

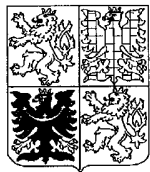
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 228

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02.07.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.07.1997 14.11.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/053211 1997/9704170**

(33) Země priority: **US SE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.03.2001**

(Věstník č. 3/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/04219**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/04820**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 47/48

A 61 P 35/00

A 61 P 37/00

A 61 P 33/00

A 61 P 31/12

(71) Přihlašovatel:

PHARMACIA & UPJOHN AB, Stockholm, SE;

(72) Původce:

Soegaard Morten, Kopenhamn, DK;

Abrahmsen Lars, Bromma, SE;

Lando Peter, Malmo, SE;

Forsberg Göran, Lund, SE;

Kalland Terje, Loddekopinge, SE;

Dohlsten Mikael, Lund, SE;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Řízená cytolyza cílových buněk, činidla a prostředky způsobující cytolyzu a sloučeniny, které mohou být použity pro přípravu takových činidel

(57) Anotace:

Toto řešení obsahuje inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, při kterém jsou dva typy buněk uvedeny do kontaktu se superantigenem (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, kde alespoň jeden ze superantigenů a imunomodulátoru je ve formě konjugátu mezi "volným" superantigenem (SAG) a skupinou zaměřující konjugát na cílové buňky; konjugát obsahující superantigen vzorce I: $(T)_x(SAG)_y(IM)_z$, kde (a) T je specifitu určující skupina, SAG je volný superantigen, IM je imunomodulátor, který je jiný než superantigen a T, SAG a IM jsou na sebe navázány prostřednictvím organických spojovacích skupin B, které mohou být stejné nebo různé ve stejné molekule konjugátu; (b) x, y a z jsou celá čísla, typicky vybraná z 0 - 10, například 0 - 5, a představují počet skupin T, SAG a IM, v příslušném pořadí, v dané molekule konjugátu, s podmínkou, že $y > 0$ a také jeden nebo oba z x a z = 0; konjugát obsahující superantigen je výhodně trojitý fúzní protein. Cílený imunomodulátor, který je konjugátem mezi specifitu určující skupinou (T'') a modifikovaným imunomodulátorem (IM''). Konjugát má vzorec podobný

jako vzorec I s podmínkou, že musí být přítomen modifikovaný imunomodulátor. Může být přítomna superantigenová skupina; DNA molekulu kódující superantigen a imunomodulátor.

Řízená cytolýza cílových buněk, činidla a prostředky způsobující cytolýzu a sloučeniny, které mohou být použity pro přípravu takových činidel

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká inaktivace/cytolýzy cílových buněk, která je způsobena T buňkami aktivovanými funkčními superantigeny. Cytolýza může být použita v terapii a v testech in vitro.

Dosavadní stav techniky

Definice

Superantigeny - podle první definice (přibližně 1988 - 1993) jsou superantigeny bakteriální nebo virové proteiny schopné vazby na MHC antigeny II. třídy bez předchozího intracelulárního zpracování a aktivují T-buňky vazbou na variabilní region V β -řetězce receptoru T-buněk (TCR). Vazba vede k V β -rodinou omezené aktivaci relativně malé části/podsady T buněk a k lýze buněk exprimujících MHC antigeny II. třídy (buňkami zprostředkovaná cytolýza závislá na superantigenu = SDCC). Obvykle superantigen aktivuje podsadu T-buněk, která tvoří přibližně 1-30% celkového počtu T-buněk u jedince.

Dobře známými superantigeny podle výše uvedené definice jsou stafylokokové enterotoxiny (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SED, SEE a SEH). Dalšími příklady jsou toxin syndromu toxického šoku 1 (TSST-1, též stafylokokového původu), exfoliační toxiny (Exfol), streptokokový pyrogenní exotoxin A, B a C (SPE A, B a C), proteiny viru myšího mamárního tumoru (MMTV), streptokokové M proteiny, enterotoxin Clostridium perfringens (CPET),

mykoplasmatické artritické superantigeny a podobně. Pro přehled superantigenů a jejich vlastností viz Kotzin et al., 1993.

Přirozené a chimerické superantigeny byly také mutovány tak, aby měly sníženou nebo žádnou vazbu na MHC třídy II a/nebo TCR (Kappler et al., WO 9314264; Kappler et al., 1993; Blanco et al.; Abrahmsen et al., WO 9601650; Antonsson et al., WO 9736932; Antonsson et al., 1997). Tento typ superantigenů je méně toxický. V případě, že ztratí vazbu na MHC třídy II nebo TCRV β , tak nejsou dále funkčními superantigeny, protože ztratí svou schopnost aktivace T buněk.

Mutací strukturálně podobných přirozených superantigenů je možno připravit chimerické aktivní superantigeny (hybridní superantigeny) (Lamphaer et al., 1996, a Antonsson et al., WO 9736932).

Bylo zjištěno, že aktivace a následná lýza buněk může proběhnout nezávisle na MHC třídy II tehdy, pokud je přirozený superantigen konjugován se skupinou vyhledávající cíl, která je schopna vazby na struktury buněčného povrchu (Dohlsten et al., WO 9201470). Tento nový efektorový mechanismus byl nazván superantigen-protilátka-dependentní buňkami zprostředkovaná cytolýza (= SADCC). Zahrnuje analogické mechanismy pro zaměření skupin jiných než protilátek (Abrahmsen et al., WO 9601650; Antonsson et al., WO 9736932).

V souladu s tím dnešní význam pojmu superantigen zahrnuje jakoukoliv sloučeninu (výhodně polypeptidové struktury), která je schopna bez intracelulárního zpracování vazby na strukturu buněčného povrchu (cílovou strukturu) a na jeden nebo více polymorfních TCR řetězců, zejména na V β řetězec, čímž aktivuje podsadu T-buněk exprimujících specifický TCR řetězec obsažený ve

vazbě. T-buňky se potom stanou cytotoxickými a jejich cytotoxicita je zaměřena na buňky nesoucí povrchové struktury (cílové struktury, cílové buňky). Definice superantigenu (SAG), jak je použita v předkládaném vynálezu (pokud není uvedeno jinak) zahrnuje konjugaty mezi cílovou skupinou a volným superantigenem, jak byly zmíněny výše pro SADCC.

Termín superantigen zahrnuje - pokud není uvedeno jinak - pouze funkční superantigeny.

Volný superantigen (Sag) - je přirozený, volitelně mutovaný nebo jinak modifikovaný superantigen, který není konjugován na cílovou skupinu nebo na imunomodulátor. Schopnost vazby volného superantigenu na MHC třídy II je vlastní vlastností volného superantigenu. Protože volné superantigeny nemají zaměřovací skupiny, způsobují pouze SDCC.

Konjugovaný superantigen - je konjugat mezi volným superantigenem a zaměřovací skupinou nebo imunomodulátorem. Konjugovaný superantigen způsobuje jak SDCC, tak SADCC.

Imunomodulátor (IM) - je sloučenina schopna regulovat imunitní systém. V předkládaném vynálezu jsou superantigeny uváděny samostatně a nejsou zahrnuty termínem imunomodulátor. Imunomodulátor má často vlastní zaměřovací aktivitu, například aktivitu pro příslušný lymfocytární receptor. Pokud není uvedeno jinak, tak je imunomodulátor v nekonjugované formě.

Specificitu určující skupina (T) - je skupina, která je schopna vazby na strukturu buněčného povrchu a/nebo na tkáňovou strukturu.

Konjugat je složen ze dvou nebo více skupin Sag, IM, T atd,

které jsou na sebe navázány kovalentní vazbou.

Rozpustná forma aktivních složek znamená formy, které jsou rozpustné v tělesných kapalinách jako je sérum a plasma.

Nekonjugované přirozené a mutované superantigeny byly navrženy pro terapii s kurativním účinkem, kde pravděpodobným mechanismem účinku je aktivace imunitního systému, buď lokálně v buňkách exprimujících třídu II spojených s léčeným onemocněním, nebo ve smyslu systémové aktivace (Kalland et al., WO 9104053; Terman et al., WO 9110680 a WO 9324136; ANtonsson et al., WO 9736932; a Newell et al., 1991). Vzhledem k extrémní toxicitě přirozených superantigenů v tomto přístupu je při léčbě nádorových onemocnění pouze velmi malá část nádorů vhodná pro tuto terapii.

Také bylo navrženo použití superantigenů konjugovaných se sloučeninami specifickými pro určité cíle (Dohlsten et al., WO 9201470; Abramssen et al., WO 9601650; Antonsson et al., WO 9736932 a Ochi et al., 1993, kde všechny tři přihlášky jsou zde uvedeny jako odkazy).

Ve spojitosti se studiemi týkajícími se prevence superantigeny indukovaného snížení cytotoxické aktivity T-buněk pomocí IL-2 se spekulovalo, že by mohlo být výhodné současné podání IL-2 s nekonjugovanými přirozenými superantigeny a přirozenými superantigeny konjugovanými na protilátky (Belfrage Thesis Augusti/September 1996; Belfrage et al., 1994; Belfrage et al., 1995; Belfrage et al., 1997a; Belfrage et al., 1997b (přirozené superantigeny)).

Obr. 4 v Lando et al., 1996, ukazuje pokus, ve kterém byla analyzována schopnost superantigenu konjugovaného na protilátku samostatně nebo v kombinaci s IL-2 indukovat proliferaci

klidových lidských T-buněk. V tomto 4-denním pokusu byl konjugovaný superantigen přítomen na původních CHO-buňkách a na CHO-buňkách transfektovaných tak, aby exprimovaly MHC třídy II nebo C215 nebo MHC třídy II a C215. Vliv IL-2 byl statisticky nevýznamný.

Kappler et al., (WO 9314634) popisují nekonjugované přirozené SEB mutované tak, aby ztratily vazebnou schopnost na V β nebo MHC třídy II (v souvislosti s vakcínami a činidly pro neutralizaci toxických účinků superantigenů). Abrahmsen et al., (WO 9601650) popisují protinádorovou terapii konjugovanými superantigeny, které mají modifikovanou, výhodně sníženou, schopnost vazby na MHC antigeny třídy II. Antonsson et al. (WO 9736932) popisuje terapii chimerickými superantigeny a superantigeny s redukovanou seroreaktivitou (viz též Abrahmsen et al.). Mutace popsané Abrahmsen et al. (WO 9601650) a Antonsson et al. (WO 9736932) povedou ke vzniku superantigenů se sníženou systémovou toxicitou, sníženou imunogenicitou a/nebo sníženou seroreaktivitou u léčených savců.

Také byla navržena terapie spočívající v podání nukleových kyselin kodujících přirozené superantigeny (Terman et al., WO 9110680; WO 9324136) a Dow et al., WO 9636366). Dow et al. šli dále a navrhli současné podání nukleové kyseliny kodující cytokin nebo chemokin s nukleovou kyselinou kodující superantigen. Bez podpory pokusů WO 9636366 také navrhuje konstrukty ve formě bicistronického genového konstrukt, ve kterém jeden cistron obsahuje gen kodující superantigen a druhý cistron obsahuje gen kodující cytokin nebo chemokin.

Bez provedených pokusů Pouletty P. (Snagstat, EP 510949) navrhuje, že konjugaty mezi skupinami specifickými pro určitý cíl, jako je IL-2, a přirozenými superantigeny, mohou být

užitečné pro inaktivaci buněk exprimujících receptor pro IL-2.

Terapeutické použití imunomodulátorů v kombinaci s protilátkami specifickými pro buňky, které mají být inaktivovány

Bylo navrženo použití protilátek konjugovaných na jiné modifikátory biologické odpovědi, například na cytokinech nebo chemokinech, jako je například IL-2 (Fell et al., EP 439095; Roseblum et al., EP 396387; Pancook et al., 1996; a Becker et al., 1996).

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález spočívá ve zlepšení superantigenové terapie spočívající v aktivaci imunitního systému tak, aby inaktivoval nežádoucí cílové buňky u léčeného savce. Konkrétní zlepšení se týkají: 1) lokálního prodloužení aktivační periody, například v nádoru, během prvního léčebného cyklu; 2) potlačení hyporeaktivity způsobené tendencí aktivovaných T-buněk unikat do anergie; 3) usnadnění na MHC třídy II-nezávislé aktivace T-buněk v nádoru; a 4) rozšíření terapeutického okénka pro cytolýzu způsobenou aktivací superantigenem. Nyní bylo zjištěno, že tato vylepšení mohou být cele nebo částečně provedena tím, že podání superantigenu (SAG) je kombinováno s podáním imunomodulátoru v solubilní formě, kde alespoň jeden ze superantigenu a imunomodulátoru je ve formě konjugátu se skupinou mající specifitu pro buňky, které mají být inaktivovány.

Způsob inaktivace cílových buněk

První aspekt předkládaného vynálezu se týká jak terapie, tak testů in vitro a je způsobem pro inaktivaci nežádoucích cílových buněk v přítomnosti T-buněk tak, že tyto dva typy buněk jsou

kontaktovány se superantigenem (SAG), konkrétně takovým superantigenem, který aktivuje T-buňky prostřednictvím vazby na TCRV β , v přítomnosti imunomodulátoru (IM), který je jiným než superantigen (Sag). Obecně je způsob charakterizován tím, že alespoň jeden superantigen a imunomodulátor je ve formě konjugatu se skupinou (T), která je specifická pro cílové buňky, které mají být inaktivovány. V podbodě je způsob charakterizován tím, že

(a) superantigen (SAG) a imunomodulátor jsou použity ve formě trojkonjugatu obsahujícího superantigen (Sag), skupinu (T) specifickou pro cílové buňky a imunomodulátor (IM)

(T, IM, Sag-konjugat);

(b) superantigen (SAG) je použit ve formě duálního konjugatu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky v kombinaci s duálním konjugátem mezi imunomodulátorem (IM) a specificitu určující skupinou (T') pro cílové buňky (T, Sag - konjugat + T', IM - konjugat);

(c) superantigen (SAG) je použit ve formě duálního konjugatu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky a imunomodulátor (IM) je použit ve volné formě, t.j. není konjugován na specificitu určující skupinu pro cílové buňky (T, Sag - konjugat + IM);

(d) superantigen (SAG) je použit ve volné formě (Sag) a imunomodulátor je použit ve formě konjugatu, t.j. duálního konjugatu mezi imunomodulátorem (IM) a superantigenem (Sag) (Sag + T, IM-konjugat); a

(e) superantigen (SAG) a imunomodulátor (IM) jsou použity ve formě duálního konjugatu mezi superantigenem (Sag) a imunomodulátorem (IM) (Sag, IM-konjugat).

Superantigen a imunomodulátor mohou být specificky navázány na stejný typ buněk, například na identické nebo zkříženě reaktivní struktury/epitopy, nebo mohou být navázány na různé typy buněk ve stejné tkáni. Specifická vazba může být provedena na normální

buňky nebo na buňky spojené s onemocněním ve stejné tkáni. Jak superantigen, tak imunomodulátor mohou být specificky navázány pomocí jedné nebo několika protilátek.

Onemocnění, která mohou být léčena způsobem podle předkládaného vynálezu

Mezi léčená onemocnění patří ta onemocnění, která byla dříve navržena jako vhodná pro léčbu superantigeny. Viz například sekci "dosavadní stav techniky" uvedenou výše. Ilustrativními příklady jsou nádorová onemocnění, autoimunitní onemocnění, parazitární infekce, virové infekce a jiná onemocnění asociovaná s buňkami, které na svém povrchu exprimují MHC antigeny třídy II a/nebo jiné struktury, které jsou specifické pro určité onemocnění a které se váží na skupinu specifickou pro cíl inkorporovanou v superantigenech podle předkládaného vynálezu (vzorec I). Také bakteriální infekce mohou být léčeny způsoby podle předkládaného vynálezu.

Významnými nádorovými onemocněními v souvislosti s předkládaným vynálezem jsou: melanomy, karcinomy, hematopoetické malignity a fibrosarkomy a specifickými formami jsou spinocelulární karcinomy, karcinom prsu, karcinom hlavy a krku, karcinom štítné žlázy, karcinomy měkkých tkání, kostní sarkomy, testikulární nádory, karcinom prostaty, karcinom vaječníků, karcinomy močového měchýře, karcinomy kůže, mozkové nádory, angiosarkomy, hemangiosarkomy, histiocytární nádory, primární hepatocelulární karcinom, karcinomy plic, karcinomy čípku děložního, adenokarcinom ledvin, leukemie a lymfomy. Patří sem jakékoliv typy maligních a benigních nádorů, stejně jako nádory s mnohotnou lékovou resistencí, metastatické nádory, různé formy chemicky nebo virově (herpes, SV40, HIV atd.) indukovaných nádorů.

Superantigenové konjugaty podle předkládaného vynálezu

Tento aspekt předkládaného vynálezu obsahuje konjugaty vzorce



T je specificku určující skupina, Sag je volný superantigen a IM je imunomodulátor, který je jiný než superantigen. T, Sag a IM jsou na sebe navázány prostřednictvím organických spojovacích skupin B, které mohou být stejné nebo různé ve stejné konjugované molekule nebo substanci. Konjugaty vzorce I zahrnují chemické konjugaty, stejně jako rekombinantně připravené konjugaty (fúsní proteiny). X, y a z jsou celá čísla, obvykle mezi 0 a 10, například 0 - 5, a označují počet skupin T, Sag a IM, v příslušném pořadí, v dané konjugované molekule, s podmínkou, že když $y > 0$ a tak jeden nebo oba x a $y > 0$. Chemické konjugaty jsou běžně konjugované substance obsahující směs různých konjugovaných molekul. V souladu s tím mohou být v chemických konjugatech x, y a z také jiná než celá čísla v rozsahu 0 - 10, například v rozsahu 0 - 5.

V prvním podbodu vzorce I jsou Sag, IM a T přítomny v konjugatu (x, y a $z > 0$; T, Sag, IM-konjugaty). X, y a z jsou obvykle celá čísla 1 - 3, výhodně 1 - 2. Obvyklé vztahy mezi x, y a z jsou: $x = y = z$; $x = y = 0,5z$; $x = 0,5y = 0,5z$; a $x = 0,5y = z$.

Ve druhém podbodu konjugatů vzorce I není specificku určující skupina přítomna (IM, Sag-konjugaty, $x = 0$). y a z jsou obvykle celá čísla 1-3. Výhodné vztahy mezi x a y jsou: $x = y$; $x = 0,5y$; $0,5x = y$; $x = 1/3y$ a $1/3x = y$.

V obou podbodech celá čísla nebo vztahy primárně označují

fúsní proteiny, ve kterých může být specificitu určující skupina protein obsahující 1, 2, 3 nebo 4 polypeptidové řetězce a kde je jedna skupina T v každé molekule konjugatu.

Vzorec I se pro konjugaty podle druhého podbodů redukuje na:

$(Sag)_y (IM)_z$ vzorec II

Tento typ konjugatů je primárně adaptován na léčbu onemocnění asociovaných s buňkami exprimujícími MHC antigeny třídy II, zejména s nádorovými buňkami exprimujícími MHC antigeny třídy II, jako jsou nádory hematopoetického systému a některá autoimunitní onemocnění, virové infekce a parazitární infekce, ale také některá onemocnění asociovaná s buněčnými membránovými receptory pro imunomodulátor, jako je například T-buněčný lymfom exprimující například receptor pro IL-2.

A. Imunomodulátor (IM) ve vzorci I

IM označuje imunomodulátor, který je jiný než volný nebo konjugovaný superantigen.

Imunomodulátorem může být cytokin nebo chemokin. Příklady cytokinů jsou granulocytové/makrofágové kolonie stimulující faktor (GM-CSF), faktor nekrosy nádorů α a β (TNF α a TNF β), makrofágové kolonie stimulující faktor (M-CSF), granulocyty stimulující faktor (G-CSF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 a IGF. Příklady chemokinů jsou C5a, IL-8, monocytový chemotaktický protein 1 α (MIP1 α) nebo monocytový chemotaktický protein 1 β (MIP1 β), monocytový chemoatraktantní protein 1 (MCP-1), monocytový chemoatraktantní protein 2 (MCP-2), monocytový chemoatraktantní protein 3 (MCP-3), destičkový aktivační faktor (PAFR), N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin

(FMLPR), leukotrien B_4 (LTB_4R), peptid uvolňující gastrin (GRP), RANTES, eotaxin, lymfotaktin, IP10, ENA78, GCP-2, NAP-2, MGSA/gro, DC-CK1, Flt3L (ektopická doména), fraktalkin, PF-4 atd.

Jiným typem imunomodulátorů jsou imunomodulátory odvozené od buněčných membránových receptorů/ligandů účastnících se modulace spuštěné imunitní odpovědi, jako je například současná stimulace (například membránové receptory lymfocytů a příslušné ligandy). Příklady jsou CD40L/CD40, 4-BB1/4-BB1L, CD28/B7, CTLA-4/B7 atd. B7 zahrnuje varianty jako je CD80 a CD86, přednostně CD80. Výhodné formy jsou solubilní, obsahují extracelulární část (ektopickou doménu) a neobsahují intracelulární a membránové části molekul.

Výhodné imunomodulátory jsou schopné potencovat efekt superantigenů in vivo, například působením proti úniku superantigenem aktivovaných T-buněk do anergie. Typickými vhodnými buněčnými receptory/ligandy jsou CD28/B7, včetně analogů a fragmentů, jak byly popsány výše. Typickými cytokiny v této skupině jsou IL-2, protože je hlavním následným efektozem CD28/B7 signalizace, a IL-2 podobné cytokiny IL-7 a IL-15. Z T-buněčných povrchových receptorů asociovaných s páry receptor/ligand je výhodné, aby konjugát obsahoval takový receptor/ligand, který se neváže na aktivované T-buňky. Pro CD40L/CD40, 4-BB1/4-BB1L a CD28/B7 to znamená solubilní formy CD40, 4-BB1L a B7 s preferencemi uvedenými výše. Příklady provedení vynálezu ilustrují varianty imunomodulátorů, které byly shledány jako optimální v předkládaném vynálezu.

Imunomodulátory by měly být výhodně od stejného druhu, jako je jedinec, který má být léčen. Přirozené imunomodulátory, jako jsou cytokiny a chemokiny, mají často značnou systémovou toxicitu a relativně krátký poločas u savců. Literatura obsahuje mnoho

prací týkajících se modifikace imunomodulátorů tak, aby bylo dosaženo vyšší stability k oxidaci, delšího poločasu in vivo, nižší toxicity, lepšího skládání při výrobě rekombinantními technikami atd. Například US 5229109 (Grimm et al.) popisuje analogy IL-2 s nízkou toxicitou mající redukovanou afinitu pro vysokoafinitní receptory pro IL-2 (IL-2R) proto, že mají deficitní vazbu na p55 α podjednotku receptoru. Analogy jsou primárně připraveny mutací kodonu pro aminokyselinu v pozici 33-46 v IL-2 (například Arg38Ala a Phe42Lys nebo Phe42Ala). Asp20Lys mutant má 100-500-krát sníženou afinitu pro p75/ β -řetězec receptoru pro IL-2, bez toho, že by byla ovlivněna vazba na p55 (Collins et al., 1988). Další mutace, například Asp20Ser, jsou méně závažné (Berndt et al., 1994). Studie provedené na myším IL-2 naznačují, že Asp84 a Asn88 lidského IL-2 jsou také významné pro vazbu na p75 (Zurawski et al., 1993). Tato teorie je podpořena modelováním vazby mezi lidským IL-2 a jeho receptorem (Bamborough et al., 1994). Očekávaná redukce afinity při těchto mutacích je Asp20>Asn88>Asp84.

Kombinace mutací v Arg38 a Phe42 s mutacemi v pozicích 88 a 20 vede k ještě nižší afinitě pro IL-2R. Jinou účinnou a výhodnou mutací IL-2 je Trp51Pro, při které vzniká analog IL-2 se sníženým stupněm buněčné internalizace a prodlouženým trváním imunomodulačního účinku (Chang et al., 1996).

Číslování aminokyselinových pozic je podle Taniguchi et al., 1983).

Práce Grimm et al., Collins et al., 1988; Berndt et al., 1994; Zurawski et al., 1993; Bamborough et al., 1983; Chang et al., 1996; a Taniguchi et al., 1983, jsou zde uvedeny jako odkazy.

Použití analogů cytokinů a chemokinů se sníženou afinitou k

jejich normálním receptorům v konjugatech podle předkládaného vynálezu posílí jejich specifickou vazbu na předem vybrané cílové buňky. Je možné, že cytokiny a chemokiny mutované tak, aby měly snížený stupeň buněčné internalizace povazbě na receptory cílové buňky, a inkorporované v konjugatech vzorce I, povedou k zisku prodloužené aktivity superantigenu ve srovnání s použitím přirozeného imunomodulátoru.

Termín imunomodulátor (IM) proto zahrnuje jakoukoliv modifikovanou formu, například jakoukoliv mutovanou formu, která má agonistický nebo antagonistický efekt příslušného imunomodulátoru v přirozené formě.

B. Superantigen (Sag) ve vzorci I

Sag ve vzorci I je superantigen, jak je definován pro volné superantigeny v "dosavadním stavu techniky", t.j. přirozený superantigen, který může být volitelně modifikovaný, například mutací, aby měl:

- a) sníženou schopnost vazby na MHC antigeny třídy II ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem (viz například Abrahmsen et al., WO 9601650);
- b) sníženou seroreaktivitu v lidském séru ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem (viz například Abrahmsen et al., WO 9601650 a Antonsson et al., WO 9736932, a Antonsson et al., 1997);
- c) sníženou imunogenicitu u člověka ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem (viz například Antonsson et al., WO 9736932, a Antonsson et al., 1997);
- d) aby byl chimerou mezi dvěma nebo více analogy přirozených superantigenů, ve které je jeden region v prvním přirozeném superantigenu nahrazen příslušným regionem ve druhém analogickém superantigenu. Uvedeným regionem může být region určující vazbu

na TCRV β , například jak je definován pro SEE/SEA a SEA/SEE chiméry (viz například Antonsson et al., WO 9736932, a Antonsson et al., 1997; a Lampaer et al., 1996).

Také jsou brány v úvahu jiné vhodné modifikace/mutace, například ty, které znemožňují nežádoucí glykosylaci při produkci v eukaryotických buňkách.

Typickými mutacemi pro SEA/SEE-podobné superantigeny byly v době podání přihlášky následující mutace (číslování je podle Antonsson et al., 1997 a Antonsson et al., WO 9736932):

- a) mutace snižující vazbu na MHC antigeny II. třídy: Asp227Ala (SEAm9), Phe47Ala a/nebo Asp70Arg. Mutant Phe47Ala/Asp227Ala = SEAm23.
- b) a d) chimery mezi SEA a SEE, u kterých je cílem dosažení menší seroreaktivity u lidí, které si zachovávají SADCC schopnost příslušného superantigenu: SEE s následujícími substitucemi Gly20Arg, Thr21Asn, Gly24Ser, Lys27Arg.

Mutanty použité v pokusech jsou SEA (Asp227Ala) = SEAm9, SEA(Phe47Ala/Asp227Ala) = SEAm23 a SEA(Phe47Ala/Asn102Q/Asn149Asp/Thr218Val/Asp227Ala) = SEAm57.

Výhodnými superantigeny byly v době podání přihlášky:

1. superantigeny (Sag) mající dvě vazebná místa pro MHC antigeny třídy II (například stafylokokové enterotoxiny A a E),
2. superantigeny (Sag), které v nemutované formě vyžadují ionty Zn pro optimální vazbu na MHC antigeny třídy II (například SEA, SEE a SEH),
3. stafylokokové enterotoxiny.

Sag molekula, která je inkorporována do konjugátu podle předkládaného vynálezu nemusí být funkčním superantigenem, hlavní

je, aby finální konjugát vykazoval buď SADCC nebo SDCC nebo oboje, jak jsou popsány výše.

C. Specificitu určující skupina T ve vzorci I

T může být jakákoliv struktura, která se váže na strukturu buněčného povrchu, výhodně na strukturu specifickou pro onemocnění. Struktura, pro kterou je T skupina specifická, se obvykle liší (a) od polymorfního epitopu TCR řetězce, na který se Sag váže, a (b) od epitopů MHC antigenů třídy II, na který se Sag váže. Specificitu určující skupina může být vybrána z interleukinů (například jí může být interleukin 2), hormonů, protilátek včetně antigen-vazebných fragmentů protilátek, růstových faktorů atd. Viz například Woodworth 1993 (zde uvedeno jako odkaz).

Specificitu určující skupina může být proto protein obsahující 1, 2, 3 nebo 4 polypeptidové řetězce.

Výhodně je T protilátka (kompletní protilátka, Fab, $F(ab)_2$, Fv, ScFv (jednořetězcová protilátka), víceřetězcové protilátky ($ScFv$)_n a jiné fragmenty protilátky s vazbou antigenu), včetně jakýchkoliv funkčně aktivních zkrácených forem protilátek uvedených výše. Další varianty jsou monospecifické a bispecifické protilátky. Protilátka může být namířena proti jakékoliv struktuře buněčného povrchu asociované/specifické pro onemocnění, například proti struktuře spojené s jakýmkoliv nádory uvedenými výše, a zejména jsou v této souvislosti významné aktivní fragmenty protilátky (jako je Fab). Typicky může být protilátka namířena proti epitopu specifickému pro střevo a/nebo slinivku břišní, například proti takzvanému C242 epitopu (Lindholm et al., WO 9301303), epitopu specifickému pro plicní karcinomy, jako je například epitop pro 5T4 protilátku (Stern et al., WO 8907947),

epitopu specifickému pro lymfomy, jako je například CD19, epitopu specifickému pro melanomy, jako je například HMW-MAA, atd.

Termín "protilátky" zahrnuje monoklonální protilátky stejně jako polyklonální protilátky, kdy přednostně jsou využívány monoklonální protilátky.

V případě, že skupinou určující specifitu je Fab fragment, tak jsou cysteinové zbytky, které normálně zprostředkují vazbu mezi těžkými a lehkými Fab řetězci nahrazeny aminokyslečinou, která neumožňuje tvorbu disulfidových vazeb, jako je například serin. Viz též Antonsson et al., WO 9736932.

To, co bylo uvedeno výše, také platí v případě, že T je namířena proti jedinečným strukturám na více nebo méně zdravých buňkách, které regulují nebo kontrolují vývoj onemocnění.

D. Vazebná skupina B

Vazebná skupina B může být vybrána ze skupin popsanych dříve (Dohlsten et al., WO 9201470; Abrahmsen et al., WO 9601650; a Antonsson et al., WO 9736932), t.j. B by měla výhodně být hydrofilní a měla by obsahovat jednu nebo více struktur vybraných ze skupiny skládající se z amidu, thioetheru, disulfidu atd. Nejlepšími vazebnými skupinami jsou skupiny získané rekombinantními technikami, t.j. konjugací probíhající na úrovni genomu, která vede ke vzniku oligopeptidových vazebných skupin. Typická oligopeptidová vazebná skupina obsahuje 1-30, například 1-20, aminokyselin, které jsou výhodně vybrány tak, aby vazebná skupina jako celek byla hydrofilní. Zbytky ve vazebné skupině jsou výhodně vybrány z hydrofilních aminokyselinových zbytků, jako je Gln, Ser, Gly, Glu, Pro, His a Arg. Typické oligopeptidové vazebné skupiny obsahují tripeptid GlyGlyPro nebo

takzvanou Q vazebnou skupinu (Wootton et al., 1989, zde uvedeno jako odkaz), která je volitelně modifikována gly-pro na amino-konci.

E. Místa vazby pro T, SAG a IM

Chemické konjugaty budou typicky obsahovat směs molekul konjugatů lišících se v pozicích vazeb. Konjugaty zahrnují hetero-, stejně jako homokonjugaty.

Pro rekombinantní konjugaty (fúsní proteiny) budou konjugaty uniformní z hlediska vazebných pozic. Pro každou jednotlivou podjednotku (T, Sag, IM) je amino-konec fúsovaný na karboxy-konec jiné podjednotky nebo naopak, výhodně prostřednictvím vloženého oligopeptidového můstku. Kombinace v případě konjugatů jsou T.IM.Sag, IM-T-Sag, Sag-IM-T, Sag-T-IM, T-Sag-IM, IM-Sag-T (vazebná struktura B není uvedena). V případě, že jedna nebo více podjednotek obsahuje dva nebo více polypeptidových řetězců se počet možností zvyšuje. Pokud je T Fab fragment protilátky, tak existují následující možnosti (oligopeptidové vazebné skupiny B nejsou uvedeny):

1. Sag-Fab (lehký řetězec)-IM-Fab (těžký řetězec)
2. Fab (lehký řetězec)-Sag-Fab (těžký řetězec)-IM
3. Sag-Fab (lehký řetězec)-Fab (těžký řetězec)-IM
4. Fab (lehký řetězec)-IM-Sag-Fab (těžký řetězec)
5. Sag-Fab (lehký řetězec)-IM-Fab (těžký řetězec)
6. IM-Fab (lehký řetězec)-Sag-Fab (těžký řetězec)
7. Fab (lehký řetězec)-Sag-Fab (těžký řetězec)-IM
8. Fab (lehký řetězec)-IM-Fab (těžký řetězec)-Sag

V dalších variantách mohou být imunomodulátor a superantigen fúsovány v sekvenci na jakýkoliv konec jakéhokoliv řetězce protilátky.

Výhodné jsou rekombinantní konjugaty a nejvýhodnější jsou Fab fragmenty jako specifickosti určující skupina a vazba amino-konce volného superantigenu na první konstantní doménu těžkého (C_H1) nebo lehkého řetězce protilátky a vazba imunomodulátoru na zbývající karboxylové koncové skupiny (platí pro vzorce I-IV).

Pro optimální produkci a funkci je fúsní protein exprimován rekombinantně jako dvouřetězcový produkt, ve kterém je superantigen fúsován na C-konci na C_H1 doménu FAB fragmentu protilátky prostřednictvím flexibilní hydrofilní aminokyselinové spojovací skupiny o 3-11 zbytcích. Tato spojovací skupina může mít sekvenci Gly-Gly-Pro nebo Pro-Ala-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ala-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO: 19) nebo může mít sekvenci podle SEQ ID NO: 19, která je využita přednostně. Imunomodulátor je fúsován na svém C-konci na lehký řetězec prostřednictvím hydrofilní nebo neutrální nebo pozitivně nabitě vazebné skupiny o 10-20 zbytcích (vazebná skupina Q). Výhodně může mít vazebná skupina Q následující sekvence: Gly-Pro-Arg-Gln-Ala-Asn-Glu-Leu-Pro-Gly-Ala-Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Arg (SEQ ID NO: 23), Gly-Pro-Arg-Gln-Ser-Asn-Glu-Thr-Pro-Gly-Ser-Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Arg (SEQ ID NO: 20), Gly-Pro-Arg-Gln-Ala-Lys-Thr-Leu-Pro-Gly-Ala-Pro-Ser-Gln-Thr-Thr-Arg (SEQ ID NO: 21) nebo Gly-Pro-Thr-Glu-Ala-Asp-Glu-Leu-Pro-Gly-Ala-Pro-Ser-Glu-Glu-Glu-Thr (SEQ ID NO: 22), kdy nejvýhodnější jsou 20 a SEQ ID NO: 21 (podrobnosti jsou uvedeny v příkladu 2).

Analogické kombinace na amino-konci nebo kombinace navázání na amino-konci a karboxy-konci VH a VL domén povedou ke vzniku aktivních, ale méně účinných konjugátů.

F. Aktivní entity neodpovídající vzorci I, ale používané v kombinacích a-e způsobu podle předkládaného vynálezu

Volné superantigeny (Sag): Viz definice. Typické Sag jsou uvedeny v části "Dosavadní stav techniky" a v části "B. Superantigen (Sag) ve vzorci I".

Nekonjugované imunomodulátory: Viz "definice". Mohou být použity v podstatě stejné imunomodulátory, jako jsou imunomodulátory uvedené v "A. Imunomodulátor (IM) ve vzorci I". Výhodnými imunomodulátory jsou cytokiny a chemokiny, zejména IL-2 a cytokiny podobné IL-2.

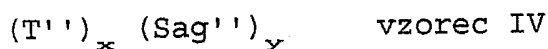
Specifické imunomodulátory (T,IM-konjugaty): Tyto konjugaty mají obecný vzorec

$(T')_x (IM')_z$ vzorec III

kde T' a IM' jsou navázány prostřednictvím organické vazebné skupiny B'. T', IM' a B' jsou vybrány ze stejných skupin sloučenin/struktur jako T, IM a B. x a z jsou definovány stejně jako ve vzorci I ($y = 0$) a výhodné jsou jeden nebo dva IM' na T' a molekulu konjugatu. Místa vazby mezi T' a IM' jsou stejná, jak je definováno pro vzorec I. Viz také část "E. Místa vazby pro T, SAG a IM", kde jsou uvedeny vzorce 1-8 a komentář k těmto vzorcům, které jsou také použitelné na T,IM-konjugaty s tou výjimkou, že Sag je vynechán. Konjugaty vzorce III mohou být vyrobeny běžnými technikami, t.j. běžnou chemickou syntézou nebo rekombinantními technikami (fúsní proteiny), lépe rekombinantními technikami (Fell et al., EP 439095; Roseblum et al., EP 396387). Zejména významné jsou T,IM-konjugaty obsahující IM'-skupinu, která byla modifikována, například mutována, tak, aby měla sníženou afinitu a/nebo nižší stupeň internalizace, jak bylo uvedeno výše.

Specifické superantigeny (T,Sag-konjugaty). Tyto konjugaty

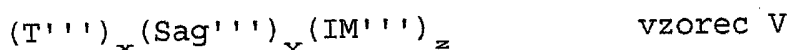
mají obecný vzorec



kde T'' a Sag'' jsou navázány prostřednictvím organické vazebné skupiny B'' . T'' , Sag'' a B'' jsou vybrány ze stejných skupin sloučenin/struktur jako T , IM a B . x a y jsou definovány stejně jako ve vzorci I ($z = 0$) a výhodné jsou jeden nebo dva Sag'' na T'' a molekulu konjugátu. Místa vazby mezi T'' a Sag'' jsou stejná, jak je definováno pro vzorec I. Viz také část "E. Místa vazby pro T , SAG a IM ", kde jsou uvedeny vzorce 1-8 a komentář k těmto vzorcům, které jsou také použitelné na T , IM konjugaty s tou výjimkou, že IM je vynechán. Konjugaty vzorce IV mohou být vyrobeny běžnými technikami, t.j. běžnou chemickou syntézou nebo rekombinantními technikami (fúsní proteiny), lépe rekombinantními technikami (viz například Dohlsten et al., WO 9201470; Abrahmsen et al., WO 9601650; Antonsson et al., WO 9736932).

Konjugaty obsahující modifikovaný imunomodulátor

Tyto nové konjugaty mají vzorec:



kde T''' a Sag''' jsou vybrány ze stejných sloučenin jako T a Sag ve vzorci I. IM''' je imunomodulátor, který byl modifikován, například mutací, tak, aby měl sníženou afinitu k jeho receptoru na buněčné membráně a/nebo aby měl nižší stupeň internalizace při vazbě na receptor (ve srovnání s přirozenými formami). IM''' je výhodně cytokin nebo chemokin. Viz dále část "A. Imunomodulátor IM ve vzorci I". Jiným významným imunomodulátorem pro tento aspekt vynálezu je modifikovaný IL-2. x , y a z jsou stejné, jak jsou definovány pro vzorec I.

V prvním provedení konjugátů vzorce V jsou T''', Sag''' a IM''' všechny přítomny (všechny x, y a z jsou větší než 0), t.j. jedná se o T,Sag,IM-konjugaty. X, y a z jsou obvykle celá čísla 1-3, výhodně 1-2. Typické vztahy mezi x, y a z jsou: $x = y = z$; $x = y = 0,5z$; $x = 0,5y = 0,5z$; a $x = 0,5y = z$.

Ve druhém provedení konjugátů vzorce V je superantigen nepřítomen ($y = 0$), t.j. jedná se o T,IM-konjugaty. X a z jsou obvykle celá čísla 1-3. Typické vztahy mezi x a z jsou: $x = z$; $x = 0,5z$; $x = 1/3z$; a $1/3x = z$.

V obou provedeních konjugátů vzorce V označují celá čísla nebo vztahy primárně fúsní proteiny, ve kterých může být specifitu určující skupina protein obsahující 1, 2, 3 nebo 4 polypeptidové řetězce a kde je jedna skupina T v každé molekule konjugátu. Místa vazby ve fúsních proteinech vzorce V jsou stejná, jak jsou definována pro příslušné fúsní proteiny vzorce I. Viz také část "E. Místa vazby pro T, SAG a IM", kde jsou uvedeny vzorce 1-8 a komentář k těmto vzorcům, které jsou také použitelné na T,IM-konjugaty s tou výjimkou, že Sag je vynechán.

Výroba konjugátů definovaných výše

Výroba konjugátů může být provedena dvěma způsoby:

1. chemickou vazbou jednotlivých podjednotek T, Sag a IM. Každá jednotlivá podjednotka nebo jejich kombinace mohou být vyrobeny rekombinantními technikami;
2. rekombinantními technikami, při kterých je přímo získán konjugát, jak je definován v jakémkoliv z předchozích vzorců.

Takové techniky jsou dobře v oboru známé a mají velké množství variant.

Chemická vazba obvykle využívá funkční skupiny (například primární amino-skupiny, karboxylové skupiny, merkapto skupiny, uhlovodanové skupiny), které jsou přítomné v několika pozicích na superantigenech, proteinových imunomodulátorech a proteinových specifitě určujících skupinách. Tyto techniky jsou dobře známé v oboru.

Hlavní hostitelskou buňkou pro průmyslovou rekombinantní produkci konjugátů podle předkládaného vynálezu mezi superantigenem a imunomodulátorem (fúsovaných forem, stejně jako nekonjugovaných forem), je *E. coli*. Tento hostitel umožňuje v zásadě dva typy produkce: intracelulární produkci a sekreci. Sekrece je výhodnější, protože umožňuje přečištění správně složených proteinů z periplasmy a kultivačního media. Není také vyloučena produkce aktivních konjugátů v jiných hostitelských buňkách, například v eukaryotických buňkách, jako jsou kvasinky a nebo savčí buňky. Předběžné výsledky naznačují, že eukaryotické buňky, jako jsou savčí buňky, mohou být výhodné pro inkorporaci imunomodulátorů interagujících s CD28, jako je například B7 a jeho analogy.

Genové konstrukty kodující nové konjugaty podle předkládaného vynálezu

Čtvrtým aspektem předkládaného vynálezu je rekombinantní molekula nukleové kyseliny, výhodně DNA, například cDNA, nebo RNA, kodující superantigen a imunomodulátor, jak byly definovány výše, výhodně IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, RANTES, ektopickou doménu CD80, ektopickou doménu CD86, 4_BB1L a Flt3L a jejich analogy, jak byly definovány výše. V tomto aspektu předkládaného vynálezu nukleová kyselina typicky obsahuje regulační kontrolní sekvence jako jsou translační regulační sekvence, sekvence rozpoznávající počátek replikace, sekreční signální sekvence pro

jeden nebo pro oba z imunomodulátoru a superantigenu, atd., kde tyto sekvence jsou kompatibilní s hostitelskou buňkou, ve které mají být superantigen a imunomodulátor exprimovány. Region mezi částí sekvence kodující superantigen a imunomodulátor může obsahovat sekvenci kodující vazebné místo pro ribosomy, jako je například bicistronický gen konstrukt. Tento konstrukt umožní oddělenou expresi každého polypeptidového řetězce obsaženého v konjugátu. V případě víceřetězcových konjugátů obsahujících IM, Sag, specificitu určující skupinu a vlastní signální sekvenci usnadní bicistronický konstrukt skládání a sestavení plně aktivních konjugátů s IM navázaným na jeden řetězec. Toto je významné v případech, že specificitu určující skupinou je dvouřetězcová molekula protilátky a alespoň jeden superantigen (Sag) a imunomodulátor je fúsován na terminální konec protilátkového řetězce. Viz výše.

Farmaceutické prostředky, dávkování a způsoby podání

Čtvrtým aspektem předkládaného vynálezu je farmaceutický prostředek obsahující kombinaci superantigenu (Sag), specificitu určující skupiny (T) a imunomodulátoru (IM) podle předkládaného vynálezu. Charakteristickým rysem tohoto aspektu předkládaného vynálezu je to, že alespoň jeden ze superantigenu a imunomodulátoru je ve formě konjugátu umožňujícího specifickou vazbu na buňky, které mají být inaktivovány, jak bylo popsáno výše.

Takové prostředky jsou v oboru známe, s tou výjimkou, že nyní obsahují kombinovaný konjugát podle předkládaného vynálezu. Prostředek může obsahovat:

a. trojitý konjugát obsahující superantigen (Sag), specificitu určující skupinu (T) pro cílové buňky a imunomodulátor (IM) (T, IM, Sag-konjugát);

b. dva dvojité konjugaty - jeden mezi specificitu určující protilátkou (T) a superantigenem a druhý mezi specificitu určující protilátkou (T') a imunomodulátorem (t.j. T,Sag-konjugat + T',IM-konjugat). T a T' mohou být stejné nebo odlišné z hlediska epitopové specificity;

c. duální konjugat mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) a imunomodulátor (IM) ve volné formě (T,Sag-konjugat + IM);

d. duální konjugat mezi imunomodulátorem (IM) a specificitu určující skupinou (T) a superantigen ve volné formě (Sag) (IM,T-konjugat + Sag); nebo

e. superantigen (Sag) a imunomodulátor (IM) ve formě duálního konjugatu (Sag,IM-konjugat).

Viz dále v souvislosti se způsoby podle předkládaného vynálezu. V případě, že prostředek obsahuje dvě aktivní složky (b-d, výše), mohou být také tyto složky v prostředku oddělené, což umožňuje podání složek v jinou dobu.

Prostředky mohou být ve formě lyofilizovaného materiálu, sterilního nebo asepticky připraveného roztoku, tablety, ampule atd. Mohou být použita vehikula jako je například voda (výhodně pufrovaná na fyziologicky přijatelné pH, například pomocí PBS) nebo jiný inertní pevný nebo kapalný materiál. Obecně jsou prostředky připraveny tak, že konjugat, případně v kombinaci s nekonjugovanou aktivní složkou, je smísen s, rozpuštěn v, navázán na nebo jinak kombinován s jedním nebo více vodnými nebo nevodnými vehikuly rozpustnými nebo nerozpustnými ve vodě a pokud je to vhodné, tak s vhodnými pomocnými činidly a přísadami. Zásadní je, že vehikula a podmínky nesmí nežádoucím způsobem ovlivňovat aktivitu aktivních složek, jak jsou definovány v bodech a-e, výše.

Obyčejně budou superantigeny (Sag), které budou použity ve způsobech podle předkládaného vynálezu, prodávány a podávány v předem balených dávkách, které budou každá obsahovat účinné množství Sag, které bude podle získaných výsledků v rozmezí 1 pg - 50 mg. Přesná dávka se bude pro jednotlivé případy lišit podle hmotnosti a věku pacienta, způsobu podání, typu onemocnění, použité specifické skupiny, superantigenu, vazebné skupiny (-B-), imunomodulátoru atd.

Významným faktorem, který je brán v úvahu při stanovení dávky pro kombinaci podle předkládaného vynálezu je to, aby superantigeny a imunomodulátory byly v optimálním dávkovém rozmezí. Příliš nízká dávka povede k žádnému nebo suboptimálnímu efektu a příliš vysoká dávka bude mít nepříjemné vedlejší účinky, jako je například toxicita, která může být letální. Proto musí být zdůrazněno, že široké dávkové rozmezí uvedené výše by mělo pokrýt všechny možné dávky pro všechny varianty způsobů podle předkládaného vynálezu. Tak má každá specifická kombinace podle předkládaného vynálezu podrozmezí dávky v rozmezí 0,1 pg až 50 mg. Není vyloučeno, že další vývoj povede k dávкам mimo tento rozsah.

Způsob podání bude běžný v oboru používaný způsob podání, při kterém dojde ke kontaktu terapeuticky účinného množství neboli množství účinně usmrcujícího cílové buňky kombinace superantigenu-imunomodulátoru podle předkládaného vynálezu s cílovými buňkami. Pro indikace uvedené výše je nejčastěji u savců, jako je člověk, použito parenterálního podání, jako je injekce nebo infuze (podkožní, nitrožilní, intraarteriální, nitrosvalová, intraperitoneální). Konjugat podle předkládaného vynálezu může být podán lokálně nebo systémově.

Termín "množství účinně usmrcujícího cílové buňky" označuje

množství, které je účinné pro aktivaci T buněk a ničení cílových buněk T buňkami.

Výhodné způsoby podání jsou stejné, jak jsou pro superantigeny uvedeny v Dohlsten et al., WO9201470; Abrahmsen et al., WO 9601650 a Antonsson et al., PCT/97/00537. Sem patří 1-5 hodinová intravenosní infuze (výhodně 4-hodinová) za den kombinovaná s antipyretikem (paracetamolem). Dávka se opakuje po dobu několika dnů, například po dobu 5-8 dnů s tím, že se bere v úvahu riziko vzniku protilátek namířených proti konjugátu. Optimálně je provedeno několik cyklů terapie, kde každý cyklus se skládá z jednoho nebo více dnů, po kterých následuje oddychové období trvající jeden nebo více dnů, jako je například cyklus skládající se z léčby po dobu 5 dnů a oddychové fáze trvající 2 dny.

Prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být podány jako hlavní terapie, nebo jako adjuvantní terapie k chirurgickému zákroku nebo léčbě jinými léky.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1: FACS analýza CHO-CD28 buněk barvených CD80-C215 Fab, CD80-C215Fab-SEAm57 nebo C215Fab-SEA a potom inkubovaných s mAb proti myššímu kappa řetězci značenou PE. Barvení bylo provedeno při 4 °C bez jakéhokoliv promytí. Ordináta: hlavní kanál.

Obr. 2: FACS analýza Colo205 buněk barvených CD80-C215 Fab, CD80-C215Fab-SEAm57 nebo C215Fab-SEA a potom inkubovaných s mAb proti myššímu kappa řetězci značenou PE. Barvení bylo provedeno při 4 °C bez se třemi proplachy mezi každým stupněm barvení. Ordináta: hlavní kanál. Abscisa: poměr efektorových (E) k cílovým (T) buňkám.

Obr. 3: Proliferace. T buňky byly inkubovány s Colo205 buňkami a 4 μ M C242Fab-SEA a různými množstvími CD80-C215Fab po dobu 4 dnů, po kterých byla měřena inkorporace ^3H -thymidinu. Aktivita získaná bez jakékoliv CD80-C215Fab byla 20039 cpm $\pm$ 1750.

Obr. 4: Produkce IL-2. T buňky byly inkubovány s Colo205 buňkami a 4 μ M C242Fab-SEA a různými množstvími CD80-C215Fab po dobu 4 dnů, po kterých byl odebrán supernatant a bylo stanoveno množství IL-2. Množství IL-2 získané bez jakékoliv CD80-C215Fab bylo 2849 pg/ml.

Obr. 5: Proliferace. T buňky byly inkubovány s Colo205 buňkami a různými množstvími CD80-C215Fab-SEAm57 nebo C215Fab-SEAm23 po dobu 4 dnů, po kterých byla měřena inkorporace ^3H -thymidinu.

Obr. 6: Produkce IL-2. T buňky byly inkubovány s Colo205 buňkami a různými množstvími CD80-C215Fab-SEAm57 nebo C215Fab-SEAm23 po dobu 4 dnů, po kterých byl odebrán supernatant a bylo stanoveno množství IL-2.

Obr. 7: Proliferační kapacita lidských krevních T buněk inkubovaných po dobu 7 dnů s uvedenými proteiny a ozářených, přenesených CHO buněk (pro prezentaci SEA). Ordináta: inkorporace ^3H -thymidinu (cmp).

Obr. 8: Simultánní podání specificky zaměřených SEA a IL-2 vede ke zvýšené aktivaci T buněk in vivo. Cytotoxicita (vyjádřená v procentech) proti SEA-potaženým MHC II⁺ Raji buňkám splenocytů od myši léčených 1 až 3 injekcemi C215FabSEA (FS), C215Fab-Q-hIL2 (FI), dvoukombinací (FS+FI) nebo C215FabSEA-Q-hIL2 (FSI). Poměr efektorové:cílovým buňkám byl 30:1 a cytotoxicita byla měřena ve standardním 4-hodinovém testu uvolňování ^{51}Cr .

Obr. 9: Terapie 5-denních B16-C215 nádorů u C57B1/6 myší třemi injekcemi (dny 5, 6 a 7 po inokulaci tumoru) C215FabSEA (FS), C215Fab-Q-hIL2 (FI), C215FabSEA + C215Fab-Q-hIL2 (FS+FI) nebo C215FabSEA-Q-hIL2 (FSI). Byla použita ekvimolární množství FabSEA a Fab-Q-hIL2. Abscisa: množství injikovaného proteinu. Ordináta: redukce tumoru vyjádřená v procentech.

Obr. 10: Zvýšená infiltrace nádoru CD25⁺ T buňkami po léčbě C215FabSEA (FS), C215Fab-Q-hIL2 (FI) nebo C215FabSEA-Q-hIL2. CD25-pozitivní buňky infiltrující plíce myší majících rozvinuté B16GA733 tumory plic byly počítány imunohistochemicky. Ordináta: procento zbarvené plochy. Abscisa: 1 = PBS; 2 = první injekce; 3 = druhá injekce; 4 = třetí injekce; 5 = čtvrtá injekce.

Obr. 11: Prodloužené hladiny interferonu τ po až 4 injekcích (jednou denně, 37 mg/injekci) C215FabSEA-Q-hIL12 (37 mg). Krev byla odebírána 4 hodiny po poslední injekci a obsah interferonu τ (ordináta) byl stanoven ELISA testem za použití rekombinantního myšího interferonu τ (Pharmigen) jako standardu. Podobný pokus byl proveden s ekvimolárním množstvím (30 mg/injekci) C215FabSEA (FS).

Obr. 12: Cytotoxicita (vyjádřená v procentech na ordinátě) proti SEA-potaženým MHC II⁺ Raji buňkám splenocytů od myší léčených PBS nebo 1, 4 nebo 6 injekcemi C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2 (= FSm9-IL2). Cytotoxicita byla měřena ve standardním 4-hodinovém testu uvolňování ⁵¹Cr. PBS je použit jako negativní kontrola.

Obr. 13: Terapie 3-denních B16-C215 nádorů u C57 B1/6 myší po léčbě 8 injekcemi C215FabSEA_{D227A} (= FSm9) nebo C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2 (= FSm9-IL2). Léčba byla podávána denně po dobu 8 dnů nepřerušovaně. V den 21 byla zvířata utracena a byl stanoven počet plicních metastas. Ordináta: redukce tumoru

vyjádřená v procentech.

Obr. 14: Terapie 3-denních B16-C215 nádorů u Vb3 TCR transgenních myší po léčbě 8 injekcemi

C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2_{F42A} (= FSm9-IL2(F42A)),
C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2 (= FSm9-IL2) nebo C215FabSEA_{D227A} (= FSm9). Léčba byla podávána denně po dobu 8 dnů nepřerušovaně. V den 21 byla zvířata utracena a byl stanoven počet plicních metastas. Ordináta: redukce tumoru vyjádřená v procentech.

Obr. 15: Terapie 3-denních B16-C215 nádorů u Vb3 TCR transgenních myší po léčbě 8 injekcemi C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2_{F42A} (F42A), C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2_{F42K} (F42K) nebo C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2_{F42A/D20S} (F42A/D20S). Léčba byla podávána denně po dobu 8 dnů nepřerušovaně. V den 21 byla zvířata utracena a byl stanoven počet plicních metastas. Ordináta: redukce tumoru vyjádřená v procentech.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Biologická aktivita CD80-C215Fab fúsních proteinů pro současnou stimulaci v protinádorové terapii SAG specifickými Fab

Souhrn: CD80-C215Fab a CD80-C215Fab-SEAm57 fúsní proteiny byly konstruovány tak, aby obsahovaly extracelulární doménu lidského CD80. Fúsní proteiny byly produkovány v savčích buňkách a byly testovány na vazbu na CD28 za použití transfektovaných CHO buněk a C215 antigenu za použití Colo205 buněk. Oba fúsní proteiny se vážaly na CD28 a C215 antigeny, kdy vazba na C215 byla 100-krát nižší ve srovnání s C215Fab-SEA. Protože CD80 je navázán na N-koncovou část L řetězce, je možné, že CD80 skupina interferuje s vazbou C215Fab. Oba fúsní proteiny ko-stimulují SAG aktivované lidské T-buňky, což ukazuje na to, že solubilní CD80 si zachovává

Materiál a metody

Tabulka I

LAKQ5	ATA	TAA	GCT	TCC	ACC	ATG	GGC	CAC	ACA	CGG	AGG
	(SEQ ID NO 1)										
LAKQ7	ACG	CAG	ATC	TTT	AGT	TAT	CAG	GAA	AAT	GCT	CTT
	GC (SEQ ID NO 2)										
LAKQ30	TCA	AAG	CTT	CTC	GAG	CGC	GCT	GTT	ATC	AGG	AAA
	ATG CTC (SEQ ID NO 3)										
LAKQ37	CGC	GCG	TCA	GGC	TAA	CGA	ACT	GCC	AGG	CGC	CCC
	GTC ACA GAG ACG A (SEQ ID NO 4)										

21.05.00

LAKQ38 AGC TTC GTC TCA CGC GCG TTC TTC CTG TGA CGG
GGC GCC TGG CAG TTC GTT AGC CTG ACG
(SEQ ID NO 5)

LAKQ88 TGG TAC ACC ACA GAA GAC AGC TTG TAT GTA TG
(SEQ ID NO 6)

LAKQ89 CAT ACA TAC AAG CTG TCT TCT GTG GTG TAC CA
(SEQ ID NO 7)

LAKQ90 CGA ATA AGA AAG ACG TCA CTG TTC AGG AGT TGG
(SEQ ID NO 8)

LAKQ91 CCA ACT CCT GAA CAG TGA CGT CTT TCT TAT TCG
(SEQ ID NO 9)

LAKQ92 GAG ATA ATA AAG TTA TTA ACT CAG AAA ACA TG
(SEQ ID NO 10)

LAKQ93 CAT GTT TTC TGA GTT AAT AAC TTT ATT ATC TC
(SEQ ID NO 11)

LAKQ108 CGC GGA TCC GCG CGG CAC CAG GCC GCT GTT ATC
CGG AAA ATG CTC TTG C (SEQ ID NO 12)

LAKQ117 CCG GAT AAC AGC GCG CGT CAG CTA ACG AAC TCC
AGG CGC CCC GTC ACA GGA AGAA CGC CCG CAG GTC
CAA CTG CA (SEQ ID NO 13)

LAKQ118 GTT GGA CCT GCG GGC GTT CTT CCT GTG ACG GGG
CGC CTG GCA GTT CGT TAG CCT GAC GCG CGC TGT TAT
(SEQ ID NO 14)

Konstrukce plasmidů

Geny kodující Fab fragment obsahující variabilní domény myší protilátky C215 byly sestaveny způsobem popsaným dříve (Dohlsten et al., 1994). Klonování a mutagenese genu pro stafylokokový enterotoxin A (SEA) vedoucí k substitucím F47A a D227A byly popsány dříve (Abrahmsen et al., 1995). Do SEA genu byly vloženy tři další mutace za použití primerů LAKQ88-93 (všechny použité oligonukleotidy jsou uvedeny v tabulce I), což vedlo k získání SEA mutantu 57. LAKQ5 a LAKQ7 byly použity v RT-PCR pro vložení Kozakova boxu před sekvencí a pro klonování genu kodujícího signální peptid a extracelulární část lidského CD80 z celkové RNA extrahované z lidské sleziny. Bylo zjištěno, že nukleotidová sekvence odpovídá sekvenci CD80 uložené v genové bance (přírůstkové č. M27533). Byly připraveny dvě varianty genu pro CD80, které měly různá klonovací místa na 3'-konci: v jednotlivých PCR byly použity primery LAKQ30 a LAKQ108, pomocí kterých byla vložena BssHII nebo MroI místa. Fúsní gen kodující CD80 fúsovaný před kappa řetězcem pomocí Q-vazebné skupiny (Wooton et al., 1989), byl připraven insercí DNA linkeru LAKQ37/38 BssHII-Esp31 mezi relevantní CD80 gen a DsaI místo přímo před genem pro kappa řetězec. Plasmid pKGE987 byl získán insercí fúsního genu kodujícího CD80-(Q-linker)-kappa, před kterým byl signální peptid pro CD80, do vektoru, který kromě CMV promotoru a poly-A řetězce obsahoval gen pro resistenci na neomycin, který byl použit pro selekci transformantů. Poslední verze CD80 genu byla použita pro přípravu fúsního genu, kde je tento gen umístěn před fúsním genem pro Fd-SEA mutant 57: DNA fragment (LAKQ117/118) kodující Q-linker byl insertován mezi MroI místo genu pro CD80 a PstI místo v kodonu 4 a 5 v genu pro C215 VH. Tento fúsní gen byl insertován do druhého vektoru obsahujícího CMV promotor, za vzniku plasmidu pMB189, který koduje CD80 signální peptid a extracelulární část, po kterých

následuje - po vmezeřených 3 zbytcích GGP - Fd a SEA mutant 57. V plasmidu pKGE961 byl Fd gen insertován po signální sekvenci (odvozené z jiného myšího VH genu). Plasmid pMB156 koduje přirozený kappa řetězec, kterému předchází jeho přirozený signální peptid, a obsahuje gen resistance na neomycin.

Produkce

293 buňky ledvin křeččích embryí byly transfektovány buď pKGE961 a pKGE987, nebo pMB156 a pMB189, za zisku buněčných linií produkujících CD80-C215Fab a CD80-C215Fab-SEAm57, v příslušném pořadí. Pro získání stabilních buněčných medií bylo selekčním médiem DMEM bez fenolové červení (Pharmacia č. MS 0127) doplněné L-glutaminem (GIBCO BRL č. 25030-24), 10% telecím sérem a geneticinem 1 mg/ml. Produkčním médiem DMEM bez fenolové červení doplněné L-glutaminem a 0,1% HSA (Pharmacia Upjohn AB, Sweden). Fúsní proteiny byly přečištěny z filtrovaného (Sartrobran 0,65-0,4 μ m) kultivačního media afinitní chromatografií na protein G Sepharose FF (Pharmacia Biotech AB) a po ní následovalo anti-CD80 afinitní přečištění (imobilizovaná protilátka proti lidskému CD80; Camfolio L307.4) nebo iontoměničová chromatografie na SP Sepharose FF (Pharmacia Biotech).

Činidla: RPMII 1640 medium (Gibco, Middlesex, UK) doplněné 2 mM L-glutaminu (Gibco, Middlesex, UK), 0,1 M HEPES (Biological Industries, Israel), 1 mM NaHCO_3 (Biochrom KG, Berlin, Germany), 0,1 mg/ml gentamycinsulfatem (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), 1 mM pyruvatu sodného (JRH Biosciences, USA) a 10% tepelně inaktivovaným fetálním hovězím sérem ((Gibco, Middlesex, UK) bylo použito jako kompletní medium pro všechny buněčné kultury.

Protilátky: mAb proti lidskému CD57 (HNK1) a CD56 (HB55) byly

získány z hybridomních buněk produkujících mAb (American Type Culture Collection, Rockville, MD). mAb proti myššímu kappa řetězci značená PE byla získána od Becton Dickinson (San Jose, CA).

Buňky: K1 buňky ovarii čínského křečka (CHO) byly transfektovány lidskou cDNA kodující CD28 ve Pharmacia-Upjohn, Stockholm, Sweden. Transfektanty byly rutině analyzovány na expresi CD28 a byly udržovány pomocí FACS třídění na podobných úrovních exprese antigenu. Lidská buněčná linie Colo205 karcinomu tlustého střeva byla získána z ATCC. Žádná buněčné linie neobsahovala mykoplasmata.

Test proliferace T-lymfocytů: T buňky byly získány z lidských mononukleárních buněk periferní krve (PBM) způsobem popsaným dříve (Lando et al., 1996) negativní selekcí provedenou panoramováním s CD57, HLA-Dr4, CD14 a CD56 mAb. Všechny testy na T-buňkách byly provedeny s $0,1 \times 10^6$ buněk/jamku v objemech 200 μ l, za použití 96-jamkových ploten s oblým dnem (Nunc, Roskilde, Denmark). Syntéza DNA byla studována po expozici buněk (^3H)-thymidinu ((^3H)-TdR (0,5 mCi/jamku) způsobem popsaným dříve (10).

Analýza průtokovou cytometrií. Průtoková cytometrie a třídění byly provedeny standardním způsobem na FACStar^{plus} průtokovém cytometru (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Vzhledem k nízké afinitě CD80 k CD28 byla barvení CHO-CD28 buněk CD80-C215Fab fúsními proteiny provedena za vynechání promývání buněk.

Testy na cytokiny. Produkce IL-2 byla analyzována za použití IL-2 ELISA kitu (huIL-2 DuoSet, Genzyme).

Výsledky

Popis CD80-Fab fúsních proteinů. Fab skupina je myší IgG1/k izotyp, ačkoliv obsahuje variabilní domény IgG2A/k monoklonální protilátky C215 (Dohlsten et al., 1995). Tripeptidová sekvence GGP následuje v CH1 doméně po cysteinu vytvářejícím meziřetězcové disulfidové můstky. V CD80-C215Fab-SEAm57 fúsním proteinu působí jako oddělující skupina mezi Fd a mutantním stafylokokovým enterotoxinem A (SEA; Betley et al., 1988) majícím 5 substitucí. Substituce F47A a D227A byly vloženy pro snížení afinity pro MHC antigeny třídy II (Abrahmsen et al., 1995), a substituce N102Q, N149D a T218V byly vloženy pro zabránění náhodné glykosylaci při produkci v eukaryotických buňkách. Tyto poslední uvedené substituce byly vybrány pomocí rentgenové struktury (Sundstrom et al., 1996). Konečný penta-mutant byl označen SEA mutant 57. Oba fúsní proteiny obsahují extracelulární doménu lidského CD80 (definovanou na konec FPDN). Byl použit přirozený CD80 signální peptid a bylo zjištěno, že zralý protein začíná VIHIV, jak bylo stanoveno sekvenováním aminokyselin přečištěného CD80-C215Fab. Vmezeřená sekvence 18 aminokyselin spojuje CD80 s kappa řetězcem v CD80-C215Fab, nebo s Fd částí Fab fragmentu v CD80-C215Fab-SEAm57 trojitým fúsním proteinu. Vmezeřená sekvence se podobá Q-vazebné skupině (Wooton et al., 1996) a má sekvenci SARQANELPGAPSQEERA (SEQ ID NO: 15) a SARQANELPGAPSOEERP (SEQ ID NO: 16), v příslušném pořadí.

FACS analýza: Vazba CD80-C215Fab fúsních proteinů na CD28 pozitivní buňky a na C215 pozitivní buňky

CD28 pozitivní buňky: CHO-CD28 buňky byly barveny CD80-C215Fab, CD80-C215Fab-SEAm57 nebo C215Fab-SEA a potom následovala inkubace s mAb proti myššímu kappa řetězci značenou PE. Barvení bylo provedeno při 4 °C bez jakýchkoliv promytí. Jak CD80-C215Fab, tak

trojitý fúsní protein se vázaly na CD28 exprimované na CHO buňkách způsobem závislým na dávce. Žádné barvení nebylo pozorováno, jak bylo očekáváno, při použití kontrolního fúsního proteinu C215Fab-SEA.

C215 pozitivní buňky: Vazba fúsních proteinů na C215 antigen byla hodnocena za použití Colo205 buněk. Colo205 buňky byly barveny CD80-C215Fab, CD80-C215Fab-SEAm57 nebo C215Fab-SEA a potom následovala inkubace s mAb proti myššímu kappa řetězci značenou PE. Barvení bylo provedeno při 4 °C se třemi proplachy mezi každým krokem barvení.

Výsledky: Jak CD80-C215Fab, tak CD80-C215Fab-SEAm57 se vázaly na Colo205 buňky exprimující C215 antigen způsobem závislým na dávce. Vazba byla 50-100-krát nižší než vazba C215Fab-SEA. Tato skutečnost ukazuje na to, že vložení CD80 v N-koncové části fúsního proteinu může interferovat s vazbou C215Fab části na C215 antigen.

Duální fúsní proteiny: Současná stimulace superantigenem aktivovaných T-buněk

Pro stanovení biologické aktivity fúsních proteinů byly tyto proteiny testovány na stimulaci superantigenem aktivovaných T buněk.

Proliferace: T buňky byly inkubovány s Colo205 buňkami a 4 μ M C242Fab-SEA a různými množstvími CD80-C215Fab po dobu 4 dnů, po kterých byla měřena inkorporace ^{3} H-thymidinu. Aktivita získaná bez jakékoliv CD80-C215Fab byla 20039 cpm $\pm$ 1750.

Produkce IL-2. T buňky byly inkubovány s Colo205 buňkami a 4 μ M C242Fab-SEA a různými množstvími CD80-C215Fab po dobu 4 dnů, po

kterých byl odebrán supernatant a bylo stanoveno množství IL-2. Množství IL-2 získané bez jakékoliv CD80-C215Fab bylo 2849 pg/ml.

Výsledky (obr. 3 - 4): CD80-C215Fab stimuluje C242Fab-SEA indukovanou aktivaci T buněk způsobem závislým na dávce, což se projeví proliferací a produkcí IL-2.

Trojité fúsní proteiny: Současná stimulace superantigenem aktivovaných T-buněk

Pro stanovení biologické aktivity trojitých fúsních proteinů byly přečištěné T buňky inkubovány s C215Fab-SEAm23 (m23 je stejný SEA mutant ovlivňující vazbu na MHC antigeny II. třídy jako je mutant použitý v trojitém fúsním proteinu, t.j. Phe47Ala/Asp227Ala) nebo s CD80-C215Fab-SEAm57 presentovanými na Colo205 buňkách. Proliferace: Inkorporace ^3H -thymidinu byla měřena po 4 dnech. Produkce IL-2: Supernatanty byly odebírány po 4 dnech a byl stanoven obsah IL-2.

Výsledky (obr. 5 - 6): Trojitý fúsní protein =indukoval aktivaci T-buněk a produkci IL-2, když byl presentován na Colo205 buňkách. Žádná taková aktivita nebyla pozorována pro C215Fab-SEAm23, což ukazuje na význam současné stimulace CD80 pro aktivaci. Z důvodů nízké vazebné afinity trojitého fúsního proteinu (50-100 x nižší než je vazebná aktivita C215Fab-SEA, viz FACS data) je skutečné množství C215Fab-SEAm23 navázaného na buňky pravděpodobně významně vyšší než množství navázaného trojitého fúsního proteinu.

Příklad 2: Specificky působící IL-2 potencuje a prodlužuje účinek FabSEA na aktivaci T buněk a v protinádorové terapii

Metody a materiály:

Konstrukce IL-2 expresních plasmidů: IL2 cDNA byla klonována RT-PCR za použití mRNA izolované z mononukleárních buněk lidské periferní krve (PBM), které byly stimulovány superantigenem SEA po dobu 24 hodin. mRNA byla izolována z 5×10^6 buněk za použití mRNA Direct kitu od Dynal, Oslo, použitého podle návodu výrobce. mRNA tepelně navázaná na oligo(dT)₂₆-potažené magnetické korálky byla eluována zahřátím na 95 °C. Potom byl PCR produkt získán RT-PCR, za využití RT a DNA polymerasových aktivit Taq polymerasy. 1/10 eluované mRNA byla smíšena s PCR primery IL2-1 a IL2-2 a byla provedena standardní PCR reakce (30 cyklů). Produkt PCR byl podroben elektroforese na agarosovém gelu, proužek byl excidován z gelu a byl přečištěn za použití Prep-a-gene kitu (Bio-Rad). Po trávení EcoRI a BamHI byl fragment klonován do EcoRI/BamHI tráveného pBluescript KS II. Insert byl sekvenován a bylo potvrzeno, že je identický s dříve popsanou cDNA pro IL2 (Taniguchi et al., 1983). Nicméně, v důsledku PCR reakce byl na 5' konec segmentu kodujícího zralý lidský IL-2 přidán DNAsegment kodující Gly-Pro-Arg-Gln-Ala-Asn-Glu-Leu-Pro-Gly-Ala-Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Arg (SEQ ID NO: 23) - "Gly-Pro-Q-linker". Q-hIL2 byl klonován do plasmidu našeho souboru (tráveného RsrII-XbaI) jako RsrII-NheI fragment. Výsledný plasmid, pMS306, řídí sekreci C215Fab-SEA-Q-hIL2 do periplasmy E. coli. Spojovací skupiny mezi skupinami byly dále optimalizovány následujícím způsobem. Region kodující spojovací skupinu, kodující Pro-Ala-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ala-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO: 19) (nahrazující původní Gly-Gly-Pro) byl pomocí místně cílené mutagenese vložen mezi superantigen a regiony kodující Fab skupinu. Podobně, spojovací skupiny Gly-Pro-Arg-Gln-Ser-Asn-Glu-Thr-Pro-Gly-Ser-Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Arg (SEQ ID NO: 20), Gly-Pro-Arg-Gln-Ala-Lys-Thr-Leu-Pro-Gly-Ala-pro-Ser-Gln-Thr-Thr-Arg (SEQ ID NO: 21) nebo Gly-Pro-Thr-Glu-Ala-Asp-Glu-Leu-Pro-Gly-Ala-Pro-Ser-Glu-Glu-Glu-Thr (SEQ ID NO: 22) nahrazují původní Q-spojovací skupinu mezi IL-2 a Fab skupinou. Pro

kombinace duálních fúsních proteinů byly také srovnávány konstrukty s IL-2 fúsovaným na těžký nebo lehký řetězec.

IL2-1:

Primery 5'-GCG GAT CCC GGT CCG CGT CAG GCT AAC GAA CTG CCA
GGA GCT CCG TCT CAG GAA GAG CGT GCA CCT AC TTC
AAG TTC TAC AAA G-3' (SEQ ID NO 17)

IL2-2:

5'-CCG AAT TCG CTA GCT TAT CAA GTT AGT GTT GAG ATG
AT-3' (SEQ ID NO 18)

Expresse fúsních proteinů ve fermentační nádobě. Fúsní proteiny byly exprimovány v *E. coli* K-12 kmenu UL 635 (xyl-7, ara-14, T4^R, deltaompT) za použití plasmidu s genem pro resistenci na kanamycin a lacUV5-promotorem. Bakterie ze zmrazených zásob byly inkubovány za třepání při 25 °C po dobu přibližně 21 hodin ve zkumavkách obsahujících (g/l): (NH₄)₂SO₄, 2,5; KH₂PO₄, 4,45; K₂HPO₄, 11,85; citrat sodný, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 1; monohydrat glukosy, 11; 0,11 mM kanamycinu a 1 ml/l roztoku stopových prvků (Forsberg et al., 1989), nicméně bez Na₂MoO₄.2H₂O. Buňky byly kultivovány do OD₆₀₀ 1-2 a 450 ml kultivačního media bylo použito pro inokulaci fermentační nádoby (Chemap, Switzerland) v konečném objemu 5 l. Fermentační medium obsahovalo (g/l): (NH₄)₂SO₄, 2,5; KH₂PO₄, 9,0; K₂HPO₄, 6,0; citrat sodný, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 1; monohydrat glukosy, 22; 0,11 mM kanamycinu; 1ml adekanolu (Asahi Denka Kogyo K.K., Japan) a 1 ml/l roztoku stopových prvků. pH bylo udržováno na 7,0 titrací s 25% amoniakem, teplota byla 25 °C a vzduchování bylo prováděno atmosférickým vzduchem při 5 l/min. Parciální tlak rozpuštěného O₂ byl kontrolován na 30% tak, že byla zvýšena agitace z 300 rpm na 1000 rpm během vsádkové fáze a regulováním dodávání 60% (hmot./obj.) glukosy během fermentační fáze. Tvorba produktu byla indukována při OD₆₀₀ = 50 přidáním 0,1 mM isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosidu, IPTG. Po fermentaci byly buňky odstraněny centrifugací při 8000 x g po dobu 40 minut při 4

°C. Pročištěné medium bylo potom buď analyzováno a přečištěno, nebo uskladněno při -20 °C.

Přečištění fúsních proteinů. DNA přítomná v pročištěném mediu byla odstraněna srážením s 0,19% polyethyleniminem a 0,2 M NaCl během 30 minut (Atkinson and Jack, 1973). Po centrifugaci, jak byla uvedena výše, byl odebrán supernatant a koncentrace NaCl byla upravena na 0,5 M. Toto medium bylo aplikováno do Protein G Sepharose kolony (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) uvedené do rovnováhy 10 mM fosforečnanem sodným, 150 mM NaCl, pH 7,4, obsahujícím 0,05% Tween 80, PBST. Kolona byla potom promyta 5 objemy kolony PBST a navázaný protein byl eluován 0,1 M kyselinou octovou, 0,02% Tween 80, pH 3,2. pH vzorku bylo upraveno na pH 5,0 pomocí 1 M Tris-HCl, pH 8,0, a vzorek byl aplikován na SP Sepharose HP kolonu (Pharmacia Biotech) uvedenou do rovnováhy 50 mM octanem amonným, 0,02% Tween 80. Kolona byla potom promyta 2 objemy kolony pufru pro uvedení do rovnováhy a fúsní protein byl eluován za použití lineárního gradientu od 50 do 500 mM octanu amonného v 10 objemech kolony. Pro C215Fab-IL2 fúsní proteiny bylo použito pH 6,0, zatímco pro C215Fab-SEA-IL-2 trojitě fúsní proteiny bylo v průběhu separace použito pH 5,7. Fúsní proteiny byly filtrovány přes 0,22 μ m filtr a byly uskladněny při -70 °C. Při vyšším zředění je eluat koncentrován na konečnou koncentraci 0,5 - 1,0 mg/ml za použití Centricon 30 (Amicon) podle návodu výrobce.

Testy cytotoxicity. Testy cytotoxicity závislé a nezávislé na MHC antigenech II. třídy byly provedeny dříve popsáním způsobem (Dohlsten et al., 1990). Stručně, pro test cytotoxicity závislé na MHC antigenech II. třídy byly ^{51} Cr-značené Raji buňky (2500 buněk na jamku v konečném objemu 200 μ l) smíseny se SEA-dependentní efektorovou buněčnou linií vytvořenou inkubací lidských PBM v přítomnosti nízkých hladin rekombinantních hIL-2. Poměr

efektorových ku cílovým buňkám byl 30:1. Pro test cytotoxicity nezávislé na MHC antigenech třídy II byly ^{51}Cr -značené C215⁺ Colo205 buňky (2500) inkubovány s SEA-dependentními efektorovými buňkami v poměru efektorových ku cílovým buňkám 45:1. ^{51}Cr uvolněný do media byl stanoven po 4 hodinách inkubace scintilačním čítačem.

Test in vitro ko-stimulace na přečištěných lidských T-buňkách

Naivní lidské T buňky byly přečištěny způsobem popsáním v Lando et al., 1993. Stručně, naivní lidské T buňky byly přečištěny z PBM lidské krve centrifugací s Ficollovým gradientem, po které následovala separace na želatinových kolonách a nakonec negativní selekce panoramováním v Petriho miskách obsahujících HNK1 a HLA-DR mAb. Testy proliferace za použití naivních lidských T buněk byly provedeny v podstatě způsobem, který popsal Lando et al., (1996). Stručně, naivní lidské T buňky (100000 buněk na jamku) byly kombinovány s ozářenými CHO transfektanty (10000 buněk na jamku) v celkovém objemu 200 μl RPMI-1640 s doplňky (Lando et al., 1993). Pro pokusy s fúsními proteiny obsahujícími IL-2 byly buňky inkubovány po dobu 7 dnů v přítomnosti 1 nM uvedených substancí. V poslední den pokusu byly buňky podrobeny pulsu ^3H -thymidinu pro měření jeho inkorporace do DNA dělících se buněk.

Terapie B16-C215 nádorů. Terapie byla provedena způsobem popsáním dříve (Dohlsten et al., 1994; Hansson et al., 1997). V den 0 bylo C57B1/6 myším injikováno i.v. do ocasní žíly 75000-150000 syngenních B16-F10 melanomových buněk. Tyto B16 buňky exprimují lidský GA-733 antigen rozpoznávaný C215 mAb. V den 1, 3 nebo 5 byla zahájena terapie C215Fab proteiny. V den 21 byl pokus ukončen, myším byly odstraněny plíce a byl stanoven počet plicních metastas.

Imunohistochemické vyšetření bylo provedeno na plících zvířat mající 18-denní B16-C215 nádory způsobem popsaným dříve (Dohlsten et al., 1995). Vzorky byly odebírány 4 hodiny po poslední injekci. Nabarvená plocha byla stanovena manuálně.

Imunofarmakologie byla provedena dříve popsaným způsobem (Rosendahl et al., 1996). Sleziny od C57 B1/6 myši, které dostaly 1 nebo 3 injekce, jednou denně, byly odebrány 48 hodin po poslední injekci a za použití Raji buněk jako cílových buněk byla stanovena SEA-dependentní cytotoxicita v standardním testu uvolňování ^{51}Cr , jak byl popsán výše. Poměr efektorových k cílovým buňkám byl 100:1.

Výsledky a diskuse:

Produkce a přečištění fúsních proteinů obsahujících IL-2. Byl konstruován E. coli expresní vektor obsahující C215Fab-SEA-Q-hIL2 trojitý fúsní protein. Tento vektor koduje dvě podjednotky trojitého fúsního proteinu na bicistronické mRNA transkribované z LacUV5 promotoru. Každé ze dvou podjednotek předchází signální peptid řídící export do periplasmatického prostoru E. coli. První podjednotka je VH C215Fab následovaná Gly-Gly-Pro spojovací skupinou (VH- C_H1-Gly-Gly-Pro-SEA). Druhá podjednotka je VK C215Fab, po které následuje CK C242Fab, která je navázána na lidský IL2 Gly-Pro-Q-spojovací skupinou (Vk-Ck-Gly-pro-Q-hIL2). Gly-Pro-Q spojovací sekvence (SEQ ID NO: 23) je mírně modifikovanou verzí přirozené spojovací sekvence nacházené v OmpR proteinu E. coli (Wooton et al., 1989). Pro podrobnější informace viz Materiály a metody. Také byl připraven C215Fab-Q-hIL2 fúsní protein. Tento protein je identický s C215FabSEA-Q-hIL2 s tou výjimkou, že Gly-Gly-Pro-SEA skupina proteinu byla odstraněna. Také je deletována příslušná DNA sekvence v expresním vektoru. Mutované deriváty C215FabSEA-Q-hIL2

byly připraveny PCR -zprostředkovanou místně cílenou mutagenesí za použití standardních metod, za zisku mnoha proteinů jako je C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2 a C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2_{F42A}. V posledních variantách trojitého fúsního proteinu je mezipodjednotkový cystin nahrazen dvěma seriny. Tato alterace neovlivňuje vazebnou aktivitu.

Plasmidy kodující proteiny obsahující IL-2 byly transformovány do E. coli produkčního kmene UL635 a potom byla provedena fermentace. Fúsní proteiny byly přečištěny z kultivačního media za použití protein G afinitní chromatografie. Degradované varianty fúsních proteinů byly odstraněny za použití iontoměničové chromatografie. Získané produkty byly alespoň 90% kompletní fúsní proteiny, jak bylo stanoveno SDS-PAGE (materiály a metody). Za použití optimálního návrhu fúsního proteinu je v kultivačním mediu získáno až 130 mg/ml fúsního proteinu a obvykle je získáno 70 mg trojitého fúsního proteinu z 1 litru media.

Funkční charakterizace Fab fúsních proteinů obsahujících IL-2. Schopnost fúsních proteinů obsahujících IL-2, jako jsou fúsní proteiny C215FabSEA-Q-hIL2 a C215Fab-Q-hIL2, indukovat proliferaci IL-2 dependentní myší buněčné linie CTLL-2, byla v podstatě stejná, jako schopnost rekombinantního lidského IL-2 (při molárním srovnání, data nejsou uvedena). Kromě toho, bylo zjištěno, že antigen-vazebná a SEA aktivita C215Fab-SEA-Q-hIL2 a C215FabSEA jsou nerozlišitelné v mnoha testech, což naznačuje, že neexistují nežádoucí účinky vložení IL-2 do molekuly. Tyto testy zahrnují schopnost indukovat zabíjení C215⁺ lidské buněčné linie nádoru tlustého střeva Colo205 SEA-reaktivní T-efektorovou buněčnou linií nezávislou na antigenech MHC třídy II ve 4 hodinovém testu uvolňování ⁵¹Cr. Také zabíjení Raji (krysích lymfomových) buněk SEA-reaktivní T-efektorovou buněčnou linií závislé na antigenech MHC třídy II bylo provedeno se stejnou

účinností (data nejsou uvedena). Přímější důkaz pro nekompromitovaný C215 antigen a vazbu na MHC antigeny třídy II byl získán FACS analýzou. Bylo zjištěno, že závislost vazby C215FabSEA a C215FabSEA-Q-hIL2 na Raji buňky na dávce je podobná při molárním srovnání (data nejsou uvedena). Také bylo zjištěno, že závislost vazby C215FabSEA-Q-hIL2 a C215Fab-Q-hIL2 na Colo205 buňky na dávce je podobná závislosti pozorované pro C215FabSEA (data nejsou uvedena), což ukazuje na to, že vazba antigenu nebyla ve fúsních proteinech obsahujících IL2 narušena.

IL-2 závislá proliferace indukovaná FabSEA. Klidové lidské T buňky vyžadují pro spuštění optimální proliferace a aktivace jak signál 1, tak signál 2 (Schartz, 1990). Superantigeny mohou dodávat signál 1, pokud jsou presentovány na buňkách. IL-2 je hlavním následným efektozem B7/CD28 signalizace a předpokládá se, že dává signál 2.

Prokázali jsme za použití klidových lidských T buněk přečištěných z lidské krve, že C215FabSEA-Q-hIL2 trojitý fúsní protein nebo C215FabSEA v kombinaci s C215FabSEA-Q-hIL2 trojitým fúsním proteinem nebo rekombinantním IL-2 skutečně indukuje proliferaci T buněk in vitro (obr. 7).

Klidové lidské T buňky byly inkubovány s cílovým SEA (C215FabSEA nebo C215FabSEA-Q-hIL2) v přítomnosti IL2 (ve formě C215Fab-Q-IL2, C215FabSEA-Q-hIL2 nebo rekombinantního lidského IL2). SEA byl presentován na ozářených CHO buňkách transfektovaných C215 antigenem (prostřednictvím Fab části), MHC antigenem třídy II/Dr, který váže SEA. Netransfektované CHO buňky byly použity jako kontrola. Po 7 dnech inkubace T buněk s CHO transfektanty a uvedenými substancemi byla měřena proliferace pomocí inkorporace ^3H - thymidinu do DNA.

C215FabSEA-Q-hIL2 indukoval proliferaci lidských T buněk, pokud byl presentován na CHO buňkách transfektovaných lidským C215 antigenem (CHO-C215), proti kterému je namířen Fab (obr. 7). Podobně byla proliferace indukována tehdy, když byl protein presentován na CHO-Dr (lidský MHC antigen třídy II), zatímco žádná proliferace nebyla pozorována v přítomnosti netransfektovaných CHO buněk (CHO) nebo za absence CHO buněk (R10). C215FabSEA nebo C215Fab-Q-hIL2 neindukovaly sami o sobě jakoukoliv proliferaci, když byly presentovány na CHO buňkách, což naznačuje, že jak SEA, tak IL2 jsou skutečně nezbytné pro indukci proliferace. Tato skutečnost byla potvrzena tím, že kombinace C215FabSEA a C215Fab-Q-hIL2 nebo C215FabSEA a rekombinantní lidský IL2 indukovala kvalitativně podobný účinek jako C215FabSEA-q-hIL2. Tento test také ukazuje, že IL-2 je nezbytný, ale že nemusí být navázán na buňku.

C215FabSEA-Q-hIL2, stejně jako kombinace C215FabSEA a C215Fab-Q-hIL2, způsobuje zesílení a prodloužení aktivace T-buněk a zlepšení infiltrace nádoru in vivo.

Jak C215Fab-Q-hIL2 + C215FabSEA, tak C215FabSEA-Q-hIL2 jsou mnohem silnějšími induktory aktivace T buněk než C215FabSEA, jak bylo měřeno schopností indukovat SEA-dependentní zabíjení cílových buněk (obr. 8). Stručně, myším byly podány 1 - 3 injekce uvedených proteinů, 1-krát denně. Dva dny po poslední injekci byly odebrány sleziny od léčených myší a ve standardním 4-hodinovém testu uvolňování ^{51}Cr byla stanovena cytotoxická aktivita proti SEA-potaženým Raji buňkám.

Jak C215FabSEA-Q-hIL2, tak C215FabSEA/C215Fab-Q-hIL2 indukovaly nejen zesílenou, ale také prodlouženou aktivaci T-buněk. Sérové koncentrace cytokinů jako je IFN-gamma, které rychle klesají po čtvrté injekci C215FabSEA, zůstávají velmi

vysoké i po čtvrté injekci C215FabSEA-Q-hIL2 (data nejsou uvedena). Obecně, koncentrace IFN gamma a TNF-alfa byly mnohem vyšší (více než 10-krát) než koncentrace zjištěné pro C215FabSEA.

Zlepšená terapie rozvinutých B16-C215 nádorů kombinací C215FabSEA a C215Fab-Q-hIL2. Vliv IL-2 potenciace na FabSag protinádorovou terapii byl zkoumán na myším modelu B16 melanomu (obr. 9). V uvedeném příkladu byly 8-12 týdenní C57 B1/6 myši samice inokulovány v den 0 150000 B16 buňkami transfektovanými lidským nádorovým antigenem GA-733, proti kterému je namířena C215 mAb (B16-C215 v následujícím popisu). Uvedené substance byly injekčně podány v dny 5, 6 a 7. Každý údaj odpovídá 7 zvířatům. V den 21 byla zvířata utracena a bylo stanoveno množství melaninem pigmentovaných B16 nádorů v plících. Bylo prokázáno, že kombinace C215FabSEA a C215Fab-Q-hIL2 v několika pokusech indukuje lepší terapii než C215FabSEA, při srovnání s neléčenou kontrolní skupinou (obr. 9). V uvedeném pokusu měla kombinace C215FabSEA/C215Fab-Q-hIL2 lepší terapeutický efekt než C215FabSEA-Q-hIL2 trojitý fúsní protein.

Následující imunohistochemické studie ukázaly, že C215FabSEA samostatně nebo kombinace C215FabSEA a C215Fab-Q-hIL2 způsobují podobné zvýšení B16-C215 tumor-infiltrujících CD4 a CD8 T buněk. Zajímavé je, že počet CD25 (IL2Ra) pozitivních buněk - které jsou dobrým markerem aktivace T buněk - se dramaticky zvýšil mezi 3. a 4. injekcí C215FabSEA/C215Fab-Q-hIL2 (obr. 10). Naopak, počet těchto buněk se snížil v případě C215FabSEA, což ukazuje na začínající anergii. Kvalita infiltrujících T buněk se tak zdá být vyšší v případě kombinované léčby než léčby C215FabSEA samostatně, což může vysvětlovat lepší terapeutický efekt. Podobně, sérové cytokiny, jako je interferon γ , produkované sekundárně při aktivaci T buněk, se značně snižují po 4. injekci FabSEA (obr. 11). Při podávání FabSEA-Q-hIL2 trojitého fúsního

proteinu zůstávají koncentrace interferonu vysoké i po 4. injekci. Toto pozorování dále potvrzuje, že obsažení IL-2 v konstruktu může působit proti Fab-SEA indukované anergii T buněk.

Zlepšená terapie B16-C215 nádorů C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2. Superantigeny jsou mnohem více toxické u lidí než u myší, částečně proto, že afinita pro MHC antigeny třídy II je u lidí významně vyšší (Hansson et al., 1997). Proto se předpokládá, že systémová toxicita FabSEA proteinů je hlavní limitací terapie u lidí. Jedním způsobem pro zvýšení lokální aktivity v nádoru (Fab-dependentní) oproti systémové aktivaci imunity (SEA-MHC třídy II dependentní) může být snížení afinity SEA pro MHC antigeny třídy II. Na základě krystalické struktury SEA jsme vyrobili mutant C215FabSEA, C215FabSEA_{D227A}, se 100-krát sníženou afinitou pro MHC antigeny třídy II. Oproti přirozenému C215FabSEA nemá kapacitu pro zesílení MHC molekul třídy II, které je pravděpodobně hlavní příčinou SEA-zprostředkované systémové toxicity (Hansson et al., 1997).

Terapeutické okno mezi účinnou terapií a systémovou toxicitou při léčbě jednodenních B16-C215 nádorů u Vb3 TCR transgenních myší bylo alespoň 50-krát širší pro C215FabSEA_{D227A} mutant ve srovnání s C215FabSEA (Hansson et al., 1997). V souladu s tímto pozorováním ukázalo imunohistochemické vyšetření, že dávky těchto dvou proteinů vedly ke srovnatelné terapii, srovnatelné imunitní aktivaci v nádoru, ale mnohem menší systémová aktivace imunitního systému ve slezině byla pozorována při podání C215FabSEA_{D227A} (Hansson et al., 1997). Kromě toho, farmakokinetické studie na králících ukázaly dramatickou redukci v nasměrování C215FabSEA_{D227A} do sleziny a jiných lymfatických orgánů, ve kterých je umístěna většina MHC třídy II pozitivních buněk, ve srovnání s C215FabSEA (data nejsou uvedena).

Pro klinické použití se předpokládá, že Fab-SEA-IL2 trojitý fúsní protein bude obsahovat mutovaný superantigen. Proto jsme připravili C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2 trojitý fúsní protein. Připravený protein byl schopen indukovat proliferaci klidových lidských T buněk (data nejsou uvedena) a indukoval prodlouženou SEA-dependentní CTL aktivitu u myší při až 6 injekcích (obr. 12). Naopak, základní CTL aktivita byla pozorována pro C215FabSEA_{D227A} (< 10% - data nejsou uvedena) a C215Fab-Q-hIL2 (< 15% - data nejsou uvedena). Terapie rozvinutých (3 denních) B16-GA733 nádorů u normálních C57 B1/6 myší 8 injekcemi tohoto proteinu podávanými denně byla stejně dobrou léčbou jako optimální dávka C215FabSEA (obr. 13). V tomto systému měl C215FabSEA_{D227A}, který je navržen pro optimální aktivitu u lidí, ne u myší, pouze malé účinky (obr. 13). Při nejvyšší dávce byla nicméně zaznamenána určitá toxicita C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2. Oproti tomu, několik terapeutických pokusů ukázalo, že kombinace C215FabSEA_{D227A} a C215Fab-Q-hIL2 (8 injekcí) také vede k významně lepší terapii 3-denních B16-GA733 nádorů u Vb3 TCR transgenních myší ve srovnání s C215FabSEA_{D227A} samostatně (data nejsou uvedena). U Vb3 TVR transgenních myší >90% T buněk reaguje se SEA, oproti 10-20% u normálních myší. Zajímavé je, že u králíků se opakované injekce (až 8) C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2 (0/4 králíků zemřelo po opakovaných injekcích v dávce 20 µg/kg) nezdály být více toxické než C215FabSEA_{D227A} bez IL2 (0/4 králíků zemřelo po opakovaných injekcích v dávce 20 µg/kg; 4/4 zemřelo při dávce 20 µg/kg) a byly mnohem méně toxické než C215FabSEA (1/4 králíků zemřel po opakovaných injekcích v dávce 1 µg/kg). Ve stejnou dobu je prodloužená aktivace imunitního systému (efekt aktivace lymfocytů) pozorována pouze po léčbě C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2, ale ne po léčbě C215FabSEA_{D227A} nebo C215FabSEA, což ukazuje, že obsažení IL-2 skutečně působí proti FabSEA-indukované anergii T-buněk (data nejsou uvedena).

Terapie B16-C215 nádorů C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2 proteiny obsahujícími mutovaný IL2. Vyšší toxicita a v případě C215FabSEA-Q-hIL2 nižší terapeutická účinnost trojitých fúsních proteinů obsahujících IL-2 může být částečně způsobena "přesměrováním" SEA aktivity do lymfatické tkáně. Toto přesměrování je způsobeno vysokou afinitou IL-2 ($K_d = 10 \text{ pM}$) k jeho receptoru, který se nachází zejména na T-buňkách ve slezině a jiných lymfatických tkáních. Pro vyřešení tohoto problému jsme připravili derivát C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2, ve kterém je IL2 skupina mutována tak, aby byla snížena její afinita k IL2R⁺ buňkám a proto i systémová aktivace. V podstatě stejný přístup byl použit pro zlepšení terapeutického okna pro C215FabSEA_{D227A} protein.

Interakce mezi IL-2 a jeho vysokoafinitním receptorem je velmi dobře prostudována. Receptor se skládá ze tří podjednotek, α , β a γ . Pro biologickou aktivitu je nutné zesíťení β a γ , zatímco α podjednotka je nutná pro optimální vazbu. Naší strategií je redukovat afinitu IL-2 k jeho vysokoafinitnímu receptoru ($\alpha\beta\gamma$) eliminací vazby na α -podjednotku, za zachování vazby na β a γ podjednotku, pokud je to nutné.

Byly připraveny tři takové mutanty C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2 s eliminovanou vazbou na IL2R α (F42A, F42K) a s narušenou vazbou na IL2R β (F42A/D20S). Tyto proteiny mají 100-krát (F42A), 1000-krát (F42K) a 3000-krát (F42A/D20S) redukovanou aktivitu, v příslušném pořadí, v indukci proliferace IL-2 dependentní myší buněčné linie CTLL-2. Pokračují pokusy o stanovení detailnějších vlastností těchto proteinů, zejména s ohledem na jejich afinitu a rychlost vazby na aktivované lidské T-buňky a IL-2 receptor. Počáteční terapeutické pokusy ukázaly, že tato strategie je slibná (obr. 14, obr. 15). V uvedených příkladech bylo 8 injekcí podáno Vb3 TCR transgenním myším (u kterých je >90% T buněk

aktivováno SEA) nesoucích 3 denní B16-GA733 nádory. Ačkoliv při nejvyšších dávkách byla stále ještě pozorována určitá toxicita, objevovala se později při použití C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2_{F42A} nebo C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2_{F42K} (8. injekce) než při použití C215FabSEA_{D227A}-Q-hIL2 (6. injekce) a léčba nejvyšší dávkou vedla k více než 90% redukci nádoru ve srovnání s kontrolou léčenou PBS (obr. 14). Nyní probíhá výzkum tohoto slibného přístupu pomocí vkládání dalších mutací do SEA a IL2 částí pro další zlepšení terapeutického indexu.

Kromě toho pokračuje snaha o výrobu C215FabSEA-Q-hIL2 trojitých fúsních proteinů obsahujících Thr51Pro mutaci v IL-2 části (Chang et al., 1996). Tato mutace může sloužit pro blokování IL2R-zprostředkované internalizace fúsního proteinu bez redukce biologické aktivity IL-2. Toto je pravděpodobně důležité, protože je takto možno odstranit fúsní protein touto dráhou a tak je možno zvýšit lokální koncentrace a účinnost léčiva. Thr51Pro mutované proteiny mohou obsahovat další mutace v SEA a IL-2 částech sloužící pro redukci afinity pro MHC antigeny třídy II a IL-2 receptor, v příslušném pořadí.

Příklad 3: Pokusy pro potvrzení efektů (Sag,IM)-konjugátů. Cílové buňky pozitivní na IM.receptor nebo buňky pozitivní na MHC antigeny II třídy

Sag-IM molekula se může vázat na buňky exprimující MHC antigeny třídy II, což usnadňuje SDCC. Alternativně mohou být cílem buňky exprimující receptor pro IM. Je proto možné, že Sag-IM molekula může být užitečná pro indukci zabíjení nežádoucích buněk exprimujících receptor pro IM.

C215FabSEA-hIL2 trojitý fúsní protein může být považován za Sag-IM molekulu v případě, že ani efektorové, ani cílové buňky

neexprimují antigen rozpoznávaný C215Fab. Efektorovými buňkami mohou být T buňky V β podtypu. Cílovými buňkami mohou například být aberantní hematopoetické buňky exprimující receptor pro IL2, jako jsou například buňky některých leukemií a lymfomů.

Pokus A. In vitro potvrzení. Efektorové T buňky (lidské T buňky opakovaně stimulované Sea) a cílové buňky (f.ex. lidské "Raji" B lymfomové buňky) se inkubují s C215FabSEA-hIL2 trojitým fúsním proteinem mutovaným tak, že má redukovanou vazbu na MHC antigeny třídy II. Toto je provedeno standardním postupem pro SDCC testy (efektorové buňky, Raji buňky, pokusné substance). Zjistili jsme, že C215FabSEA_{D227A}-hIL2 protein s těžce redukovanou afinitou pro MHC antigeny třídy II má přibližně 10-krát vyšší účinnost než C215FabSEA_{D227A} v zabíjení Raji buněk. Vysvětlením zvýšené účinnosti je to, že trojitý fúsní protein je prezentován na IL2receptorech exprimovaných na Raji buňkách.

Pokus B. In vivo potvrzení. Myší lymfomové modely (jako je RBL-5 lymfom u C57 B1/6 myší) jsou v oboru dobře známé (Hoglund et al., J. Exp. Med. 168, 1469-1474). Zaměření IL-2 receptoru nebo jiného IM-R Sag-Im proteinem v takových modelech může být ověřením zaměření IM-receptor pozitivních buněk in vivo.

Sag-IM zaměření IM-R pozitivních buněk je komplikováno tím, že jak efektorové, tak cílové buňky často exprimují receptor pro IM. Nicméně, za určitých okolností může být tento způsob terapie účinný. Faktory jako je hustota IM-R exprese na cílových buňkách, počet a lokalizace cílových buněk atd. mají pravděpodobně význam. Je třeba si také uvědomit, že např. IL2R α je pouze zvýšeně exprimován po aktivaci T buněk - může existovat přechodné období, během kterého je IM-R exprimován hojně na cílových buňkách, ale ne na efektorových buňkách.

Odkazy:

* - označené odkazy se týkají více imunomodulátorů než jiné odkazy

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.

Antonsson et al (1996) J. Immunol. 158:4245-4251.

Antonsson et al (1997) WO 9736932 (patent application)

Atkinson et al (1973) Biochim. Biophys. Acta 308:41-52.

*Bamborough et al. (1994) Structure 2:839-

*Becker et al (1996) Eradication of human hepatic and pulmonary melanoma metastases in SCID mice by antibody-interleukin 2 fusion proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2702-2707.

*Belfrage Thesis (1996) Activation of murine cytotoxic cells with interleukin-2 and the bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin A. University of Lund, Sweden (Augusti/September 1996).

*Belfrage et al (1994) Combined activation of murine lymphocytes with staphylococcal enterotoxin and interleukin-2 results in additive cytotoxic activity. Cancer Immunol. Immunother 38:265-271).

*Belfrage et al (1995) Enhanced and prolonged efficacy of superantigen-induced cytotoxic T-lymphocyte activity by IL-2 in vivo. Cancer Immunol. Immunother. 41:87-94.

*Belfrage et al (1997a) Prevention of superantigen induced downregulation of T cell mediated cytotoxic activity by IL-2 in vivo. Immunology 90:183-188 .

*Belfrage et al (1997b) Prevention of superantigen induced tolerance in vivo by IL-2 treatment. Submitted 1996.

*Berndt et al (1994) Biochemistry 33:6571-.

Betley et al (1988) Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. J. Bacteriol. 170:34-41.

Boyer et al (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41:459-472.

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.

Carlsson et al (1985) Kinetics of IL-2 and interferon-gamma production, expression of IL-2 receptors, and cell proliferation in human mononuclear cells exposed to staphylococcal enterotoxin A. Cell. Immunol. 96:175-183.

*Chen et al (1992) Costimulation of antitumor immunity by the B7 counter receptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA. Cell 71:1093-102.

*Chang et al (1996) A point mutation in Interleukin-2 that alters ligand internalization. J. Biol. Chem. 271:13349-13355.

*Collins et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7709-.

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 monoclonal antibodies. Eur. J. Immunol. 18:1173-1178.

Dohlsten et al (1990) Immunology 71:96-100.

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

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

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

Dohlsten et al (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9791-9795.

*Dow et al (1996) WO9636366 (patent application) Combined gene therapy with the gene for a superantigen and the gene for a cytokine or chemokine.

*Fell et al EP 439095 (patent application).

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

Forsberg G et al (1989) BioFactors, 2, 105-112.

Hansson J et al (1997) Proc. Natl. Acad. Sci.-U.S.A. 94 (in press).

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.

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.

*Lando et al (1996) Regulation of superantigen-induced T cell activation in the absence and the presence of MHC class II. J. Immunol. 157:2857-2863.

Lindholm et al (1993) 9301302 (patent application). Tumor, carbohydrate antigen specific monoclonal antibody and cell line.

Newel 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.

Ochi et al (1993) J. Immunol. 151:3180-3186

- *Pancook et al (1996) Eradication of established hepatic human neuroblastoma metastases in mice with severe combined immunodeficiency by antibody targeted interleukin-2. Cancer Immunol. Immunother. 42:88-92.
- *Pouletty (1993) EP 510949 (patent application) Targeted cytolysis.
- *Rosenblum et al EP 396387 (patent application).
- *Rosendahl et al (1996) Int. J. Cancer 68, 109-113.
- Sanger et al (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977.
- Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- *Schwartz (1990) Science 248:1349-1356.
- Stern et al (1989) WO8907947 (patent application). Improvements relating to antigens.
- Sundström et al (1996) J. Biol. Chem. 271:32212-32216.
- *Taniguchi et al (1983) Structure and expression of a cloned cDNA for human Interleukin-2. Nature 302:305-310.
- *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.

Woodworth (1993) Preclinical and Clinical development of Cytokine toxins presented at the conference "Molecular approaches to cancer Immunotherapy", Ashville, North Carolina, November 7-11, 1993.

Wootton et al (1989) Prot. Eng. 2:535-543.

*Zurawski et al (1993) EMBO J. 12:5113-.

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace:

(i) Přihlašovatel:

- (A) Pharmacia and Upjohn AB
- (B) Ulice: Lindhagensgatan 133
- (C) Město: Stockholm
- (E) Země: Sweden
- (F) Poštovní kód (ZIP): S-112 87
- (G) Telefon: +46 8 695 80 00

(ii) Název vynálezu: Řízená cytolýza cílových buněk, činidla a prostředky způsobující cytolýzu a sloučeniny, které mohou být použity pro přípravu takových činidel

(iii) Počet sekvencí: 23

(iv) Počítačová čtecí forma:

- (A) Typ media: Floppy disk
- (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
- (C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: PatentIn Release #1.0, verze #1.30 (EPO)

(2) Informace pro SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 33 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

ATATAAGCTT CCACCATGGG CCACACACGG AGG

33

(2) Informace pro SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 35 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 2:

ACGCAGATCT TTAGTTATCA GGAAAATGCT CTTGC

35

(2) Informace pro SEQ ID NO: 3:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 39 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 3:

TCAAAGCTTC TCGAGCGCGC TGTATCAGG AAAATGCTC

39

(2) Informace pro SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 46 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 4:

CGCGCGTCAG GCTAACGAAC TGCCAGGCGC CCGTCACAG AGACGA

46

(2) Informace pro SEQ ID NO: 5:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 60 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

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

AGCTTCGTCT CACGCGCGTT CTCCTGTGA CGGGGCGCCT GGCAGTTCGT TAGCCTGACG 60

(2) Informace pro SEQ ID NO: 6:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 32 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 6:

TGGTACACCA CAGAAGACAG CTTGTATGTA TG

32

(2) Informace pro SEQ ID NO: 7:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 32 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 7:

CATACATACA AGCTGTCTTC TGTGGTGTAC CA

32

(2) Informace pro SEQ ID NO: 8:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 33 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 8:

CGAATAAGAA AGACGTCCTT GTTCAGGAGT TGG

33

(2) Informace pro SEQ ID NO: 9:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 33 párů basí

- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

- (xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 9:

CCAACTCCTG AACAGTGACG TCTTTCTTAT TCG

33

- (2) Informace pro SEQ ID NO: 10:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 32 párů basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

- (xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 10:

GAGATAATAA AGTTATTAA TCAGAAAACA TG

32

- (2) Informace pro SEQ ID NO: 11:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 32 párů basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
 - (A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

- (xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 11:

CATGTTTTCT GAGTTAATAA CTTTATTATC TC

32

- (2) Informace pro SEQ ID NO: 12:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 - (A) Délka: 49 párů basí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární

- (ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 12:

CGCGGATCCG CGCGGCACCA GGCGCTGTT ATCGGAAAA TGCTCTTGC

49

(2) Informace pro SEQ ID NO: 13:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 77 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

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

CCGGATAACA GCGCGCGTCA GGCTAACGAA CTCCCAGGCG CCCCGTCACA GGAAGAACGC 60

CCGCAGGTCC AACTGCA

77

(2) Informace pro SEQ ID NO: 14:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 69 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 14:

GTGGACCTG CGGGCGTTCT TCCTGTGACG GGGCGCCTGG CAGTTCGTTA GCCTGACGCG 60

CGCTGTTAT

69

(2) Informace pro SEQ ID NO: 15:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 18 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

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

Ser Ala Arg Gln Ala Asn Glu Leu Pro Gly Ala Pro Ser Gln Glu Glu
1 5 10 15

Arg Ala

(2) Informace pro SEQ ID NO: 16:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 18 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

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

Ser Ala Arg Gln Ala Asn Glu Leu Pro Gly Ala Pro Ser Gln Glu Glu
1 5 10 15

Arg Pro

(2) Informace pro SEQ ID NO: 17:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 84 párů basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

(A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

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

GCGGATCCCG GTCCGGGTCA GGCTAACGAA CTGCCAGGAG CTCGGTCTCA GGAAGAGCGT 60

GCACCTACTT CAAGTTCTAC AAAG

84

(2) Informace pro SEQ ID NO: 18:

- (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) Délka: 38 párů basí
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina
(A) Popis: /popis = "oligonukleotidový DNA primer"

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

CCGAATTGCG TAGCTTATCA AGTTAGTGT GAGATGAT

38

(2) Informace pro SEQ ID NO: 19:

(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 11 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

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

Pro Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Pro
1 5 10

(2) Informace pro SEQ ID NO: 20:

(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 17 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

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

Gly Pro Arg Gln Ser Asn Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ser Gln Glu Glu
1 5 10 15

Arg

(2) Informace pro SEQ ID NO: 21:

(i) Charakteristiky sekvence:
(A) Délka: 17 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

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

Gly Pro Arg Gln Ala Lys Thr Leu Pro Gly Ala Pro Ser Gln Thr Thr
1 5 10 15

Arg

(2) Informace pro SEQ ID NO: 22:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 17 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

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

Gly Pro Thr Glu Ala Asp Glu Leu Pro Gly Ala Pro Ser Glu Glu Glu
1 5 10 15

Thr

(2) Informace pro SEQ ID NO: 23:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 17 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

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

Gly Pro Arg Gln Ala Asn Glu Leu Pro Gly Ala Pro Ser Gln Glu Glu
1 5 10 15

Arg

Patentové nároky

1. Superantigen (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, kde alespoň jeden ze superantigenů a imunomodulátoru je ve formě konjugátu mezi "volným" superantigenem (Sag) a skupinou zaměřující konjugát na cílové buňky, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk.

2. (a) Superantigen (SAG) a imunomodulátor, které jsou ve formě trojkonjugátu obsahujícího superantigen (Sag), skupinu (T) specifickou pro cílové buňky a imunomodulátor (IM) (T, IM, Sag-konjugát);

(b) superantigen (SAG), který je ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky v kombinaci s duálním konjugátem mezi imunomodulátorem (IM) a specificitu určující skupinou (T') pro cílové buňky (T, Sag - konjugát + T', IM - konjugát);

(c) superantigen (SAG), který je ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky a imunomodulátor (IM), který je ve volné formě, t.j. není konjugován na specificitu určující skupinu pro cílové buňky (T, Sag - konjugát + IM);

(d) superantigen (SAG), který je ve volné formě (Sag) a imunomodulátor, který je ve formě konjugátu, t.j. duálního konjugátu mezi imunomodulátorem (IM) a superantigenem (Sag) (Sag + T, IM-konjugát); a

(e) superantigen (SAG) a imunomodulátor (IM), které jsou ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a imunomodulátorem (IM) (Sag, IM-konjugát), podle nároku 1,

pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti

T buněk.

3. Superantigen (SAG) a imunomodulátor, které jsou ve formě trojkonjugátu obsahujícího superantigen (Sag), skupinu (T) specifickou pro cílové buňky a imunomodulátor (IM) (T,IM,Sag-konjugat) podle nároku 2, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk.

4. Superantigen (SAG), který je ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky v kombinaci s duálním konjugátem mezi imunomodulátorem (IM) a specificitu určující skupinou (T') pro cílové buňky (T, Sag - konjugat + T', IM - konjugat), s možností, že specificitu určující skupina v konjugátu imunomodulátoru se může lišit od specificitu určující skupiny v konjugátu superantigenu, podle nároku 2, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk.

5. Superantigen (SAG), který je ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky a imunomodulátor (IM), který je ve volné formě, t.j. není konjugován na specificitu určující skupinu pro cílové buňky (T, Sag - konjugat + IM) podle nároku 2, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk.

6. Superantigen (SAG) a imunomodulátor (IM), které jsou ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a imunomodulátorem (IM) (Sag, IM-konjugat), s tím, že IM a T jsou společné, například receptor pro cytokin, jako je IL-2, pro zacílení konjugátu na buňky nesoucí receptor, podle nároku 2, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk.

7. Superantigen (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, podle některého z nároků 1 až 6, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk při onemocnění asociovaném s cílovými buňkami, například nádorovém onemocnění.

8. Superantigen (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, podle některého z nároků 1 až 7, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde specifitu určující skupinou je protilátka, výhodně její antigen.vazebný fragment, jako je Fab nebo Fab₂ fragment nebo jednořetězcová protilátka.

9. Superantigen (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, podle některého z nároků 1 až 8, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde superantigen Sag je modifikován, například mutací, ke

- a) snížení schopnosti vazby na MHC antigeny třídy II ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem;
- b) snížení seroreaktivity v lidském séru ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem;
- c) snížení imunogenicity u člověka ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem;
- d) dosažení chimery mezi dvěma nebo více volnými přirozenými superantigeny.

10. Superantigen (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, podle některého z nároků 1 až 9, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde superantigen je modifikován ke snížení afinity k MHC antigenům II. třídy, například mutací kodonu kodujícího aminokyselinu významnou pro afinitu k MHC antigenům II. třídy.

11. Superantigen (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, podle některého z nároků 1 až 10, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde imunomodulátor je vybrán ze skupiny zahrnující:

- (a) cytokiny, jako je IL-2;
- (b) chemokiny; a
- (c) extracelulární části povrchových lymfocytárních receptorů a ligandů, například extracelulární část B7 molekuly, jako je CD80 a CD86.

12. Superantigen (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, podle některého z nároků 1 až 11, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde imunomodulátor je vybrán z imunomodulátorů, které jsou schopny potenciovat efekty superantigenů in vivo, například působením proti úniku superantigenem aktivovaných T-buněk do anergie.

13. Superantigen (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, podle některého z nároků 1 až 11, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde imunomodulátorem je extracelulární část B7 ligandu, jako je CD80 nebo CD86, nebo následný efektor CD28/B7 signální dráhy, jako je IL-2.

14. Superantigen (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, podle některého z nároků 1 až 13, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde imunomodulátor je modifikován, například mutací, ke snížení afinity pro svůj lymfocytární receptor, ve srovnání se svou přirozenou formou.

15. Superantigen (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, podle některého z nároků 1 až 13, pro použití pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde imunomodulátorem je IL-2 nebo extracelulární část CD80 nebo jejich formy, které

jsou modifikovány jako v nároku 14.

16. Použití superantigenu (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, kde alespoň jeden ze superantigenu a imunomodulátoru je ve formě konjugátu mezi "volným" superantigenem (Sag) a skupinou zaměřující konjugát na cílové buňky, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk.

17. Použití

(a) superantigenu (SAG) a imunomodulátoru ve formě trojkonjugátu obsahujícího superantigen (Sag), skupinu (T) specifickou pro cílové buňky a imunomodulátor (IM) (T,IM,Sag-konjugát);

(b) superantigenu (SAG) ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky v kombinaci s duálním konjugátem mezi imunomodulátorem (IM) a specificitu určující skupinou (T') pro cílové buňky (T, Sag - konjugát + T', IM - konjugát);

(c) superantigenu (SAG) ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky a imunomodulátoru (IM) ve volné formě, t.j. nekonjugovaného na specificitu určující skupinu pro cílové buňky (T, Sag - konjugát + IM);

(d) superantigenu (SAG) ve volné formě (Sag) a imunomodulátoru ve formě konjugátu, t.j. duálního konjugátu mezi imunomodulátorem (IM) a superantigenem (Sag) (Sag + T,IM-konjugát); a

(e) superantigenu (SAG) a imunomodulátoru (IM) ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a imunomodulátorem (IM) (Sag, IM-konjugát), podle nároku 16,

pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk.

18. Použití superantigenu (SAG) a imunomodulátoru ve formě trojkonjugátu obsahujícího superantigen (Sag), skupinu (T) specifickou pro cílové buňky a imunomodulátor (IM) (T,IM,Sag-konjugat) podle nároku 17, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk.

19. Použití superantigenu (SAG) ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky v kombinaci s duálním konjugátem mezi imunomodulátorem (IM) a specificitu určující skupinou (T') pro cílové buňky (T, Sag - konjugat + T', IM - konjugat), s možností, že specificitu určující skupina v konjugátu imunomodulátoru se může lišit od specificitu určující skupiny v konjugátu superantigenu, podle nároku 17, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk.

20. Použití superantigenu (SAG) ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky a imunomodulátoru (IM) ve volné formě, t.j. nekonjugovaného na specificitu určující skupinu pro cílové buňky (T, Sag - konjugat + IM) podle nároku 17, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk.

21. Použití superantigenu (SAG) a imunomodulátoru (IM) ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a imunomodulátorem (IM) (Sag, IM-konjugat), podle nároku 17, přičemž IM a T jsou společné, například receptor pro cytokin, jako je IL-2, pro zacílení konjugátu na buňky nesoucí receptor, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk.

22. Použití superantigenu (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru podle některého z nároků 16 až 21, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde buňky jsou inaktivovány onemocněním asociovaným s cílovými buňkami, například nádorovým onemocněním.

23. Použití superantigenu (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru podle některého z nároků 16 až 22, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde specifitu určující skupinou je protilátka, výhodně její antigen.vazebný fragment, jako je Fab nebo Fab₂ fragment nebo jednořetězcová protilátka.

24. Použití superantigenu (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru podle některého z nároků 16 až 23, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde superantigen Sag je modifikován, například mutací, ke

- a) snížení schopnosti vazby na MHC antigeny třídy II ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem;
- b) snížení seroreaktivity v lidském séru ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem;
- c) snížení imunogenicity u člověka ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem;
- d) dosažení chimery mezi dvěma nebo více volnými přirozenými superantigeny.

25. Použití superantigenu (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru podle některého z nároků 16 až 24, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde superantigen je modifikován ke snížení afinity k MHC antigenům II. třídy, například mutací kodonu kodujícího aminokyselinu významnou pro afinitu k MHC antigenům II. třídy.

26. Použití superantigenu (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru podle některého z nároků 16 až 25, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde imunomodulátor je vybrán ze skupiny zahrnující:

- (a) cytokiny, jako je IL-2;
- (b) chemokiny; a
- (c) extracelulární části povrchových lymfocytárních receptorů a ligandů, například extracelulární část B7 molekuly, jako je CD80 a CD86.

27. Použití superantigenu (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru podle některého z nároků 16 až 26, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde imunomodulátor je vybrán z imunomodulátorů, které jsou schopny potenciovat efekty superantigenů in vivo, například tím, že působí proti úniku superantigenem aktivovaných T-buněk do anergie.

28. Použití superantigenu (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru podle některého z nároků 16 až 26, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde imunomodulátorem je extracelulární část B7 ligandu, jako je CD80 nebo CD86, nebo následný efektor CD28/B7 signální dráhy, jako je IL-2.

29. Použití superantigenu (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru podle některého z nároků 16 až 28, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde imunomodulátor je modifikován, například mutací, ke snížení afinity pro svůj lymfocytární receptor, ve srovnání se svou přirozenou formou.

30. Použití superantigenu (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru podle některého z nároků 16 až 28, pro výrobu léčiva pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk, kde imunomodulátorem je IL-2 nebo extracelulární část CD80 nebo jejich formy, které jsou modifikovány jako v nároku 29.

31. Způsob pro inaktivaci cílových buněk v přítomnosti T buněk in vitro, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dva typy buněk jsou uvedeny do kontaktu se superantigenem (SAG) za přítomnosti imunomodulátoru, kde alespoň jeden ze superantigenu a imunomodulátoru je ve formě konjugátu mezi "volným" superantigenem (Sag) a skupinou zaměřující konjugát na cílové buňky.

32. Způsob podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, že

(a) superantigen (SAG) a imunomodulátor jsou použity ve formě trojkonjugátu obsahujícího superantigen (Sag), skupinu (T) specifickou pro cílové buňky a imunomodulátor (IM)

(T,IM,Sag-konjugat);

(b) superantigen (SAG) je použit ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky v kombinaci s duálním konjugátem mezi imunomodulátorem (IM) a specificitu určující skupinou (T') pro cílové buňky (T, Sag - konjugat + T', IM - konjugat);

(c) superantigen (SAG) je použit ve formě duálního konjugátu mezi superantigenem (Sag) a specificitu určující skupinou (T) pro cílové buňky a imunomodulátor (IM) je použit ve volné formě, t.j. není konjugován na specificitu určující skupinu pro cílové buňky (T, Sag - konjugat + IM);

(d) superantigen (SAG) je použit ve volné formě (Sag) a imunomodulátor je použit ve formě konjugátu, t.j. duálního

konjugatu mezi imunomodulátorem (IM) a superantigenem (Sag) (Sag + T, IM-konjugat); a
(e) superantigen (SAG) a imunomodulátor (IM) jsou použity ve formě duálního konjugatu mezi superantigenem (Sag) a imunomodulátorem (IM) (Sag, IM-konjugat).

33. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se využije alternativa (a).

34. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se využije alternativa (b), s možností, že specifitu určující skupina v konjugatu imunomodulátoru se může lišit od specifitu určující skupiny v konjugatu superantigenu.

35. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se využije alternativa (c).

36. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se využije alternativa (e) a tím, že IM a T jsou společné, například receptor pro cytokin, jako je IL-2, pro zacílení konjugatu na buňky nesoucí receptor.

37. Způsob podle některého z nároků 31 až 36, v y z n a - č u j í c í s e t í m, že buňky jsou inaktivovány onemocněním asociovaným s cílovými buňkami, například nádorovým onemocněním.

38. Způsob podle některého z nároků 31 až 37, v y z n a - č u j í c í s e t í m, že specifitu určující skupinou je protilátka, výhodně její antigen.vazebný fragment, jako je Fab nebo Fab₂ fragment nebo jednořetězcová protilátka.

39. Způsob podle některého z nároků 31 až 38, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že superantigen Sag je
modifikován, například mutací, ke

- a) snížení schopnosti vazby na MHC antigeny třídy II ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem;
- b) snížení seroreaktivity v lidském séru ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem;
- c) snížení imunogenicity u člověka ve srovnání s příslušným přirozeným superantigenem;
- d) dosažení chimery mezi dvěma nebo více volnými přirozenými superantigeny.

40. Způsob podle některého z nároků 31 až 39, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že superantigen je modifikován
ke snížení afinity k MHC antigenům II. třídy, například
mutací kodonu kodujícího aminokyselinu významnou pro afinitu
k MHC antigenům II. třídy.

41. Způsob podle některého z nároků 31 až 40, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že imunomodulátor je vybrán ze
skupiny zahrnující:

- (a) cytokiny, jako je IL-2;
- (b) chemokiny; a
- (c) extracelulární části povrchových lymfocytárních receptorů
a ligandů, například extracelulární část B7 molekuly, jako je
CD80 a CD86.

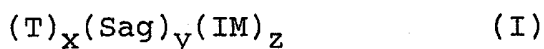
42. Způsob podle některého z nároků 31 až 41, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že imunomodulátor je vybrán
z imunomodulátorů, které jsou schopny potenciovat efekty
superantigenů in vivo, například tím, že působí proti úniku
superantigenem aktivovaných T-buněk do anergie.

43. Způsob podle některého z nároků 31 až 41, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že imunomodulátorem je
extracelulární část B7 ligandu, jako je CD80 nebo CD86, nebo
následný efektor CD28/B7 signální dráhy, jako je IL-2.

44. Způsob podle některého z nároků 31 až 43, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že imunomodulátor byl modifikován,
například mutací, ke snížení afinity pro svůj lymfocytární
receptor, ve srovnání se svou přirozenou formou.

45. Způsob podle některého z nároků 31 až 43, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že imunomodulátorem je IL-2 nebo
extracelulární část CD80 nebo jejich formy, které byly
modifikovány způsobem podle nároku 14.

46. Konjugat obsahující superantigen vzorce I



kde

(a) T je specifitu určující skupina,

Sag je volný superantigen,

IM je imunomodulátor, který je jiný než superantigen a

T, Sag a IM jsou na sebe navázány prostřednictvím organických
spojovacích skupin B, které mohou být stejné nebo různé ve
stejně molekule konjugatu;

(b) x, y a z jsou celá čísla, obvykle vybraná z 0 až 10,
například 0 až 5, a představují počet skupin T, Sag a IM,
v příslušném pořadí, v dané molekule konjugatu, s podmínkou,
že $y > 0$ a také jeden nebo oba x a $z > 0$.

47. Konjugat obsahující superantigen podle nároku 46, kde

konjugatem je fúsní protein, ve kterém jsou všechny x , y a z celá čísla 1 až 3, výhodně 1 nebo 2, a obvyklé vztahy mezi x , y a z jsou: $x = y = z$; $x = y = 0,5z$; $x = 0,5y = 0,5z$; a $x = 0,5y = z$.

48. Konjugat obsahující superantigen podle nároku 46, kterým je fúsní protein exprimovaný jako dvouřetězcový produkt.

49. Fúsní protein podle nároku 48, ve kterém je superantigenová skupina SAG fúsovaná C-terminálně na specificitu určující skupinu T' a imunomodulátor IM je fúsován C-terminálně na specificitu určující skupinu T'' .

50. Fúsní protein podle nároku 49, ve kterém jsou T' a T'' definovány jako v nároku 8, 23 nebo 38 a/nebo SAG je definován jako v jakémkoliv z nároků 9, 10, 24, 25, 39 nebo 40 a/nebo IM je definován jako v jakémkoliv z nároků 11 až 15, 26 až 30 nebo 41 až 45.

51. Fúsní protein podle nároku 50, ve kterém SAG je stafylokokový enterotoxin A (SEA), T' je C_H1 -doména C215 Fab fragmentu, T'' je lehký řetězec C215 protilátky a IM je interleukin-2.

52. Fúsní protein podle nároků 49 až 51, kde SAG je fúsován na T' prostřednictvím flexibilní hydrofilní aminokyselinové spojovací skupiny B' o 3 až 11 aminokyselinách a IM je fúsován na T'' prostřednictvím hydrofilní a neutrální nebo pozitivní aminokyselinové spojovací skupiny Q o 10 až 20 aminokyselinách.

53. Fúsní protein podle nároku 52, kde B' je vybrána ze skupiny skládající se z

Pro-Ala-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ala-Gly-Gly-Pro
(SEQ ID NO: 19) a Q je vybrána ze skupiny skládající se z
Gly-Pro-Arg-Gln-Ala-Asn-Glu-Leu-Pro-Gly-Ala-Pro-Ser-Gln-Glu-
-Glu-Arg (SEQ ID NO: 23), Gly-Pro-Arg-Gln-Ser-Asn-Glu-Thr-Pro-
Gly-Ser-Pro-Ser-Gln-Glu-Glu-Arg (SEQ ID NO: 20), Gly-Pro-Arg-Gln-
Ala-Lys-Thr-Leu-Pro-Gly-Ala-Pro-Ser-Gln-Thr-Thr-Arg (SEQ ID
NO: 21) a Gly-Pro-Thr-Glu-Ala-Asp-Glu-Leu-Pro-Gly-Ala-Pro-Ser-
Glu-Glu-Glu-Thr (SEQ ID NO: 22).

54. Konjugat obsahující superantigen podle nároku 46, kterým
je fúsní protein, specifickosti určující skupina není přítomna
($X = 0$) a y a z jsou celá čísla 1 až 3, lépe 1 nebo 2,
a výhodné vztahy mezi x a y jsou: $x = y$; $x = 0,5y$; $0,5x = y$;
 $x = 1/3y$ a $1/3x = y$.

55. Konjugat obsahující superantigen podle nároku 46, který
má vzorec:



kde $y = z = 1$.

56. Konjugat obsahující superantigen podle nároku 46, 47, 54
nebo 55, ve kterém je specifickosti určující skupina definována
jako v nároku 8, 23 nebo 38 a/nebo superantigen je definován
jako v jakémkoliv z nároků 9, 10, 24, 25, 39 a 40 a/nebo
imunomodulátor je definován jako v jakémkoliv z nároků 11 až
15, 26 až 30 a 41 až 45.

57. Cílený imunomodulátor, kterým je konjugat mezi
specifickosti určující skupinou (T''') a non-superantigenovým
imunomodulátorem (IM'''), který byl modifikován, například
mutací, ke snížení afinity ke svému lymfocytárnímu receptoru

nebo ke snížení stupně internalizace po své vazbě na svůj lymfocytární receptor (ve srovnání s příslušnou přirozenou formou), kde uvedený konjugat má vzorec

$$(T''')_x (Sag''')_y (IM''')_z \quad (V)$$

kde

- (a) T''' je specifitu určující skupina,
 Sag''' je volný superantigen,
 IM''' je modifikovaný imunomodulátor,
 kdy Sag a IM jsou na sebe navázány prostřednictvím organických spojovacích skupin B''' , které mohou být stejné nebo různé ve stejné molekule konjugatu;
- (b) x , y a z jsou celá čísla, obvykle vybraná z 0 až 10, například 0 až 5, a představují počet skupin T''' , Sag''' a IM''' , v příslušném pořadí, v dané molekule konjugatu, s podmínkou, že $z > 0$ a také jeden nebo oba z x a $y > 0$.

58. Cílený konjugat obsahující imunomodulátor podle nároku 57, kde konjugatem je fúsní protein, ve kterém jsou všechny x , y a z celá čísla 1 až 3, výhodně 1 nebo 2 a obvyklé vztahy mezi x , y a z jsou: $x = y = z$; $x = y = 0,5z$; $x = 0,5y = 0,5z$; a $x = 0,5y = z$.

59. Cílený konjugat obsahující imunomodulátor podle nároku 57, kde konjugatem je fúsní protein, ve kterém je superantigenová skupina nepřítomná ($y = 0$) a x a z jsou celá čísla 1 až 3, výhodně 1 nebo 2, a obvyklé vztahy mezi x a y jsou: $x = y$; $x = 0,5y$; a $0,5x = y$; $x = 1/3y$ a $1/3x = y$.

60. Cílený konjugat obsahující imunomodulátor podle nároku 59, který má vzorec:

$$(T''')_y(IM''')_z$$

kde $y = z = 1$.

61. Molekula DNA kodující superantigen a imunomodulátor, jako je IL-2, který je jiný než superantigen.

62. Molekula DNA podle nároku 61, která je ve formě bicistronického konstruktu, ve kterém:

- (a) první cistron obsahuje sekvenci I kodující polypeptid I obsahující nekonjugovaný superantigen (Sag), který může být modifikován jako v nárocích 9, 10, 24, 25, 39 a 40; a
- (b) druhý cistron obsahuje sekvenci II kodující polypeptid II obsahující imunomodulátor (IM), který může být modifikován jako v nárocích 11 až 15, 26 až 30 a 41 až 45.

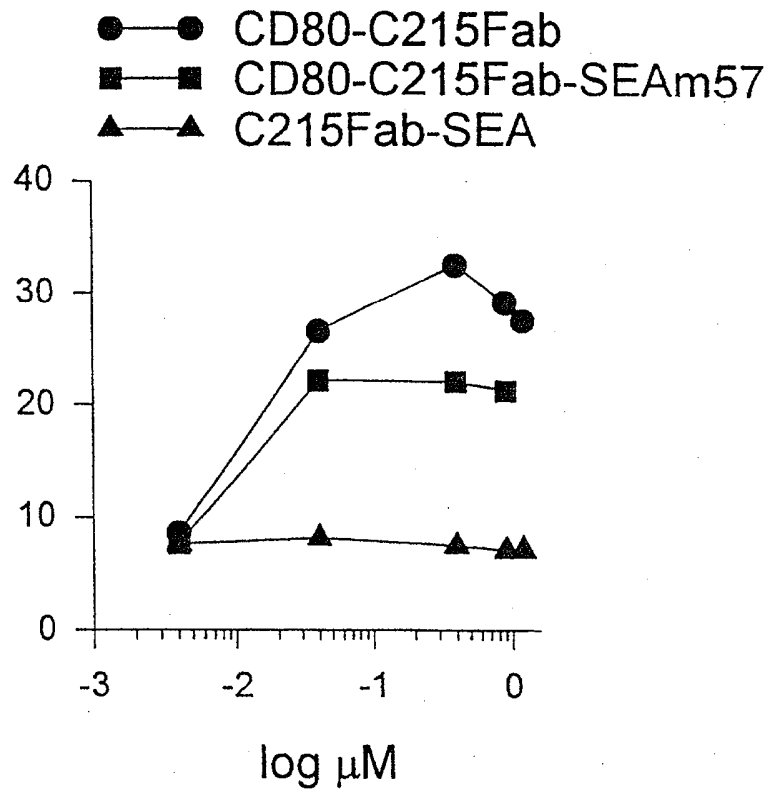
63. Molekula DNA podle nároku 62, kde jedna nebo obě sekvence I a II jsou fúsovány na příslušné sekvence kodující alespoň část protilátky tak, že polypeptidy I a II mohou asociovat a tvořit trojitý fúsní protein obsahující volný superantigen, imunomodulátor a protilátku.

64. Molekula DNA podle nároku 61, ve které je superantigenem nekonjugovaný superantigen a sekvence kodující superantigen je fúsována na sekvenci kodující imunomodulátor, prostřednictvím sekvence kodující oligopeptidovou spojovací skupinu.

21.08.00

2000-228

1 / 15

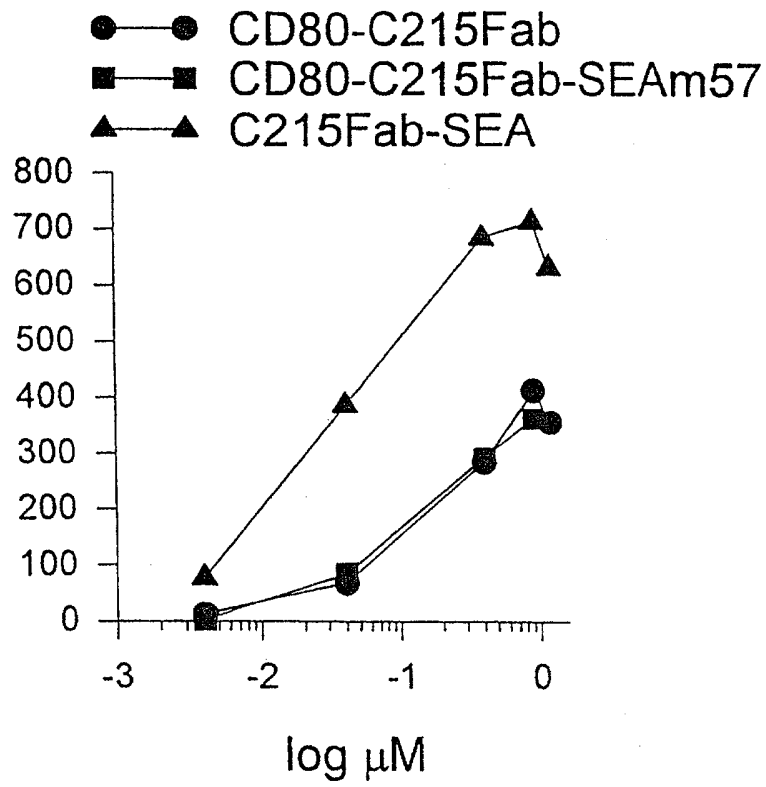


Obr. 1

21.08.00

2000 - EEP

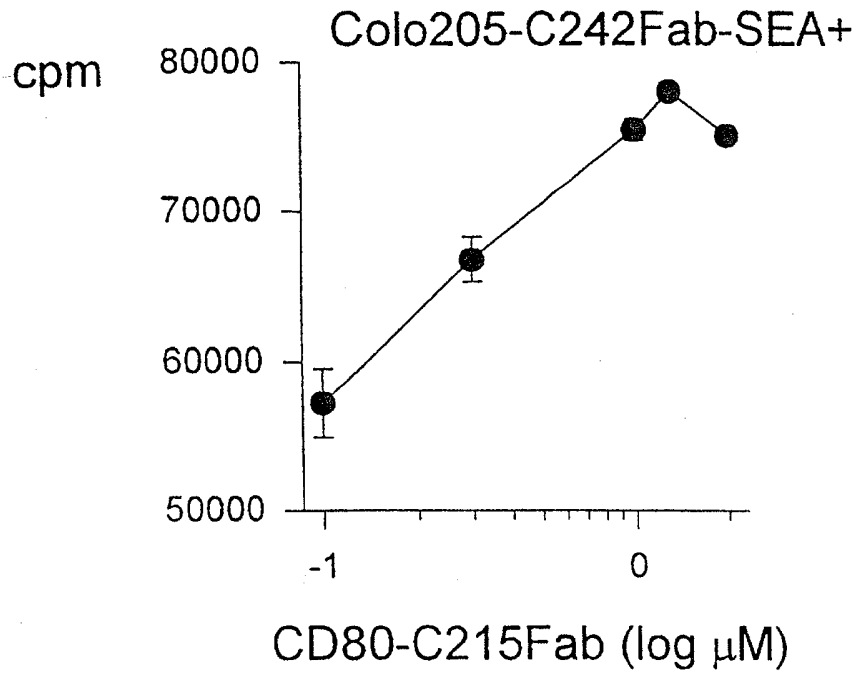
2 / 15



21.08.00

2000-228

3 / 15

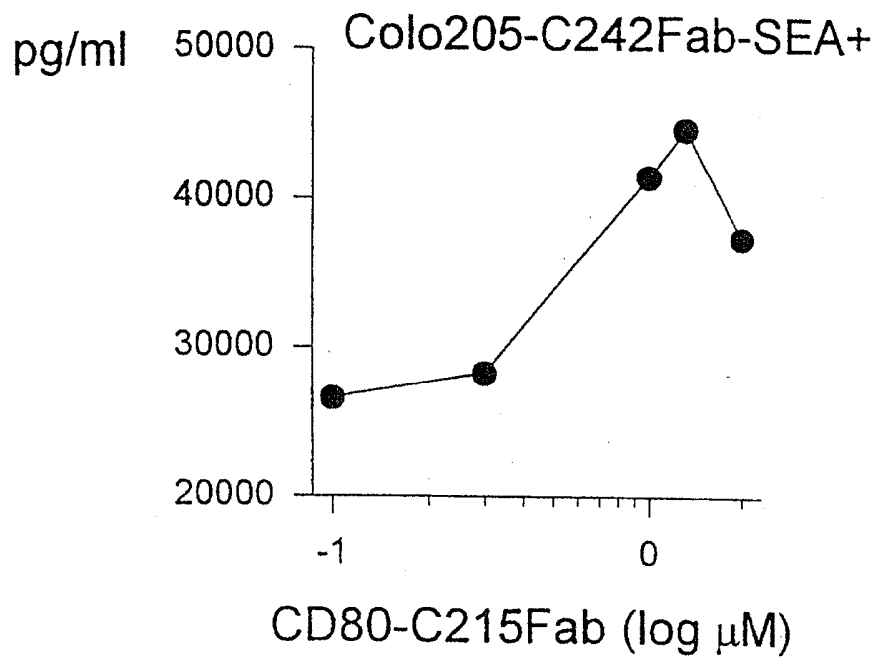


Obr. 3

21.08.00

1000-222

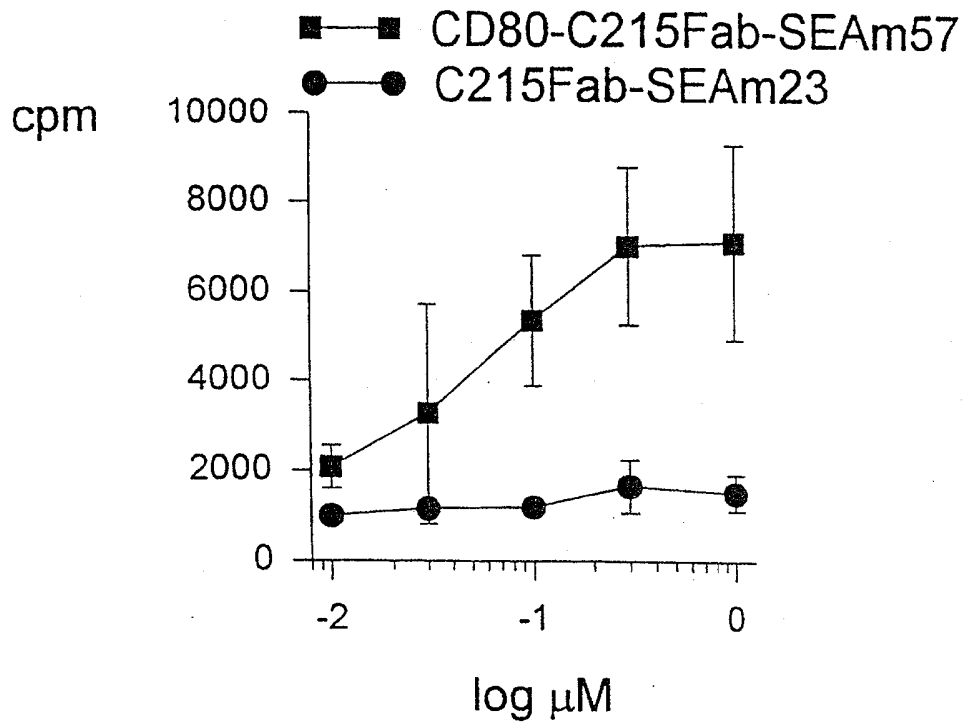
4 / 15



21.05.00

2000-228

5 / 15

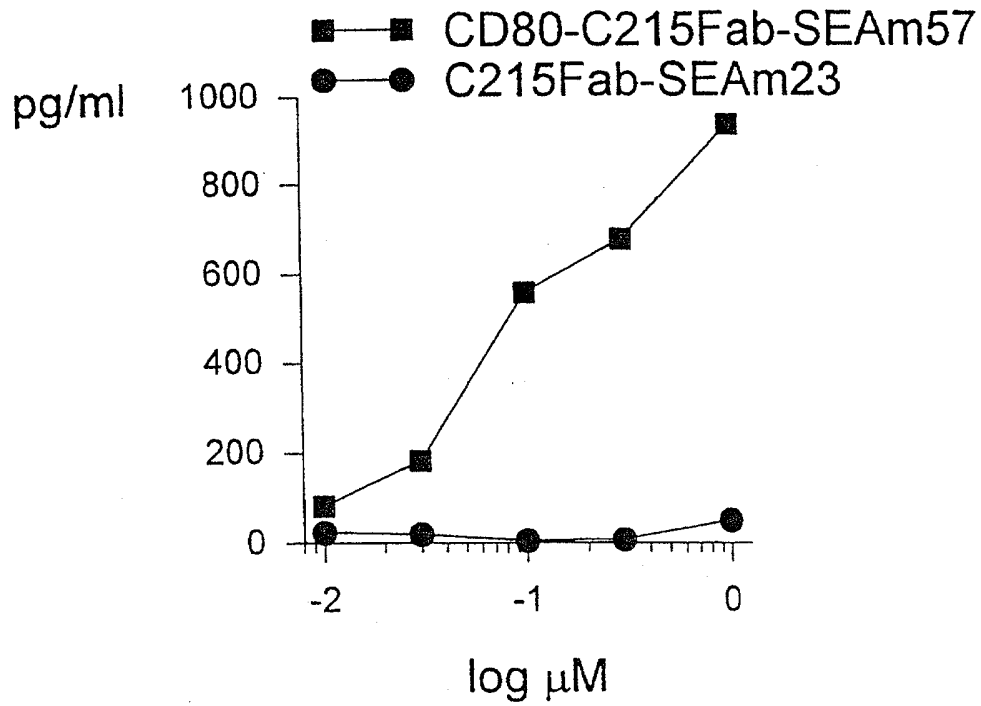


Obr. 5

21.08.00

2000-22P

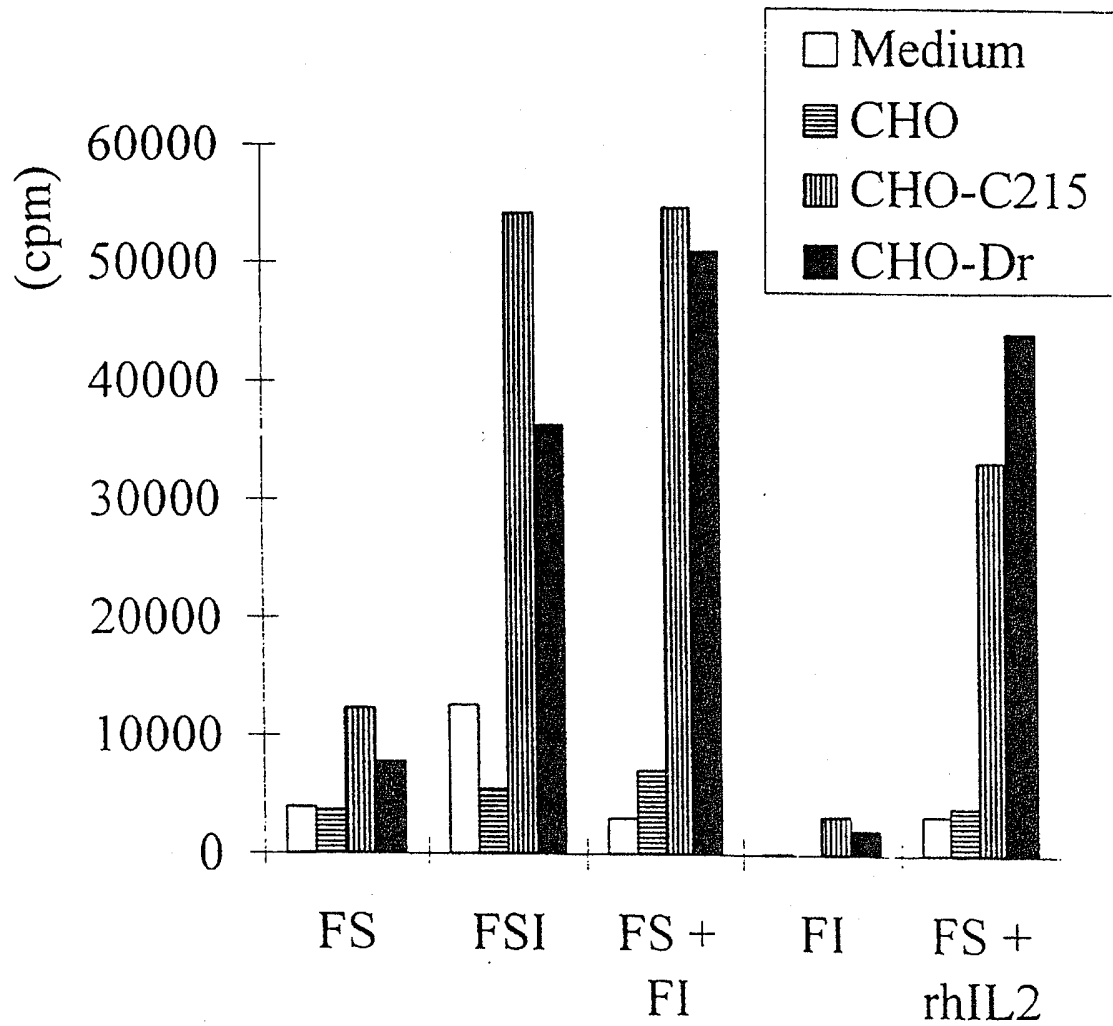
6 / 15



21.05.00

2000-228

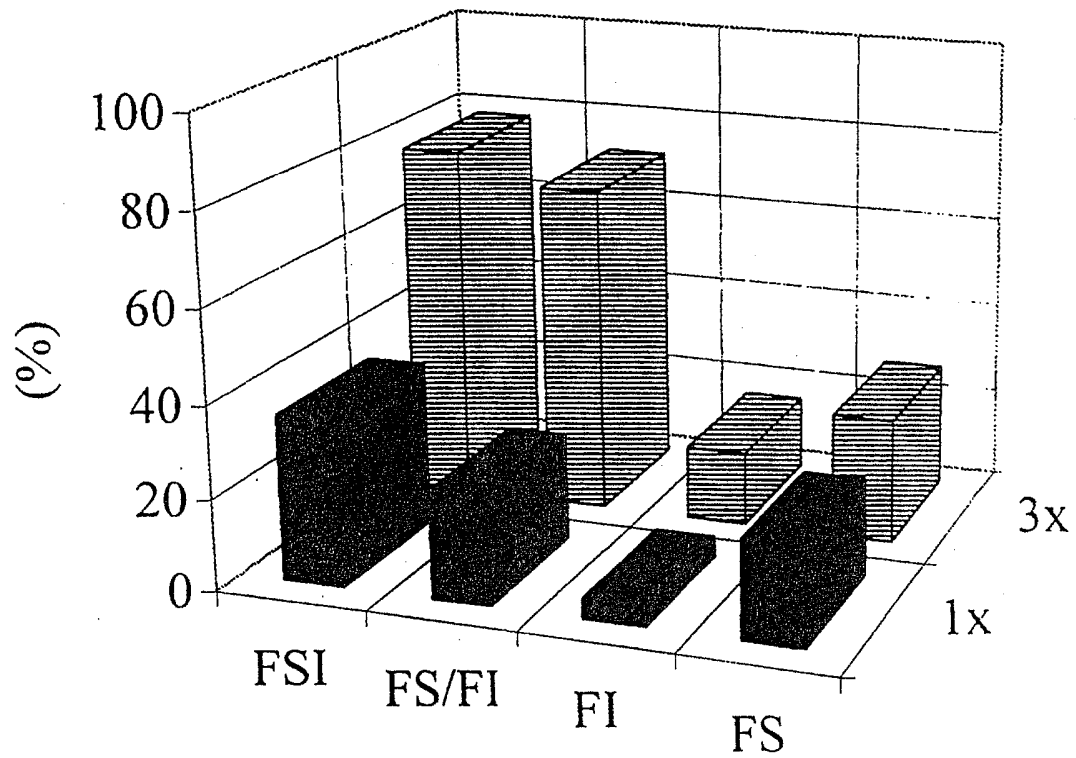
7 / 15



21.06.00

2000-2001

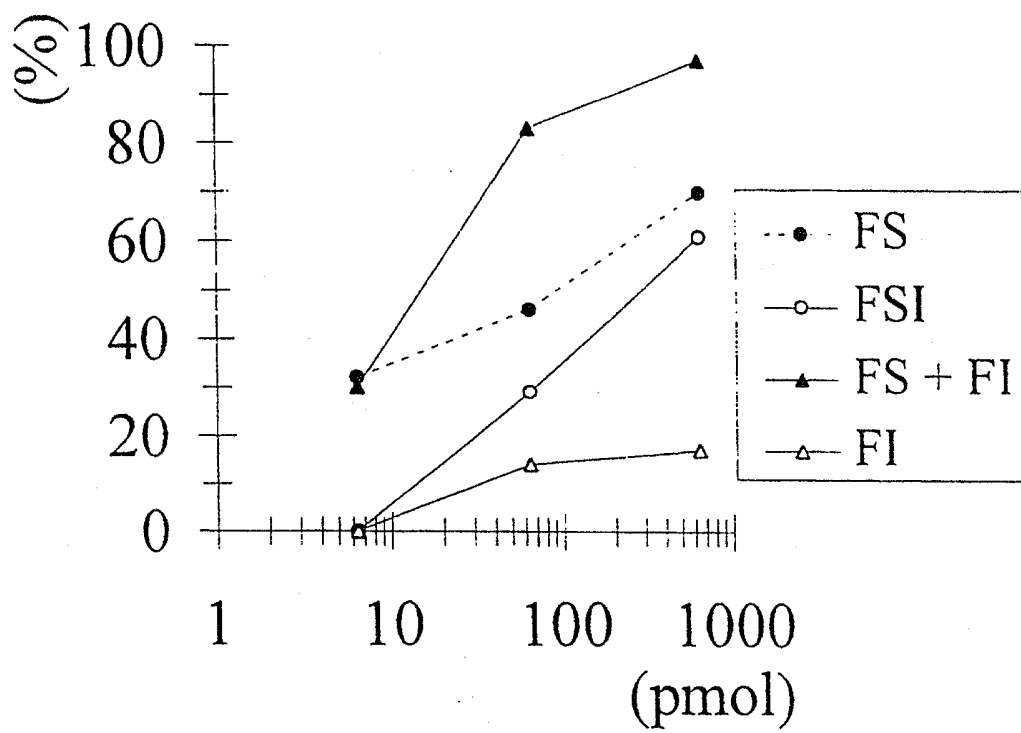
8 / 15



21.08.00

2000-228

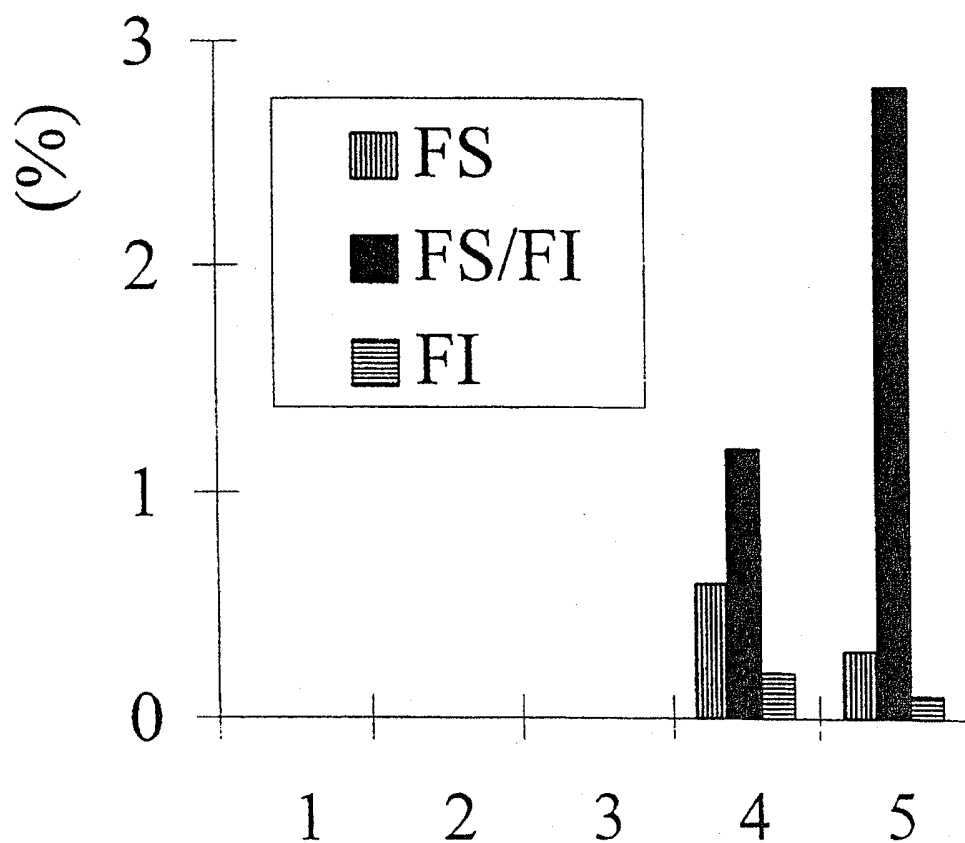
9 / 15



21.08.00

2000-2002

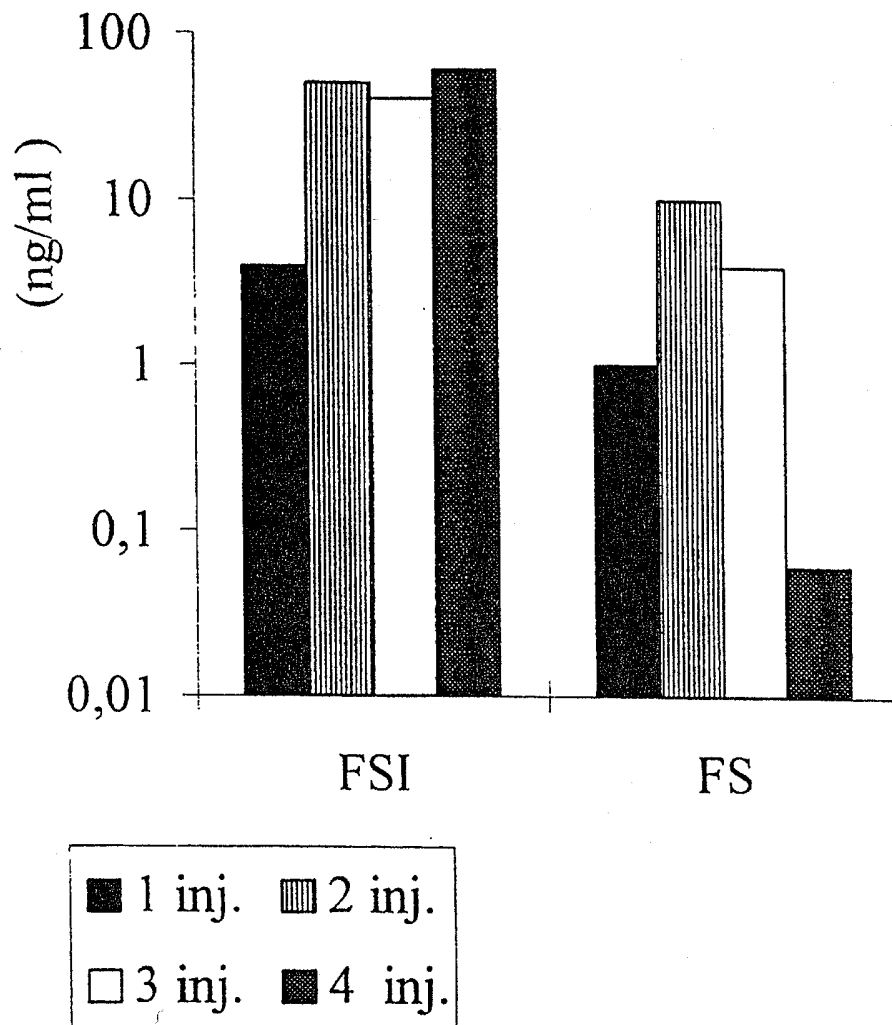
10 / 15



21.06.00

2000-2001

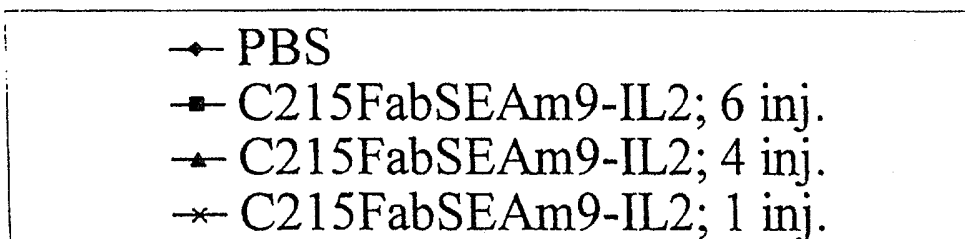
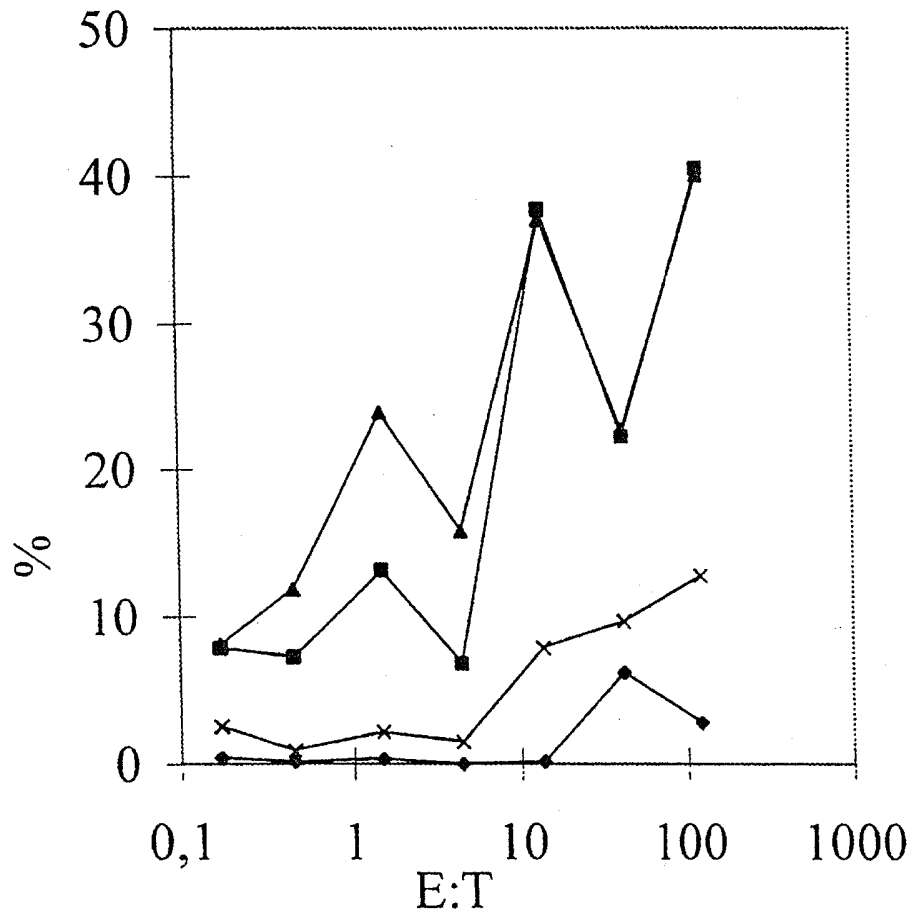
11 / 15



21.06.00

2000-228

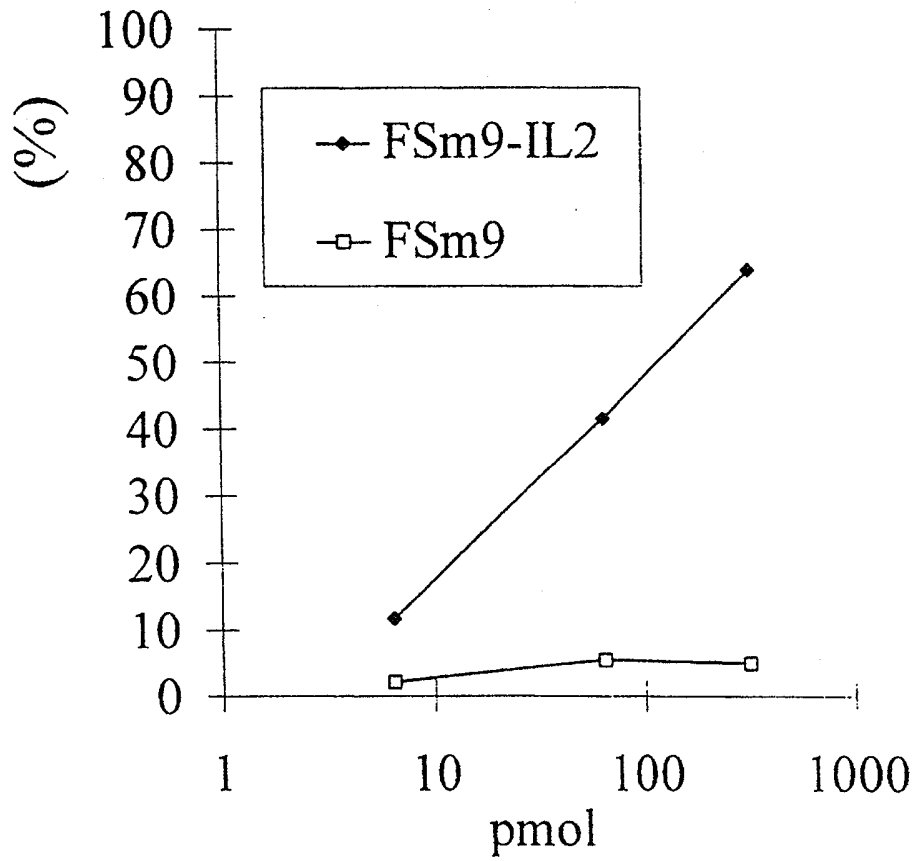
12 / 15



21.06.00

2000-2001

13 / 15

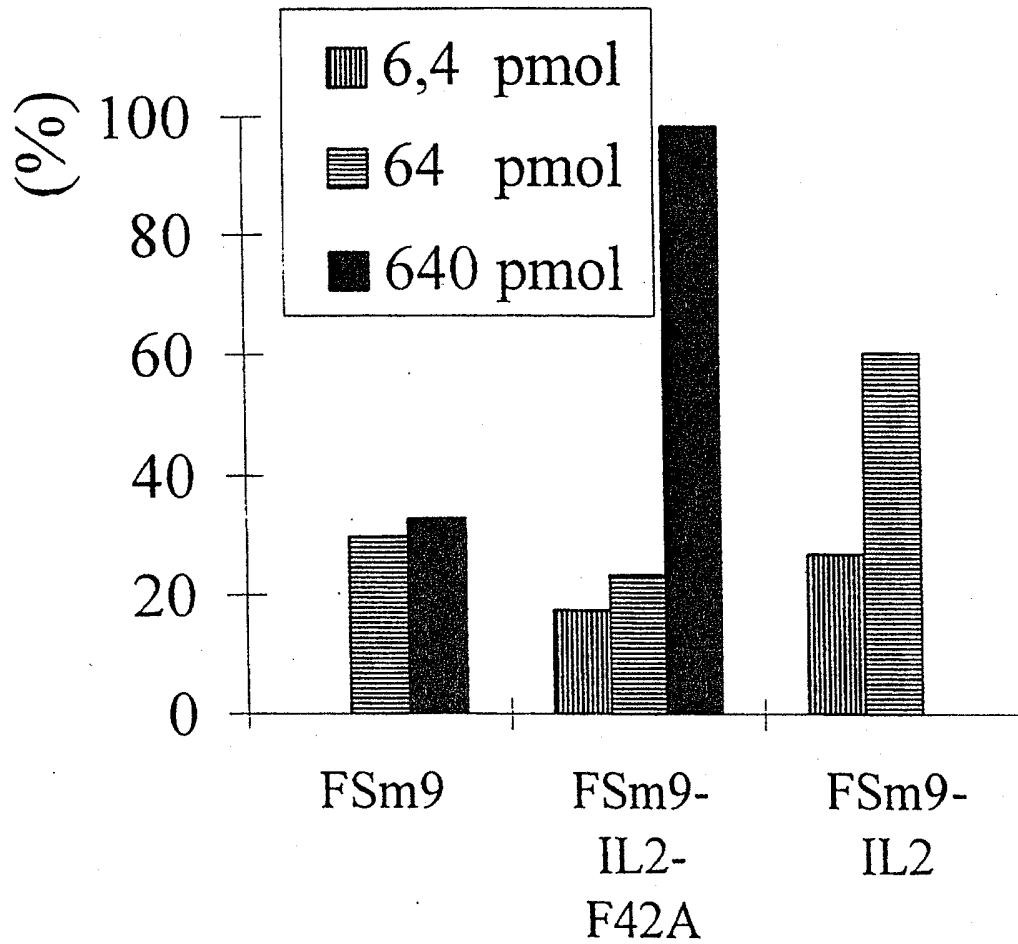


Obr. 13

21.05.00

2000-228

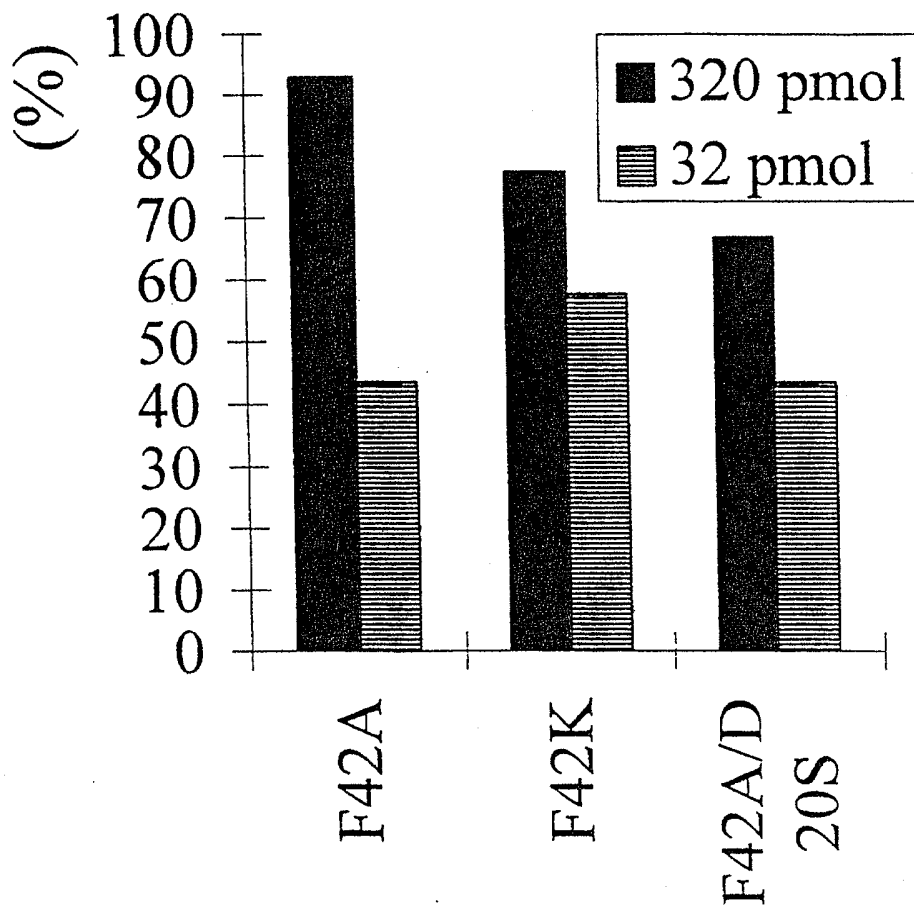
14 / 15



21.08.00

1000-228

15 / 15



Obr. 15