Glu	Ser	His	Asp	Gln	Phe	Leu
			40					45			
Gln	His	Thr	Ile	Leu	Phe	Lys	Gly	Phe	Phe	Thr	Asp
	50					55					60

RU 2198895 C2

RU 2198895 C2

(9) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 238 аминокислоты

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(x) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 8:

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

RU 2198895 C2

RU 2198895 C2

RU 2198895 C2

Gly	Lys	Gln 135	Thr	Thr	Val	Pro	Ile 140	Asp	Lys	Val	Lys
Thr 145	Ser	Lys	Lys	Glu	Val 150	Thr	Val	Gln	Glu	Leu 155	Asp
Leu	Gln	Ala	Arg 160	His	Tyr	Leu	His	Gly 165	Lys	Phe	Gly
Leu	Tyr 170	Asn	Ser	Asp	Ser	Phe 175	Gly	Gly	Lys	Val	Gln 180
Arg	Gly	Leu	Ile	Val 185	Phe	His	Ser	Ser	Glu 190	Gly	Ser
Thr	Val	Ser 195	Tyr	Asp	Leu	Phe	Asp 200	Ala	Gln	Gly	Gln
Tyr 205	Pro	Asp	Thr	Leu	Leu 210	Arg	Ile	Tyr	Arg	Asp 215	Asn
Lys	Thr	Ile	Asn 220	Ser	Glu	Asn	Leu	His 225	Ile	Asp	Leu
Tyr	Leu 230	Tyr	Thr	Thr							

RU 2198895 C2

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(2) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 3 аминокислоты
- (B) ТИП: аминокислота
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 1:

Gly Gly Pro
1

(3) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 24 п. н.
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 2:

CAATTTTCTT GTCCACCTTG GTGC

(4) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 35 п. н.
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 3:

ASTAGTCCGAC ATGGATGGAG CTCTATCATI YTCTT

RU 2198895 C2

RU 2198895 C2

(5) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 41 п. н.
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 4:

АСТАГТСГАС АТGGGСІТСА АGATGGAGTC АСАKWYUCWG C

(6) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА 34 п. н.
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) КОЛИЧЕСТВО ЦЕПЕЙ: одна
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 5:

СGСGCGTCTA GAATTAACAC TCATTCCTGT TGAА

(7) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 6:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 107 аминокислот
- (B) ТИП: аминокислота
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 6:

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

Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Thr	Leu	Gln	Ala
				75					80
Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln
				85					90
Asp	Tyr	Asn	Ser	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly
				95					100
Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys			
				105					

(8) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 233 аминокислоты

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(x) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 7:

Ser	Glu	Lys	Ser	Glu	Glu	Ile	Asn	Glu	Lys	Asp	Leu
				5					10		
Arg	Lys	Lys	Ser	Glu	Leu	Gln	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly
		15					20				
Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Lys	Ala
25					30					35	
Lys	Thr	Glu	Asn	Lys	Glu	Ser	His	Asp	Gln	Phe	Leu
			40					45			
Gln	His	Thr	Ile	Leu	Phe	Lys	Gly	Phe	Phe	Thr	Asp
	50					55					60

RU 2198895 C2

RU 2198895 C2

(9) ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ SEQ ID № 8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 233 аминокислоты

(B) ТИП: аминокислота

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(x) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 8:

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

RU 2198895 C2

RU 2198895 C2

RU 2198895 C2

Gly	Lys	Gln 135	Thr	Thr	Val	Pro	Ile 140	Asp	Lys	Val	Lys
Thr 145	Ser	Lys	Lys	Glu	Val 150	Thr	Val	Gln	Glu	Leu 155	Asp
Leu	Gln	Ala	Arg 160	His	Tyr	Leu	His	Gly 165	Lys	Phe	Gly
Leu	Tyr 170	Asn	Ser	Asp	Ser	Phe 175	Gly	Gly	Lys	Val	Gln 180
Arg	Gly	Leu	Ile	Val 185	Phe	His	Ser	Ser	Glu 190	Gly	Ser
Thr	Val	Ser 195	Tyr	Asp	Leu	Phe	Asp 200	Ala	Gln	Gly	Gln
Tyr 205	Pro	Asp	Thr	Leu	Leu 210	Arg	Ile	Tyr	Arg	Asp 215	Asn
Lys	Thr	Ile	Asn 220	Ser	Glu	Asn	Leu	His 225	Ile	Asp	Leu
Tyr	Leu 230	Tyr	Thr	Thr							

RU 2198895 C2

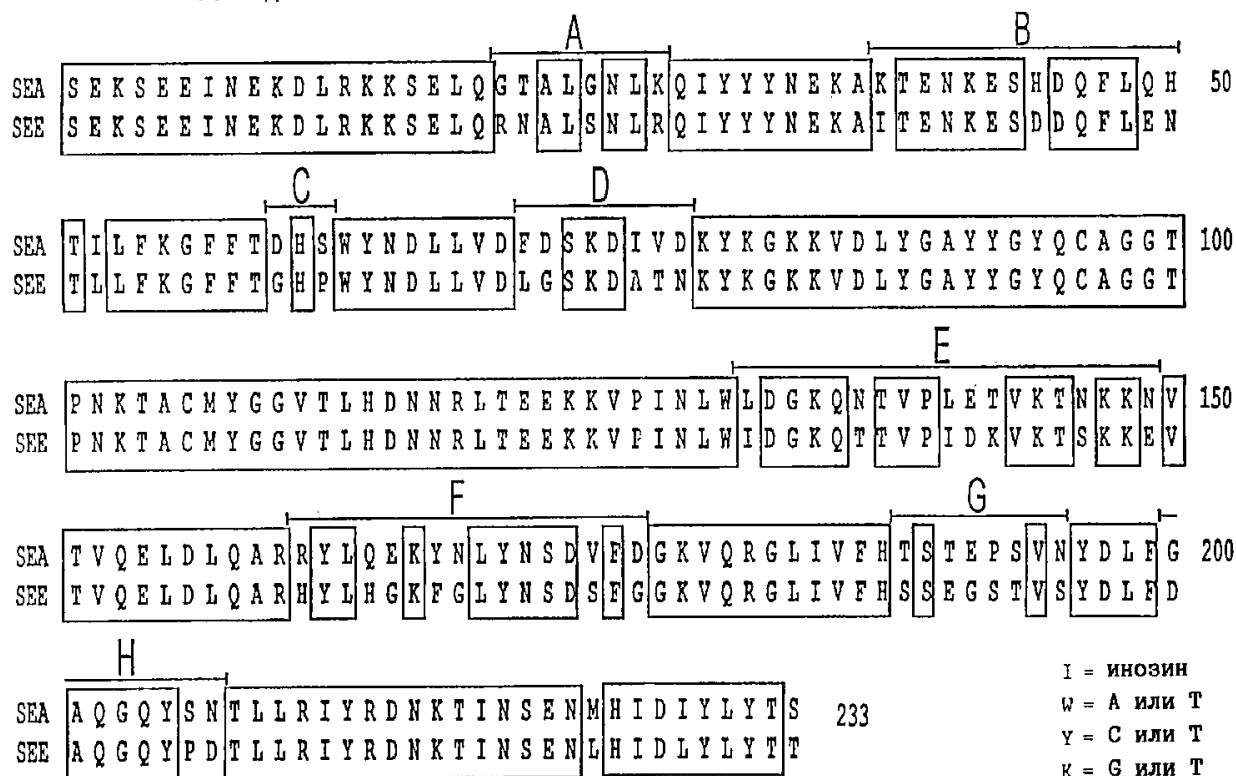
Таблица 1

Пролиферация (EC ₅₀ (пМ))	
C215Fab-SEAwT	2,2
C215Fab-SEEWt	6,9
C215Fab-SEE/A-A	0,9
C215Fab-SEE/A-C	2,8
C215Fab-SEE/A-F	5,7
C215Fab-SEE/A-H	1,0
C215Fab-SEE/A-AH	0,3
C215Fab-SEA/E-BDEG	1,6

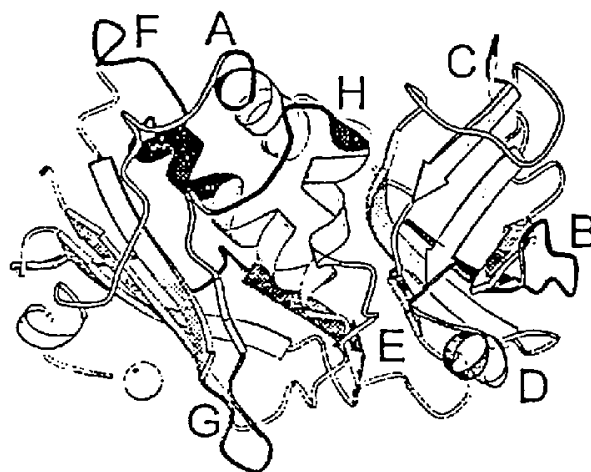
Таблица 2

	I1B3 (MuVβ1) EC ₅₀ (нМ)	2.B4 (MuVβ3) EC ₅₀ (нМ)	11.40 (MuVβ11) EC ₅₀ (нМ)
C215Fab-SEA	10	3	0,05
C215Fab-SEE	10	>1000	0,05
C215Fab-SEE/A-A	10	10	0,05
C215Fab-SEE/A-C	>1000	>1000	0,05
C215Fab-SEE/A-F	>300	>300	0,05
C215Fab-SEE/A-H	100	3	0,3
C215Fab-SEE/A-AH	10	3	0,3

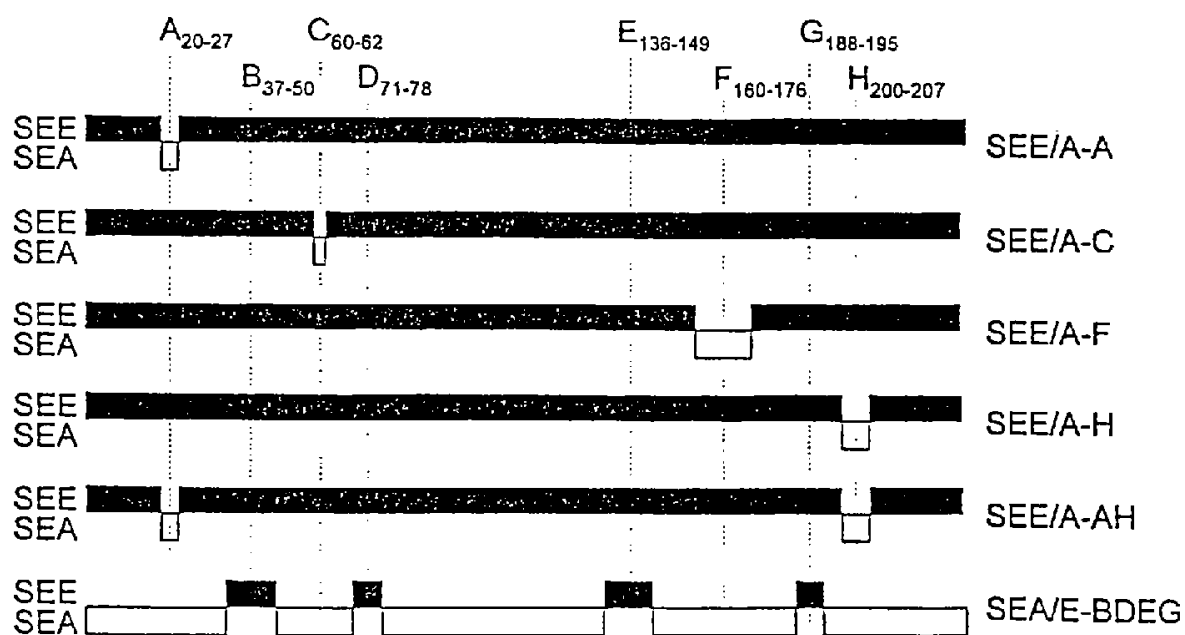
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ID № 7: SEA ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ID № 8: SEE



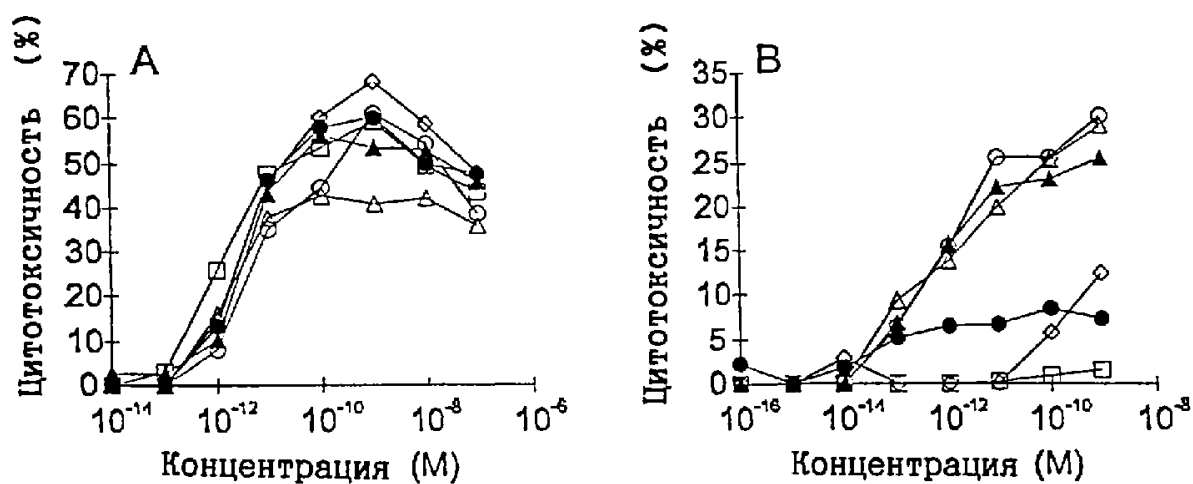
ФИГ. 2



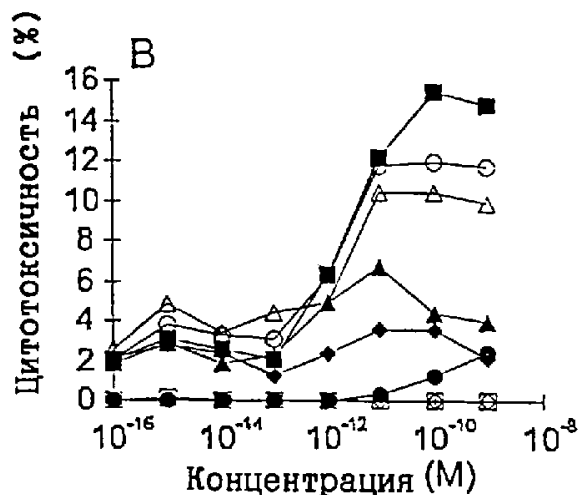
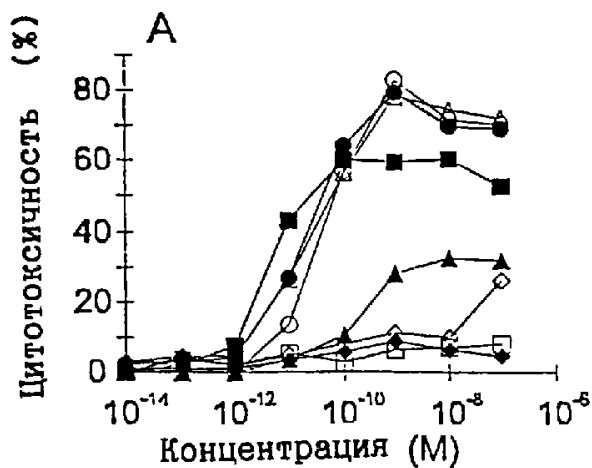
ФИГ. 3



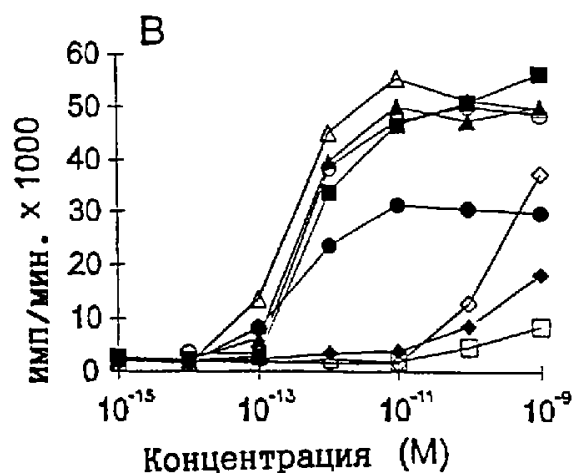
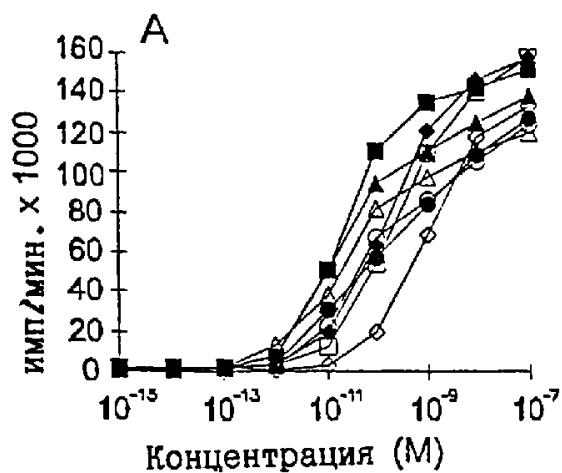
ФИГ. 4



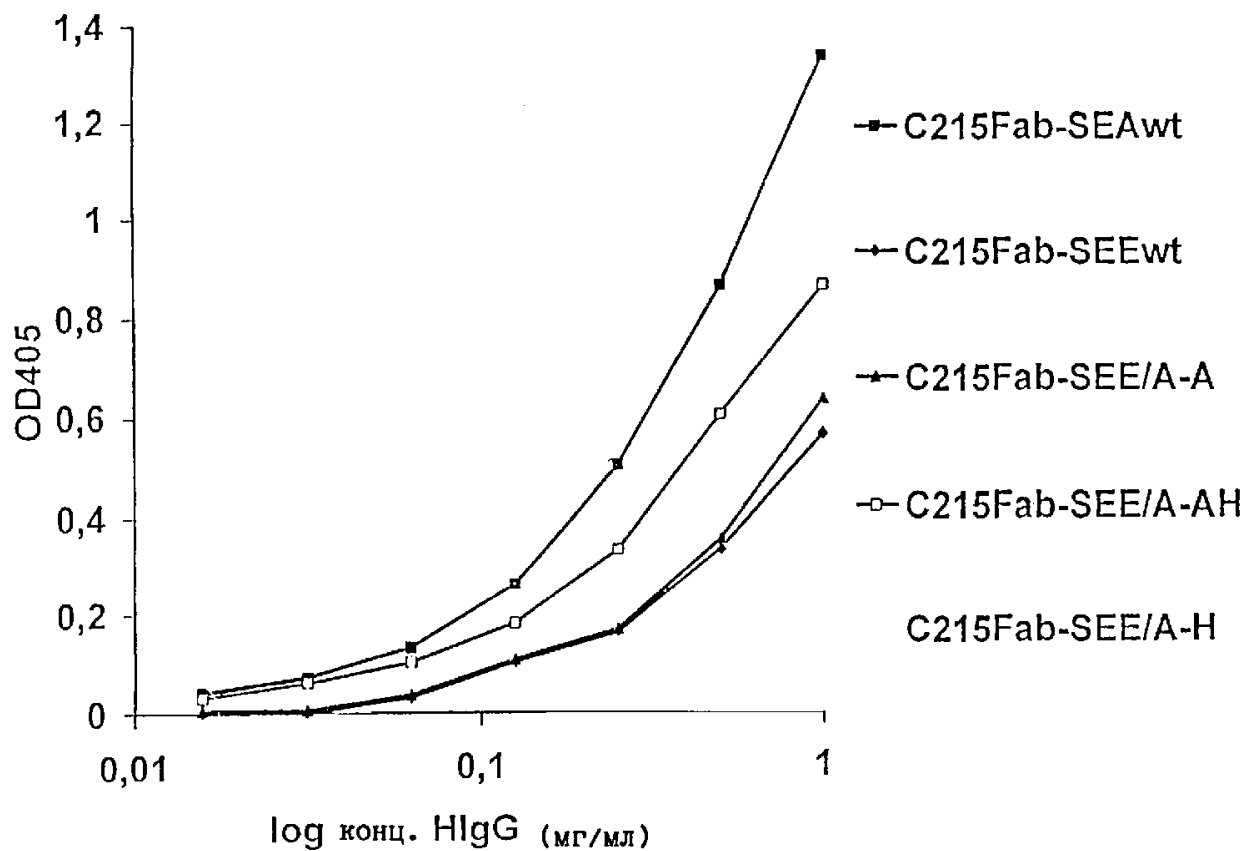
ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8