



(19) **UA** (11) **46 772** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 07K 19/00 A, A 61K 47/48 B,
A 61K 39/395 B, C 07K 14/31 B**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 97126295, 26.03.1997

(24) Дата начала действия патента: 17.06.2002

(30) Приоритет: 29.03.1996 SE 9601245-5
12.08.1996 US 08/695,692

(46) Дата публикации: 15.06.2002

(86) Заявка PCT:
PCT/SE97/00537, 19970326

(72) Изобретатель:

Антонссон Пер, SE,
Ханссон Йохан, SE,
Бьерк Пер, SE,
Дольстен Микаэль, SE,
Калланд Терье, IT,
Абрамсен Ларс, SE,
Форсберг Йеран, SE

(73) Патентовладелец:

ФАРМАЦИЯ ЭНД АПДЖОН АБ, SE

(54) КОНЬЮГАТ МЕЖДУ МОДИФИЦИРОВАННЫМ СУПЕРАНТИГЕНОМ ДИКОГО ТИПА И ЧАСТЬЮ
МОЛЕКУЛЫ, ОТЫСКИВАЮЩЕЙ МИШЕНЬ

(57) Реферат:

Конъюгат между частью молекулы, отыскивающей мишень, и модифицированным суперантигеном, являющимся суперантигеном дикого типа (SA I), в котором аминокислотный остаток в районе суперантигена (районе I), определяющем связывание с TCR, преимущественно TCRV B, и активацию Т-клеток, был заменен другим аминокислотным остатком при сохранении способности активировать субпопуляцию Т-клеток. В преобладающем варианте модифицированный суперантиген является химерой между, по крайней мере, двумя суперантигенами дикого типа (SA I, SA II и т.д.), в котором один или несколько аминокислотных остатков в районе, определяющем связывание с TCR и активацию Т-клеток, были обменены между разными суперантигенами дикого типа. Описан

терапевтический способ с использованием модифицированных/химерических суперантигенов, описанных в предшествующих параграфах, и препарат антител, в котором остатки цистеина обеспечивают межцепочные дисульфидные связи, был мутирован таким образом, чтобы исключить образование межцепочных дисульфидных мостиков, преимущественно путем замены на остатки серина, для применения в качестве фармацевтического средства.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 6, 15.06.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** (11) **46 772** (13) **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 07K 19/00 A, A 61K 47/48**
B, A 61K 39/395 B, C 07K 14/31 B

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 97126295, 26.03.1997

(24) Effective date for property rights: 17.06.2002

(30) Priority: 29.03.1996 SE 9601245-5
12.08.1996 US 08/695,692

(46) Publication date: 15.06.2002

(86) PCT application:
PCT/SE97/00537, 19970326

(72) Inventor:

Anthonsen Per, SE,
Hansson Johan, SE,
Byerk Per, SE,
Dolsten Michael, SE,
Kalland Terrye, IT,
Abramsen Lars, SE,
Forsberg Yeran, SE

(73) Proprietor:

PHARMACY AND APJOHN AB, SE

(54) **CONJUGATE BETWEEN A TARGET-SEEKING MOIETY AND MODIFIED SUPERANTIGEN**

(57) Abstract:

A conjugate between a target-seeking moiety and a modified superantigen, characterized in that the superantigen is a wild-type superantigen (SA I) in which an amino acid residue in a superantigen region (region 1) determining binding to TCR, preferably TCRV beta, and T cell activation have been replaced by another amino acid residue while retaining the ability to activate a subset of T cells. In a preferred embodiment the modified superantigen is a chimera between at least two wild-type superantigens (SA I, SA II etc.) characterized in that one or more amino acid residues in a region determining binding to TCR and T cell activation have been

interchanged between various wild-type superantigens. A therapeutic method making use of modified/chimeric superantigens as defined in the preceding paragraphs. An antibody preparation in which the cysteine residues that provide for interchain disulfide bonds have been mutated so as to forbid interchain disulfide bridges, preferably to serine residues, for use as a pharmaceutical.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 6, 15.06.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **46 772** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 07K 19/00 A, A 61K 47/48 B,**
A 61K 39/395 B, C 07K 14/31 B

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
97126295, 26.03.1997

(24) Дата набуття чинності: 17.06.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 29.03.1996 SE 9601245-5
12.08.1996 US 08/695,692

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.06.2002

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
PCT/SE97/00537, 19970326

(72) Винахідник(и):

Антонссон Пер , SE,
Ханссон Йохан , SE,
Бьєрк Пер , SE,
Дольстен Мікаель , SE,
Калланд Терье , IT,
Абрамсен Ларс , SE,
Форсберг Йєран , SE

(73) Власник(и):

ФАРМАЦІЯ ЕНД АПДЖОН АБ, SE

(54) КОН'ЮГАТ МІЖ СУПЕРАНТИГЕНОМ ДИКОГО ТИПУ, ЯКИЙ БУВ МОДИФІКОВАНИЙ, ТА ЧАСТИНОЮ
МОЛЕКУЛИ, ЩО ВІДШУКУЄ МІШЕНЬ

(57) Реферат:

Кон'югат між частиною молекули, що відшукує мішень, та модифікованим суперантигеном, який є суперантигеном дикого типу (SA I), в якому амінокислотний залишок у районі суперантигену (районі I), що визначає зв'язування з TCR, переважно TCRV B, та активацію Т-клітин, був замінений іншим амінокислотним залишком при збереженні здатності активувати субпопуляцію Т-клітин. У переважному варіанті модифікований суперантиген є химерою між принаймні двома суперантигенами дикого типу (SA I, SA II і т.д.), у якому один або декілька амінокислотних залишків

в районі, що визначає зв'язування з TCR і активацію Т-клітин, були обмінені між різними суперантигенами дикого типу. Описаний терапевтичний спосіб з використанням модифікованих/химерних суперантигенів, описаних у попередніх параграфах, і препарат антитіл, в якому залишки цистеїна, що забезпечують міжланцюгові дісульфідні зв'язки, був мутований таким чином, щоб виключити утворення міжланцюгових дісульфідних мостиків, переважно шляхом заміни на залишки серина, для застосування в якості фармацевтичного засобу.

Опис винаходу

Дана заявка претендує на пріоритет на підставі Шведської патентної заявки №9601245-5, яка була зареєстрована 29 березня 1996 року, та на підставі Заявки США 08/695692, яка була зареєстрована 12 серпня 1996 року, які включені в якості посилання.

Область винаходу

Даний винахід відноситься до функціонально активних модифікованих суперантигенів, які є суперантигенами дикого типу (SA I), в яких один або декілька амінокислотних залишків замінені зі збереженням при цьому функції суперантигену. У випадку, коли один або декілька заміненних залишків (або їх консервативний залишок) зустрічаються у відповідних положеннях в іншому суперантигені дикого типу (SA II), модифікований суперантиген називають химерою (інколи гібридом). Таким чином, химерні суперантигени будуть вміщувати часткові послідовності/райони, що відбуваються, принаймні, з двох різних суперантигенів дикого типу.

Під терміном "відповідні" мають на увазі, що залишки, часткові послідовності та райони, що замінюють один одного, мають функціонально одне й те ж положення у суперантигенах I та II, так що заміна призводить до химерної форми, яка здатна функціонувати як суперантиген.

Термінологію "прищеплений/щеплення/щеплена частина (трансплантат)" використовують у зв'язку з частинами повної послідовності суперантигену II, які замінюють відповідні частини суперантигену I, навіть якщо замінені тільки одна єдина амінокислота.

До модифікованих/химерних суперантигенів відносяться також функціональні суперантигени, модифіковані іншими шляхами, наприклад, модифіковані заміною амінокислот на ділянках, інших, ніж ті, що відносяться до даного винаходу, кон'юговані з частиною молекули, що відшукує мішень, у тому числі також злиті форми, коли ця частина молекули є поліпептидом/білком. Порядок проведення цих модифікацій може змінюватися (див. нижче).

Суперантигени

Відповідно до найпершого визначення (приблизно 1988 - 1993), суперантигени являють собою бактеріальні або вірусні білки, здатні зв'язуватися з антигенами головного комплексу гістосумісності класу II (MHC class II) без попереднього внутрішньоклітинного процесингу та активувати Т-клітки шляхом зв'язування з варіабельною областю В-ланцюга (VB) Т-клітинного рецептору (TCR). Це зв'язування призводить до рестриктованої сімейством VB активації щодо великої частини/субпопуляції Т-кліток до лізису експресуючих MHC II клітин (суперантиген-залежному клітинно-опосередкованому цитолізу = SDCC).

Добре відомими суперантигенами дикого типу, відповідно до цього визначення, є стафілококові ентеротоксини (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SED, SEE, SEH). Подальшими прикладами є токсин 1 Синдрому Токсичного Шоку (TSST-1, також стафілококового походження), Токсин Ексфоліації (Exft), Стрептококові Пірогенні Екзотоксини А, В і С (SPE A, B і C), білки мишачого вірусу молочної залози (MMTV), Стрептококові білки М, Ентеротоксин *Clostridium perfringens* (CPET), суперантигени *Mycoplasma arthritis* і т. д. Огляд суперантигенів та їх властивостей даний Kotzin et al., 1993.

На самому початку 90-х років було виявлено, що активація та наступний лізис клітин можуть відбуватися незалежним від MHC класу II чином у випадку, коли суперантиген кон'югований з частиною молекули, що впізнає мішень, здатною зв'язуватися з структурою клітинної поверхні (Dohlstien et al. WO 9201470 та Abrahmsen et al. WO 9601650). Під час інкубування клітин-мішеней (що несе структуру-мішень для частини молекули, що відшукує мішень) та ефекторних клітин (Т-клітин) з кон'югатами, клітини-мішені стають лізируваними (суперантиген-антитіло-залежний клітинно-опосередкований цитоліз = SADCC) без необхідності експерсії класу II. Тому концепція суперантигену наших днів, що використовується у контексті даного винаходу, якщо немає інших вказівок, включає в себе будь-яку сполуку (переважно поліпептидної структури), яка здатна зв'язуватися зі структурою клітинної поверхні (структурою-мішенню) та з одним або декількома ланцюгами поліморфних TCR, зокрема, з ланцюгом VB, з активуванням тим самим субпопуляції Т-клітин, експресуючих специфічний ланцюг TCR, що бере участь у цьому зв'язуванні. Потім Т-клітини стають цитотоксичними щодо клітин, які несуть цю клітинну структуру (структуру-мішень, клітин-мішеней). Звичайно активована субпопуляція Т-клітин складає приблизно 1 - 20% від загального числа Т-клітин індивідуума.

Передумови винаходу - Структурні та функціональні дослідження, що використовують мутовані та химерні суперантигени

Раніше були описані химерні суперантигени, у тому числі форми з точковими мутаціями (Kuppler et al., WO 9314364, Kappler et al. 1992; Grossman et al. 1991; Hulhagle et al., 1991; Hartwig et al. 1993; Fraser et al. 1993; Mollick et al. 1993; Irwin et al. 1992; Hudson et al. 1993; i Blanco et al. 1990). Mollick et al. i Hudson et al. показують на основі досліджень химер, що VB-специфічність SEA і SEE основана на визначених амінокислотних послідовностях, присутніх у карбоксикінцевому районі (тобто амінокислотних залишках 200, 206 і 207). Крім VB-специфічності, в основному залежний від цього району, Mollick et al. змогли також показати, що для повного відтворення SEE-подібної активності SEA, що містить SEE-щеплення, щодо VB8 був необхідний фрагмент, що містить 70 N-кінцевих амінокислотних залишків з SEE. Цей фрагмент містить частини SEE-подібного сайту зв'язування α -ланцюга MHC класу II, та химерні молекули SEA/SEE, що мітять цю частину з SEE, інгібували зв'язування SEA з DR1 MHC класу II SEE-подібним чином.

Нещодавно були описані химери SEA/SEE, утворені обміном районів, що беруть участь у зв'язуванні TCD VB (Lamphaer et al., J. Immunol. 156 (March 15, 1996) 2178 - 2135). Злитий білок суперантиген SEE/Fab-антитіло, в якому домени SEE, що беруть участь у взаємодії з Т-клітинами, були замінені відповідними негомологічними доменами SEA, обговорювалися на ABRF 96: Blomolecular Techniques, Holyday Inn Golden Gateway, San

Francisco, California March 30 - April 2, 1996 (Bjork et al., M45).

Передумови винаходу - Терапевтичне використання суперантигенів

Для терапії були запропоновані некон'юговані суперантигени з лікувальною дією, що переважно здійснюється через загальну активацію імунної системи (Kalland et al., WO 9104053; Terman et al., WO 9110680 та WO 9324136; Newall et al. 1991).

Також пропонувалося використання модифікованих суперантигенів, кон'югованих з частинами молекули, що відшукують мішень (Dohlsten et al., WO 9201470; Abrahamse et al. WO 9601650, що включені тут у якості посилання). Це робило можливим більш широке терапевтичне використання активації Т-клітин через VB. Кон'югати, досліджувані до теперішнього часу, мали знижену спорідненість з класом II, що, в свою чергу, призводило до зниження важкої системної токсичності, звичайно зв'язаної з суперантигенами дикого типу.

Terman et al. (WO 9110680 та WO 9324136) у додаткових рекомендаціях пропонував терапію раку з застосуванням модифікованих суперантигенів та фрагментів суперантигенів.

Kappler et al. (WO 9314634) запропонували використовувати некон'юговані суперантигени (SEB), мутовані для елімінації їх здатності VB-зв'язування MHC Класу II (у контексті вакцин та для нейтралізації токсичних ефектів суперантигенів). Abrahamse et al. (WO 9601650) запропонували терапію раку кон'югованими суперантигенами, що мають модифіковану, переважно зменшену, здатність зв'язуватися з антигенами Класу II. Модифікації включали одиночні мутації, а також конструкцію химер між різними суперантигенами.

Проблеми, які повинні бути вирішені даним винаходом

Сироватки популяцій людини звичайно містять високі титри антитіл проти суперантигенів. Наприклад, для стафілококових суперантигенів відносні титри: TSST-1>SEB>SEC1>SE3>SEC2>SEA>SED>SEE. Ці відносні титри говорять про проблеми імуногенності та про проблеми з нейтралізуючими антитілами у випадку, коли SE вводяться парентерально. На основі лише цих проблем, SEE повинен був би бути переважним стафілококовим суперантигеном. Але, в ході досліджень зі злитими білками ми виявили, що здатність Т-клітинної незалежної від MHC класу II цитотоксичності, суперантиген-антіло-залежної цитотоксичності (SADCC) кон'югатів SEE є слабкою. Титри антитіл до SE (антитіл-SE) також вказують на те, що може бути вигідно модифікувати суперантиген "високого титра", щоб він був більш подібний до суперантигену "низького титра".

Цілі даного винаходу

Першою метою є покращення раніше відомих суперантигенів щодо зниження їх імуногенності та реакції з нейтралізуючими антитілами.

Другою метою є забезпечення суперантигенів з меншими побічними діями при використанні їх в якості лікарського засобу.

Третьою метою є забезпечення покращених суперантигенів, які можуть бути використані в якості активного початку в лікуванні ссавців, що потерпають від ракових пухлин, аутоімунних захворювань, інвазій паразитами, вірусних інфекцій або інших захворювань, пов'язаних з клітинами, які експресують на їх поверхні антигени MHC класу II або структури, які є специфічними для відповідного захворювання і зв'язуються з частиною, що впізнає мішень, включених у суперантиген.

Відкриття, яке привело до даного винаходу

Аналіз гомології послідовностей SEA та SEE (Fig.2) виявив, що неідентичні амінокислотні залишки сконцентровані у 8 різних районах. Поза цими 8 районами, що складають до 34% послідовності, ідентичність двох SE становить 97%, причому заміни консервативних амінокислот відповідальні за решту відмінностей. Чотири з цих районів структурно близькі до двох сайтів зв'язування MHC класу II (B: AA 37 - 50, D: 71 - 78, E: 136 - 149 та G: 189 - 195) та, мабуть, не взаємодіють з TCR. Додаткові чотири райони (A: AA 20 - 27, C: 60 - 62, F: 161 - 176 та H: 200 - 207) розташовані на кінці молекули, поблизу можливого сайту зв'язування TCR, який, як вважають, знаходився у канавці між двома субдоменами. Шляхом щеплення індивідуальних районів (заміни амінокислотних залишків, які відрізняються) ми тепер винайшли, що властивість SEA-кон'югатів індукувати цитотоксичну реакцію відповіді, а також посилювати проліферативну реакцію відповіді у відсутності MHC класу II, обумовлена одним районом у домені зв'язування TCR SEA. Цей Район (A) може переноситися у SEE та сильно впливати на активність у відсутності Класу II, хоча має обмежений вплив на VB-специфічність суперантигену (Fig.6, Таблиця 2). Мабуть, всі райони (A, C, F та H) беруть участь, прямо або опосередковано, у взаємодії з TCR, що проявляється у змінній стимулюючій дії на мишині Т-клітинні гібридоми (Таблиця 2).

Внаслідок аналогічного способу дії зрозуміло, що подібне структурне розділення цих TCR VB-зв'язуючих властивостей відноситься також до суперантигенів, аналогічних SEA та SEE. Те ж саме можна сказати і щодо інших типів суперантигенів, у яких зв'язуючі структури організовані інакше. Наше відкриття дозволило нам намітити у загальних рисах конструювання химерних суперантигенів, потенційно дуже цінних у якості терапевтичних засобів.

Винахід

Перший аспект даного винаходу являє собою спосіб лікування захворювання ссавця шляхом активації його імунної системи за рахунок введення терапевтично ефективної (імуноактивуючої) кількості модифікованого, переважно, химерного суперантигену. Переважним ссавцем є людина. Захворювання, про які йде мова, в основному пов'язані з клітинами, експресуючими на їх поверхні структуру-мішень, що зв'язується з суперантигеном. У більшості випадків ця структура-мішень відрізняється від епітопу TCR, що звичайно зв'язується з суперантигенами. Зв'язування зі структурою-мішенню робить можливими також зв'язування TCR і активацію Т-клітин. Ілюстративними прикладами є антигени MHC класу II та інші структури клітинної поверхні, які можуть експресуватися на клітинах, пов'язаних з ходом захворювань. Ілюстративними захворюваннями є недоброякісні пухлини, що включають ракові пухлини будь-якого типу (такі, як карцинома, саркома, меланома,

лімфома і т. д.), вірусні інфекції, паразитарні інвазії та аутоімунні захворювання. Рак, який може бути підданий лікуванню, може бути локалізований у ободочній кишці, молочній залозі, шийці матки, нирці, шлунку, тонкій кишці, дванадцятиперстовій кишці, простаті, яйці, шкірі, легені, печінці, підшлунковій залозі, скелеті і т. д., у тому числі також метастазування у різних місцях розташування. Активний інгредієнт даного винаходу придатний також для форм ракових захворювань, резистентних до багатьох лікарських засобів. Клітини, що експресують структуру-мішень, можуть також бути клітинами, які деяким чином контролюють або регулюють розвиток захворювання, що піддається лікуванню.

Характерною особливістю цього способу є те, що у ньому використовують модифікований суперантиген, в яких один або декілька амінокислотних залишків у районі (районі I), що забезпечує зв'язування з субпопуляцією Т-клітин через поліморфний ланцюг TCR, зокрема TCR VB, у суперантигені дикого типу (SA I), заміни відповідним амінокислотним залишком, що зберігає активність модифікованого таким чином суперантигену. Переважні на даний час варіанти відносяться до химерного суперантигену, в якому один або декілька амінокислотних залишків у районі (районі I) першого суперантигену дикого типу були замінені відповідними одним або декількома амінокислотними залишками у відповідному районі (районі II) другого суперантигену дикого типу (SA II). Райони I та II розрізняються по амінокислотним послідовностям. Суперантигени I та II були вибрані таким чином, що райони I і II можуть замінити один одного без знищення функції суперантигенів. У цьому зв'язку треба вважати фактом, що деякий район I може бути окремо нездатним до заміни на відповідний район другого суперантигену дикого типу, хоча при заміні разом з іншими районами, що визначають зв'язування TCR та активацію Т-кліток, результатом є функціонально активний суперантиген. Райони, що розглядаються, звичайно містять менше 20 залишків, зокрема, для суперантигенів, аналогічних SEA. Таким чином, амінокислотний залишок, що заміняє, відрізняється від залишку, що заміняється, та, як повинно бути зрозуміло, включає також консервативні заміни та заміни інших амінокислот, що призводять до функціонально активних модифікованих суперантигенів, які роблять можливими зв'язування з TCR VB та активацію субпопуляції Т-клітин. Це означає, що модифіковані у відповідності з даним винаходом суперантигени у широкому розумінні включають будь-який модифікований суперантиген, в якому одна або декілька амінокислот у вищезгаданих районах були функціонально замінені.

Термін "консервативна заміна" відноситься до заміни амінокислотного залишку хімічно подібним залишком, наприклад, гідрофобного залишку іншим гідрофобним залишком, зарядженого залишку іншим, але однаково зарядженим залишком і т. д.

В якості суперантигенів I, II і т. д. до моменту заяви про пріоритет переважними були стафілококові ентеротоксини, зокрема, ентеротоксини, які координують цинк, тобто SEA, SEE, SED і, можливо, також SEN.

Райони, що розглядаються, можуть мати будь-яку з вищезгаданих функцій (див. розділ з назвою "Відкриття, яке призвело до даного винаходу" та Експериментальну частину):

1. Сильний вплив на активність суперантигену як таку і обмежену дію на TCR-специфічність, зокрема, на VB-специфічність. Для суперантигенів SEA-типу це означає район A (положення амінокислот 20 - 27).

2. Глибокий вплив на специфічність щодо зв'язування з поліморфними ланцюгами TCR, такими як VB-ланцюг. Для суперантигенів SEA-типу це означає район C (положення суперантигенів амінокислот 60 - 62), F (положення амінокислот 110 - 126) та H (положення амінокислот 200 - 207).

Для SEA-подібних суперантигенів це означає одну або декілька замін (стосовно щеплення з SEA в SEE; SEE/A-химерам).

Район A: R20G, N21T, S24G, R27K

Район C: G60D, P62S

Район F: H111R, H114Q, G115Y, F117Y, G118N, S124V, G126D

Район H: D200G, P206S, D207N.

У момент заявлення пріоритету було переважно проводити всі заміни для кожного району. Для інших суперантигенів могли б також проводитися аналогічні заміни між відповідними положеннями/районами.

У типовому випадку можна було б починати з одного першого суперантигену, подібного SEE та SED, і потім замінити один або декілька його унікальних VB-зв'язуючих районів відповідним районом (районами) другого суперантигену (наприклад, SEA), причому перший та другий суперантигени переважно вибирають таким чином, що титр антитіл у нормальних сироватках людини для першого суперантигену нижче, ніж для другого суперантигену. Для химер SEA та SEE найкращі способи відповідають химерам SEE/A-A, SEE/A-AH, SEA/E-BDEG з абсолютною перевагою для SEE/A-A. Див. Експериментальну частину та фігури.

Разом з районами A, C, F і H можуть бути також замінені амінокислотні залишки в інших частинах. Одним типом обміну є обмін для зменшення здатності зв'язування класу II, оскільки ця властивість пов'язана зі звичайними побічними ефектами, що зустрічаються при терапії з використанням суперантигенів (загальною імунною активацією з супутнім системним вивільненням фактору некрозу пухлин (TNF) та інтерферона- γ). Для таких суперантигенів, як SEA, SED і SEE, положення, які важливі для здатності координувати іони цинку, можуть бути переважно змінені, тобто, наприклад, положення 225 та 227 в мутації H225A SEA та, особливо, D227A, мають позитивний вплив на зменшення токсичних побічних ефектів (див. Abrahmsen et al. WO 09601650 I Fraser et al. 1993).

Інші заміни можуть бути виконані по всій молекулі, якщо вони не порушують функції суперантигену, наприклад, консервативні заміни, зокрема, поза районами, що беруть участь у зв'язуванні з класом II і TCR. Зміни у послідовності ДНК для зміни зв'язування МНС класу II або будь-яка інша зміна на рівні ДНК може бути виконана або перед зміненням у районах забезпечення зв'язування з TCR, або після змінення. Ці інші типи модифікації можуть бути з тим же успіхом введені перед заміною амінокислот у Районі I. Таким чином, у

контексті даного винаходу концепція використання "суперантигену дикого типу" на початку модифікації відповідно до формули винаходу первинно відноситься до амінокислотної послідовності дикого типу у районі I, поза яким можуть мати місце попередні модифікації.

Конструювання химерних та мutowаних суперантигенів можна проводити у відповідності зі способами, добре відомими у цій області. Переключення від району, специфічного для одного суперантигену, до відповідного району у другому суперантигені здійснюють на геномному рівні, і воно може виконуватись заміною всієї послідовності або точковими мутаціями тих специфічних основ, які потрібні для одержання у результаті бажаної амінокислотної послідовності. Див., наприклад, експериментальну частину і також цитовані вище посилання попереднього рівня знань. Термін "мутація" включає заміну, вбудовування або видалення одного або декількох амінокислотних залишків шляхом модифікації послідовності ДНК, кодуючої білок, який повинен бути мutowаний.

Суперантиген для використання у способі даного винаходу може бути некон'югованим суперантигеном, модифікованим, як описано вище, тобто модифікованим суперантигеном, який не має специфічно приєднаної частини молекули, що впізнає мішень, але має явну здатність зв'язуватися як з антигенами МНС класу II, так і з субпопуляцією Т-клітин через TCR. Більш переважно, модифікований суперантиген, переважно, химерний еуперантиген, кон'югований з частиною молекули, що впізнає мішень. В останньому випадку переважними варіантами є "гібриди" (злиття) між частиною, що впізнає мішень, і модифікованим суперантигеном. Ці кон'югати як такі є новими та становлять собою окремий аспект даного винаходу.

Структури кон'югатів даного винаходу аналогічні відомим раніше кон'югатам антитіло/суперантиген (Dohlsten et al. WO 9201470; Abrahmsen et al., WO 09601650, обидві публікації включені в якості посилання), тобто кон'югати часто підпорядковуються формулі

T-B-SA(m)

де Т позначає частину молекули, що відшукує мішень, SA(m) є модифікованим, переважно химерним, суперантигеном, описаним вище, і В є ковалентним містковим зв'язком, що поєднує Т і SA(m) разом. Т може у принципі містити додаткові суперантигенні частини молекули (SA(m)), а SA(m) додатково частини молекули, що упізнають мішень, хоча у переважних кон'югатах є тільки одна частина, що упізнає мішень, і одна частина, що є модифікованим антигеном, як описано вище.

Т може бути у принципі будь-якою структурою, яка здатна зв'язуватися зі структурою поверхні клітини, переважно, специфічною для захворювання структурою. Структура, проти якої спрямований Т, звичайно відрізняється від (а) епітопу VB-ланцюга, з яким зв'язується SA(m), і (б) епітопів МНС класу IIb з якими зв'язуються суперантигени. Частину, що упізнає мішень, первинно вибирають серед інтерлейкінів (наприклад, інтерлейкін-2), гормонів, антитіл, у тому числі, антигензв'язуючих фрагментів антитіл, факторів росту і т. д. Див., наприклад, Woodworth, Preclinical and Clinical development of Cytokine toxins, presented at the conference "Molecular approaches to cancer Immunotherapy", Ashville, North Carolina, November 7 - 11, 1993).

На момент заявлення пріоритету було переважно, щоб Т був антитілом (повнорозмірним антитілом, Fab, F(ab)₂, Fv, одноланцюговим антитілом і будь-яким іншим антигензв'язуючим фрагментом антитіла), з особливою перевагою активних фрагментів антитіл (таких як Fab), спрямованих на так званий епітоп C242 (Lindholm et al., WO 9301303), або більш переважно, на зв'язуючий епітоп для антитіла 5T4, специфічного для раку легень (Stern et al., WO 8907947). Але це не виключає того, що інші специфічні для раку антитіла можуть функціонувати так же добре або навіть краще. Термін "антитіло" включає як моноклональні, так і поліклональні варіанти, переважно, моноклональні препарати.

Т може бути також спрямований на унікальні структури на більш або менш здорових клітинах, які регулюють або контролюють розвиток захворювання.

Містковий зв'язок В може бути вибраний, як описано раніше (Dohlsten et al., WO 9201470; i Abrahmsen et al., WO 9601650), тобто В переважно є гідрофільним та виявляє одну або декілька структур, вибраних з аміда, тіоефіра, дисульфіда і т. д. Найбільш відомими містковими зв'язками є зв'язки, одержані рекомбінантними способами, тобто кон'югування у цьому випадку має місце на геномному рівні. У таких випадках переважні олігопептидні містки, що містять гідрофільні амінокислотні залишки, такі як Gln, Ser, Gly, Glu, Pro, His та Arg. Особливо переважними В є пептидні містки, що складаються з 1 - 10 амінокислотних залишків, з абсолютною перевагою для 3 - 7 амінокислотних залишків. Типовим містком є трипептид GlyGlyPro, SEQ ID N1.

Одержання нових кон'югатів даного винаходу може проводитися у принципі у відповідності з двома головними шляхами реакцій: 1. Рекомбінантні способи та 2. Хімічне зв'язування упізнаючої мішені частини Т з модифікованим, переважно химерним, суперантигеном (SA(m)), описаним вище. Ці способи добре відомі дослідникам зі звичайною кваліфікацією та включають у себе велику кількість варіантів.

Хімічне зв'язування модифікованого некон'югованого суперантигену з частиною Т, що відшукує мішень, часто використовують функціональні групи (наприклад, первинні аміногрупи або карбоксигрупи), які присутні у багатьох положеннях у цих сполуках. З цього випливає, що кінцевий продукт буде містити суміш молекул кон'югату, що відрізняється по положенням зв'язування, а також гетеро- та гомокон'югати.

Для рекомбінантних кон'югатів (злитих білків) одержаний матеріал кон'югата буде однорідним щодо положення зв'язування. Або аміно-кінець химерного суперантигену буде зв'язаний з карбокси-кінцем частини, що упізнає мішень, або навпаки. Для антитіл, таких як інтактні антитіла та антигензв'язуючі фрагменти (Fab, Fv, одноланцюгові антитіла і т. д.), для злиття можуть бути використані або легкий ланцюг, або тяжкий ланцюг. У даний час переважні рекомбінантні кон'югати, найбільш переважно, Fab-фрагменти, та зв'язування аміно-кінця химерного суперантигену з першим константним доменом тяжкого ланцюга антитіла (CH1), без виключення аналогічного зв'язування з легким ланцюгом або з доменами VH і VL, яке також може дати дуже добрі результати.

Основна клітка-хазяїн для широкомасштабного рекомбінантного одержання модифікованих суперантигенів даного винаходу (як злитих форм, так і некон'югованих форм) є *E. coli*. Цей хазяїн забезпечує у принципі два шляхи: внутрішньоклітинне продукування та секрецію. Останній варіант є переважним, оскільки він забезпечує очищення правильно укладених білків з періплазми та з культурного середовища. Вищесказане не виключає того, що можна одержувати активні кон'югати також і в інших клітинах-хазяїнах, наприклад, у еукаріотичних клітинах, таких як дріжджі або клітини ссавців.

Фармацевтичні композиції, доза та шляхи введення.

Третім аспектом даного винаходу є фармацевтичні композиції, що містять модифіковані, переважно химерні, суперантигени даного винаходу, описані вище (як кон'юговані, так і некон'юговані форми). Композиції, що розглядаються, відомі у даній області, за виключенням того, що тепер вони містять суперантиген даного винаходу. Так, ці композиції можуть бути у формі ліофілізованого, що складається з часток матеріалу, стерильно асептично приготовленого розчину, таблетки, ампули і т. д. Можуть бути присутні носії, такі як вода (переважно забуферена до фізіологічно прийнятної величини pH, наприклад, за допомогою PBS (забуференого фосфатом фізіологічного розчину, ЗФР)) або інший твердий або рідкий матеріал. У загальних рисах, ці композиції готують з використанням кон'югату, змішаного, зв'язаного або іншим чином комбінованого з одним або декількома водорозчинними або нерозчинними у воді водними носіями (або розчиненого в них), якщо необхідно, разом з придатними добавками та ад'ювантами. Обов'язковим є те, що носії та умови не повинні здійснювати негативної дії на активність модифікованого суперантигену.

Звичайно суперантиген даного винаходу повинен продаватися та вводитися у заздалегідь розподілених дозах, кожна з яких містить ефективну кількість кон'югату, яка на основі наведеного тут результату повинна знаходитися у діапазоні 10нг - 50мг, наприклад, у діапазоні 10нг - 1мг або у діапазоні 10мкг - 50мг. Точна доза буде варіювати від випадку до випадку в залежності від ваги та віку пацієнта, шляхів введення, типу захворювання, частини молекули, що відшукує мішень, суперантигену, зв'язку (-В-) і т. д.

Шляхи введення є звичайно застосовуваними у даній області шляхами, тобто вбиваюча клітини-мішені ефективна кількість або терапевтично активна кількість суперантигену, модифікованого відповідно до винаходу, приводять у контакт з клітинами-мішенями. Для описаних вище показників це більшою частиною означає парентеральне введення, таке як ін'єкція або інфузія (підшкірна, внутрішньовенна, внутрішньоартеріальна, внутрішньом'язова, внутрішньочеревна) ссавцю, наприклад, людині. Розглядаємо модифіковані, переважно, химерні, суперантигени можуть вводитися місцево або системно.

Під терміном "вбиваюча мішень ефективна кількість" розуміють, що ця кількість є ефективною в активації та націлюванні Т-клітин для руйнування клітин-мішеней,

Переважний шлях введення у момент заявлення пріоритету відповідає шляху введення, що обговорюється для кон'югатів суперантигенів згідно Dohlstien et al, WO 9201470 і Abrahmsen et al., WO 9601650. Це означає 1 - 5-годинну внутрішньовенну інфузію (переважно 4-годинну) на день разом з жарознижуючим засобом (парацетамолом). Введення повинно повторюватися протягом декількох днів, наприклад, протягом 4 днів, з дотриманням безпеки щодо ризику посилення утворення антитіл, спрямованих проти кон'югату.

Суперантигени даного винаходу можуть вводитися або в якості основної терапії, або, в переважних схемах, в якості ад'ювантної (додаткової) терапії у сполученні з хірургією або іншими лікарськими засобами.

У контексті терапії ми виявили, що препарати антитіл, які є чистими щодо нековалентно зв'язаних тяжких та легких ланцюгів антитіл, забезпечують переваги порівняно з препаратами, що містять антитіла, в яких ці ланцюги зв'язані разом через цистинові зв'язки. Четвертим аспектом даного винаходу є терапевтичне використання препарату антитіл, зокрема, препарату Fab, в якому цистеїнові залишки, що зв'язують ланцюги разом, були замінені амінокислотою, що не дозволяє утворення дисульфідних зв'язків, наприклад, серином.

Найбільш переважними специфічними антитілами для цього аспекту винаходу були в момент заявлення пріоритету C242mab (Lindholm et al., WO 9301302) та 5T4 mab, як описано у цитованих вище посиланнях. У переважних варіантах один з ланцюгів антитіла злитий з суперантигеном, який здатний активувати субпопуляцію Т-клітин VB-специфічним чином, як описано вище. Суперантиген може бути антигеном дикого типу, химерою або варіантом з точковою мутацією (та їх комбінаціями), описаними вище або Dohlstien et al., WO 9201470 і Abrahmsen et al., WO 9601650. Цей аспект винаходу включає також фармацевтичні композиції, описані вище, але які містять препарат антитіл, описаних у даному аспекті винаходу, замість химерного суперантигену.

У момент заявлення пріоритету було переважно використовувати фрагмент Fab антитіла 5T4 (Stern et al., WO 8907947) у сполученні з химерою SEE/A-A з мутацією D227A. Переважний фрагмент Fab був мutowаний в обох ланцюгах у положенні, що забезпечує міжланцюгові дисульфідні зв'язки (Ser замість Cys). Для збільшення виходу злитого з антитілом білка при продукуванні його у *E. coli*. мутації також проводили у Vk-ланцюзі при визначених положеннях, Див, експериментальну частину.

МАТЕРІАЛИ ТА СПОСОБИ

Конструювання химерних генів SEA/SEE

Конструювання химер SEA/SEE виконували з використанням способу на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), перекриваючогося подовження послідовності (Horton et al.). ПЛР проводили з U1Tma (Perkin-Elmer) відповідно до рекомендацій виробників. Продуцуючі ПЛР фрагменти клонували у PCR-script (Stratagene, USA) та секвенували для перевірки правильності послідовності. Потім химерні гени суперантигенів субклонували у експресуючий вектор pKP889 (Abrahmsen et al., 1995), поєднуючи ці конструкції SE з частиною важкого ланцюга з фрагментом Fab мишиного моноклонального антитіла C215. Рекомбінантні злиті білки SEA та SEE одержували у вигляді повнорозмірних поліпептидів у відповідності з консенсусною послідовністю для відщеплення сигнального пептиду (von Heljne, 1986).

Експресія та очищення білка.

Штам UL635 *Escherichia coli* K12 використовували для експресії злитих білків Fab-SE та мутантів SEA, описаних раніше (Abrahmsen et al., 1995). Злиті білки Fab-SE збирали центрифугуванням при 5000g та фракції супернатанту піддавали очищенню на Протеїн G-Сепарозі (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), як описано раніше (Abrahmsen et al., 1995). Чистота афінно очищених варіантів Fab-SE була > 90% при аналізі з використанням електрофорезу у ДСН-ПААГ.

Клітини

Лінію клітин В-клітинної лимфоми людини Raji та карциноми ободової кишки людини Colo 205 культивували у повному R-середовищі (середовищі RPMI-1640) з додаванням 10% фетальної телячої сироватки (Gibco BRL, Life Technologies, Ltd. Paisley Scotland), 1mM глутаміна; HyClone Europe, Ltd. Cramlington, 5 x 10⁻⁵M В-меркаптоетанолу; ICN Biomedicals INC. Costa Mesa CA, 0,1M NaHCO₃; Seromed Blochome, 1 x 10⁻²M Непес-буфера; HyClone Europe, Ltd. Cramlington, 0,1мг/мл гентаміцина; Biological Industries Kibbutz Beit Haemek Israel, 1 x 10⁻³M пірватат натрія; HyClone Europe, Ltd. Cramlington). Клітини CHO, трансфоровані молекулами C215 і CD80 людини, культивували у повному R-середовищі з додаванням 0,5мг/мл Геніцитину (G418) Gibco BRL, Life Technologies, Ltd. Paisley Scotland). Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBM) одержували з гепаринізованої крові здорових донорів. Клітини виділяли центрифугуванням у градієнті щільності через Ficoll-Paque, як описано раніше (Dohlsten et al., 1991). Т-лімфоцити людини очищували до гомогенності позитивною селекцією з використанням колонок MiniMACS у поєднанні з магнітними гранулами, покритими моноклональними антитілами, специфічними для CD4 і CD8 людини (Miltenyi Biotec GmbH, Germany), відповідно до інструкцій виробників. Реагуючі з SEA і SEE (SEA- і SEE-реактивні) клітинні лінії людини одержували, як описано раніше (Dohlsten et al., 1994). Експресуючу TCR VB22 клітинну лінію людини одержували з первинно стимульованої реагуючої з SEA клітинної лінії за допомогою позитивного відбору з магнітними гранулами (Dynabeads, Dynal A.S., Norway), покритими моноклональними антитілами, специфічними для TCR VB22 (Immunotech, France). Збагачені клітини містили > 95% TCR VB22⁺ Т-клітин, як визначено проточною цитометрією (дані не наведені). Мишині Т-клітинні гібридоми (1B3, 2B4 та 11.40) одержували, як описано (Fleury et al., 1991).

Тест на цитотоксичність

Цитотоксичність вимірювали у стандартному тесті вивільнення ⁵¹Cr після 4 або 6 годин, як описано раніше (Dohlsten et al., 1991). Клітини Colo205 або Raji людини використовували в якості клітин-мішеней. Ефекторні клітини, SEA- або SEE- реактивні лінії Т-клітин людини або лінії TCR Vβ22⁺ клітин людини додавали при відношенні ефектору до мішені 30 : 1. ⁵¹Cr-мічені клітини-мішені використовували у тестах на цитотоксичність при 2500 клітин / 200мл повного середовища у лунках мікротитраційного планшету з V-дном. Гібриди C215Fab-SEA/E додавали при різних концентраціях, як вказано, та вивільнення ⁵¹Cr вимірювали на лічильнику Гейгера. Питому цитотоксичність у відсотках розраховували як 100 x [(експериментальне вивільнення у імп/хв. - фонове вивільнення у імп/хв.) / (загальне вивільнення у імп/хв. - фонове вивільнення у імп/хв.)].

Тести проліферації лімфоцитів

Для вимірювання проліферації 10⁵ Т-клітин-респондентів людини інкубували при 37°C з 10⁴ опроміненими (20000рад) стимулюючими клітинами у 200мл повного середовища у 96-луночному мікротитраційному планшеті з U-дном з різними кількостями гібридів C215Fab-SEA/E протягом 72 годин. Проліферацію оцінювали по включенню [³H]-тімідину, як описано (Dohlsten et al., 1988).

Аналіз інкубованого Fab-SAg продукування ІЛ-2

Клітини мишиної гібридоми Т - Т (10⁵) інкубували у 200мл повного середовища R-середовища з химерними білками C215Fab-SEA/E у присутності 2 x 10⁴ стимулюючих клітин Raji. Після 48 годин супернатанта збирали та аналізували на присутність мишиного ІЛ-2. Коротше, вміст цитокіна аналізували з використанням пацюкових mAb проти мишиного цитокіну в якості зв'язуючих антитіл. Очищені пацюкові антитіла проти мишиного ІЛ-2, пацюковий ІЛ-2 були придбані з Pharmingen (San Diego, CA). Мічені біотином tAbпроти цитокіна, набір Vectastain ABC (Vector Laboratories, CA) використовували для виявлення цитокінів. Поглинання визначали в Імунорідері (ImmunoReader NJ2000, InterMed Roskilde, Denmark) при 405 або 450нм.

Мутування 5T4Fab

Конструювання вектору для експресії 5T4Fab-SEA в E. coli

Кодуючі Fv частини 5T4 клонували з гібридами 5T4, одержаної від лікаря Петера Стерна (Stem et al., WO 8907947). Більш детально: кДНК одержували з мРНК, райони цілих варіабельних доменів і частини сигнальних послідовностей, а також перший константний домен важкого ланцюга та константний домен легкого ланцюга ампліфікували за допомогою ПЛР. Олігонуклеотиди

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

5'-ACTAGTCGACATGGATGGAGCTTATCATIyTCTT-3'(SEQ ID N 3)

використовували для важкого ланцюга з одержанням фрагменту 553п. н., тоді, як олігонуклеотиди

5'-ACTAGTCGACATGGGCITCAAGATGGAGTCACAKwyyCwGG-3'(SEQ ID N 4) і

5'-GCGCCGTCTAGAATTAACAACATTCCTGTTGAA-3'(SEQ ID N 5)

використовували для легкого ланцюга з одержанням фрагменту 724п. н. для кожного ланцюга секвенували три різних клонів та винайшли, що вони були ідентичними. Фрагменти ДНК, придатні для вбудовування в експресуючий вектор (ref), одержували у другій стадії ПЛР. Для збирання Fab-експресійної плазмиди варіабельні області 5T4 зливали з послідовностями, що кодують константні області, з мишиного IgG1/k антитіла C242 mab

(Lindholm et al, WO 9301302). Район, що кодує суперантиген, виготовлений з стафілококового ентеротоксину A(SEA), приєднували після важкого ланцюга. Підтверджена послідовність для V κ -ланцюга каркаса антитіла 5T4 наведена у результатах.

Мутагенез 5T4

Сім амінокислотних замін вводили у райони, що кодують каркас антитіл. Це були Phe10Ser, Thr45Lys, Ile63Ser, Tyr67Ser, Phe73Leu, Thr77Ser і Leu78Val. Подібним чином, залишки Cys у кожному ланцюгу, що беруть участь в утворенні міжмолекулярного дисульфідного зв'язку, були замінені залишками серину, що призводило до мутації Cys458Ser у важкому ланцюгу та Cys214Ser у легкому ланцюгу. Ці мутації вводили за допомогою мутагенезу на основі ПЛР та одержану послідовність ДНК підтверджували секвенуванням.

Експресія у ферменті та очищення 5T4Fab-SEA.

Експресійна плазмід містить ген стійкості до канаміцину та 1acUV5-промотор, який може індукуватися IPTG. Злиті білки очищували з освітленого культурального середовища з використанням Протеїн G-Сефарози та SP-Сефарози (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) та переводили у цитратний буфер за допомогою Сефадексу G-25 в основному, як описано. Характеристика за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ, зворотнофазової ВЖХ (ВЖХ у зворотній фазі) та мас-спектрометрії показала, що очищений злитий білок мав чистоту 95% та мав правильну молекулярну масу.

РЕЗУЛЬТАТИ: Модифікації суперантигену

Суперантиген-залежну клітинну цитотоксичність (SDCC) C215Fab/SEA і C215Fab-SEE проти МНС класу II⁺-клітин Raji аналізували з використанням SEA- і SEE-реактивних Т-клітин людини в якості ефекторних клітинних ліній. Недивлячись на різницю у VB-специфічності між SEA і SEE обидва суперантигена виявляли індукцію порівнюваного ступеня цитотоксичності з обома ефекторними клітинними лініями (Фіг.1). Для розрізнення між ефектами надання МНС класу II і прямими діями SEA і SEE у впізнанні TCR їх досліджували у тесті суперантиген-антитіло-залежної клітинної цитотоксичності (SADCC) проти експресуючих C215 клітин Colo205. У цьому тесті Fab-частина спрямовує злитий білок до експресуючих C215 клітин-мішеней і призводить до надання злитих молекул SE цитотоксичним Т-клітинам (CTL) незалежно від молекул МНС класу II (Dohlsten et al., 1994). Не дивлячись на > 80% ідентичність амінокислотної послідовності між SEA і SEE, взаємодія з TCR SEA і SEE виявляє якісні різниці у цьому типі тесту. Злитий білок C215Fab-SEA зберігає його здатність спрямовувати SEA- і SEE-реактивні CTL проти МНС класу II-клітин-мішеней (Фіг.1), тоді як C215Fab-SEE не може індукувати цитотоксичність щодо МНС класу II-клітин-мішеней ні з SEA, ні з SEE-реактивними CTL (Фіг.1).

Раніше повідомлялося іншими дослідниками, що відмінність у VB-специфічності між SEA та SEE первинно зв'язана з відмінностями у трьох амінокислотах у петлі, що передує спіралі a5, а у спіралі a5 (Irwin et al., 1992, Hudson et al., 1993, Fraser et al., 1993 і Mollick et al., 1993). Різниці щодо взаємодії з TCR, повідомлені у цьому дослідженні, не зв'язані зі зміненою TCR VB-специфічністю, оскільки здатність C215Fab-SEA індукувати МНС класу II-незалежну цитотоксичність не обмежується SEA-реактивними CTL, але також спостерігається з SEE-реактивними CTL.

Аналіз гомології послідовності SEA та SEE (Фіг.2) виявляє, що неідентичні амінокислотні залишки сконцентровані у восьми різних районах. Поза цих вісім районів, що складають до 34% послідовності, ідентичність двох SE становить 97%, причому за решту відмінностей відповідні консервативні амінокислотні заміни. Чотири з негомологічних районів структурно близькі до двох сайтів зв'язування МНС класу II (B, D, E і G), і вони, мабуть, не взаємодіють з TCR (Фіг.3). Додаткові чотири райони (A: AA 20 - 27, C: 60 - 62, F: 161 - 176 та H: 200 - 207) локалізовані на кінці молекули (Фіг.3), поблизу сайту зв'язування TCR, розташованого у канавці між двома субдоменами (Kappler et al., 1992). Для дослідження якісної відмінності у впізнанні TCR між SEA та SEE ми виготовили гібридні білки щепленням районів з SEA та SEE у вигляді химер одного району (SEE/A-A, -C, -F, H) у вигляді гібридів двох районів (SEE/a-AH) та щепленням районів, локалізованих поблизу сайтів зв'язування МНС класу II на SEE у SEA (SEA/E-BDEG) (Фіг.4). Всі ці химерні SE експресувалися у вигляді злитих білків з C215Fab для виявлення відмінностей щодо їх активності у відсутності МНС класу II.

Гібридні білки SEA/E, злиті з C215PFab-часткою, виявляють відмінність у Fab-націлених тестах цитотоксичності.

SDCC-активність гібридних білків C215Fab-SEE/A проти МНС класу II⁺-клітин Raji аналізували з використанням SEA-реактивних Т-клітин людини в якості ефекторів. Величини EC₅₀ всіх гібридів C215Fab-SE, а також C215Fab-SEAwt та -SEEWt (wt = дикого типу) знаходяться у межах помилок (наприклад, 10⁻¹² – 10⁻¹¹ M, Фіг.5). Єдиною відмінністю, що детектується, є трохи знижене плато для гібриду C215Fab-SEE/A-AH, що вказує на втрату Т-клітин. З іншого боку, у SADCC-експерименті, де цитотоксичність спрямована на лінію МНС класу II⁺/C215⁺-клітин Colo205, тільки гібриди C215Fab-SEE/A-A, C215Fab-SEE/A-AH та C215Fab-SEE/E-BDEG індукуювали цитотоксичність, що порівнюється з цитотоксичністю C215Fab-SEAwt (Фіг.5). Гібрид C215Fab-SEE/A-F здатний індукувати C215-спрямовану цитотоксичність при більш високих концентраціях (EC₅₀ > 10⁻¹⁰ M). Хоча гібрид C215Fab-SEE/A-AH здатний індукувати C215-спрямовану цитотоксичність з такою ж EC₅₀, що і C215Fab-SEAwt (наприклад, EC₅₀ 10⁻¹³ M), абсолютний рівень цитотоксичності значно зменшується (Фіг.5). Ця відмінність могла б бути наслідком обмеженої VB-специфічності C215Fab-SEE/A-AH, хоча здатність індукувати C215-спрямовану цитотоксичність переважає у відповідаючій субпопуляції Т-клітин. Для подальшого дослідження цієї ідеї ми приготували V β 22-олігоклональну лінію CTL людини. VB22 людини аналогічні VB3 мишей у тому відношенні, що вони являють собою сімейство V β , специфічне для SEA та неспецифічне для SEE, Раніше було показано (Mollick et al., 1993), що головний внесок VB SEA і SEE первинно пов'язаний з відмінністю в трьох амінокислотах між SEA і SEE в районі H (AA 200 - 207). В SDCC-тестах проти МНС класу

II⁺-клітин Raj1 (мішеней) з використанням VB22-олігокл опальної лінії CTL в якості ефекторів тільки гібриди, що містять район SEA-H, здатні давати C215Fab-SEAwT-подібну реакцію відповіді (наприклад, C215Fab-SEE/A-H, C215Fab-SEE/-AH та C215Fab-SEA/E-BDEG, Фіг.6). Гібрид C215Fab-SEA/A-A, який здатний індукувати повну SDCC-відповідь з усіма популяціями CTL в якості ефекторів, у цьому тесті сильно знижений як щодо напівмаксимальної концентрації, так і щодо плато (Фіг.6). Коли цитотоксичність VB22 CTL спрямована на лінію MHC класу II/C215⁺-клітин Colo205, тільки гібриди, що містять як SEA-A, так і SEA-H (наприклад, C215Fab-SEE/A-AH і C215Fab-SEE/E-BDEG) райони, здатні індукувати цитотоксичну відповідь, що порівнювану з відповіддю, що індукується C215Fab-SEAwT (Фіг.6). Гібрид, що містить тільки район A SEA (C215 Fab-SEE/A-A), індукуює більш низький рівень цитотоксичності з порівняльною величиною EC₅₀. Це вказує на те, що решта активності, що спостерігається з гібридом C215Fab-SEE/A-AH, у тесті SADCC з популяцією цілих Т-клітин в якості ефекторів не є наслідком відповіді, що індукційованої гібридом, у рестрикуваній популяції Т-клітин. Більш ймовірним поясненням цього спостереження є те, що здатність індукувати SADCC-відповідь гібридних білків C215Fab SE первинко зв'язана з районом SEA-A та з меншим внеском з боку районів SEA-H і -F. Немає доказів, що ця якість обмежується тільки будь-якою субпопуляцією Т-клітин у поєднаній SEA-SEE-відповідаючій популяції Т-клітин, оскільки гібрид C215Fab-SEA здатний індукувати ту ж саму відповідь з SEE-реактивними CTL, та гібрид C215Fab-SEE/A-A здатний повністю відтворювати відповідь, що спостерігається з C215Fab-SEA.

Гібридні білки SEA/E, злиті з C215Fab-частиною, виявляють відмінність у Fab-націлених тестах проліферації

Раніше було показано, що очищені спочиваючі неактивні Т-клітини людини індукуються щодо проліферації при наданні C215Fab-SEA на лінії MHC класу II/C215/CD80⁺-клітин (Lando et al, 1993). Але, здатність C215Fab-SEA індукувати MHC II-незалежну проліферацію помітно зменшується з C215FabSEE (Таблиця 1). Для дослідження, чи пов'язана ця відмінність в якості також з районом A SEA, як це спостерігали у SADCC-тестах, ми досліджували проліферативну активність гібридів C215Fab-SE, що надаються або CHO-DR1⁺/CD80⁺, або CHO-C215⁺/CB80⁺ трансфікованими клітинними лініями, на очищених спочиваючих Т-клітинах людини. При наданні кон'югатів Fab-SE на CHO-DR1⁺/CD80⁺ не було відмінностей між різними білками SE (дані не наведені). Але, щеплення районів A, C і H SEA у SEE посилюють проліферативну активність порівняно C215Fab-SEE. Найкращі результати були одержані шляхом прищеплення районів A та H SEA, що вказує на важливу роль району A, як це спостерігали для MHC класу II-незалежної цитотоксичності. Можливо, що при застосуванні негативної селекції відмінності між Fab-SEA і -SEE були більш значимими.

VB-специфічність SE-гібридів.

Для подальшого дослідження, чи зв'язані гібридні злиті білки C215Fab-SEA/SEE з визначеною VB-специфічністю, ми використовували SEA-реактивні мишині Т-клітинні гібридами, експресуючі VB1, VB3 і VB11. З одержаних даних очевидно, що всі досліджені райони, прямо або опосередковано, впливають на взаємодію з TCR. При щепленні районів C і F SEA в C215Fab-SEE активність щодо SEA- і SEE-перехресно реактивної VB-гібридами I1B3 знижується. Ти ж самі химери, мабуть, не впливають або здійснюють незначний вплив на активність VB3- і VB11-гібридом (2.B4 і 11.40) порівняно з C215Fab-SEE. При щепленні району A SEA у C215Fab-SEE активність щодо VB3 (2.B4) збільшується, принаймні, у 10 разів порівняно з C215Fab-SEE. Більш помітно виражені ефекти спостерігаються з тою ж клітинною лінією при щепленні району H SEA у C215Fab-SEE. Цей більш сильний ефект щодо впливу району H SEA на VB-специфічність відзначався також у більш ранніх дослідженнях (Mollick et al., 1993). Однак, та ж сама химера (C215Fab-SEE/A-H), мабуть, зменшує активність щодо SEA/SEE-перехресно реактивних VB1- і VB11-гібридом (I1B3 і 11.40) у 10 раз. На завершення, можна відзначити, що взаємодія з SEA з TCR, мабуть, включає в себе всі варіабельні райони A, C, F і H SEA-SEE.

Сіркорективність

Сіркорективність у пробах сироваток людини щодо химерних SE досліджували як у поєднаних пробах у різних частин світу, так і в індивідуальних пробах сироваток. Шляхом щеплення обох районів A і H SEA у SEE ми одержали проміжну Сіркорективність (Фіг.8). Подібну Сіркорективність спостерігали також проти химери C215Fab-SEE/A. Однак окремі щеплення району A SEA (C215Fab-SEE/A-A) дали C215Fab-SEE-подібну Сіркорективність, що говорить про те, що за решту сіркорективності проти C215Fab-SEE/A-AH відповідальний район H SEA. Це вказує на те, що район H SEA є домінуючим антигенним епітопом у SEA. Сіркорективність поєднаних проб сироваток з інших частин світу (Японії та СІЛА), а також 14 окремих проб з Швеції підтверджує один і той же загальний характер результатів (не показано).

РЕЗУЛЬТАТИ: Мутації Fab-частини злитих білків

Експресія конструкцій 5T4FabSEA

Було виявлено, що рівень продукування 5T4Fab-SEA у E. coli. у ферменті значно нижче, ніж у інших конструкцій Fab-суперантиген, досліджених у нашій лабораторії. Тому були введені два типи модифікацій для збільшення рівня продукування. По-перше, були введені сім різних точкових мутацій у каркасну область легкого ланцюга. Це були Phe10Ser, Thr45Lys, Ile63Ser, Tyr67Ser, Phe73Leu, Thr77Ser та Leu78Val. По-друге, залишки цистеїну, що утворюють дисульфідний зв'язок, що поєднує тяжкий та легкий ланцюги, були замінені залишками серину. Остання модифікація призвела до трикратного збільшення, а 7 точкових мутацій призвели до додаткового 12-кратного збільшення рівня продукування. Крім значного збільшеного рівня продукування, видалення дисульфідного зв'язку також призвело до одержання більш гомогенного продукту, оскільки виключена можливість реакції реакційноздатних тіолових груп з іншими агентами, що містять тіол.

Модифіковану молекулу 5T4 перевіряли на спорідненість з її антигеном, а також на біологічну активність у SADCC-тестах. У цих тестах не змогли виявити відмінностей між мутантною формою та формою дикого типу.

Мутацію Cys/Ser одержували також у тяжких і легких ланцюгах фрагментів Fab декількох інших

моноклональних антитіл. Продукти ставали гомогенними та повністю зберігали їх здатність зв'язування антигену.

Послідовність району каркасної області антитіла для V κ -ланцюга 5T4:
 DAVMTQTPTFLVLSAGDRVITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPTLLISY50
 TSSRYAGVPDRFIGSGYGTDFTFITSLQAEDLAVYFCQQDYNSPPTFGG100
 GTKLEIK (SEQ ID NO 6).

Підкреслені послідовності є CDR. Положення, виділені більш жирним шрифтом, були мутовані: Phe10Ser, Thr45Lys, Ile63Ser, Ile63Thr, Tyr67Ser, Phe73Leu, Thr77Ser і Leu78Val.

Таблиця 1	
Проліферація (EC ₅₀ (nM))	
C215Fab-SEAw _t	2,2
C215Fab-SEEW _t	6,9
C215Fab-SEE/A-A	0,9
C215Fab-SEE/A-C	2,8
C215Fab-SEE/A-F	5,7
C215Fab-SEE/A-H	1,0
C215Fab-SEE/A-AH	0,3
C215Fab-SEA/E-BDEG	1,6

Таблиця 2			
	I1B3(MuVB1)	2.B4(MuVB3)	11.40(MuVB11)
	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)
C215Fab-SEA	10	3	0,05
C215Fab-SEE	10	> 1000	0,05
C215Fab-SEE/A-A	10	10	0,05
C215Fab-SEE/A-C	> 1000	> 1000	0,05
C215Fab-SEE/A-F	> 300	> 300	0,05
C215Fab-SEE/A-H	100	3	0,3
C215Fab-SEE/A-AH	10	3	0,3

Підписи до фігур

Фіг.1 MHC класу II-залежна та -незалежна цитотоксичність з SEE- і SEA-CTL людини

MHC класу II-залежна клітинна цитотоксичність (A і B) і C215-залежна клітинна цитотоксичність (C і D) з молекулами C215Fab-SEA (■) та C215Fab-SEE (◆) в якості ефекторних молекул. Цитотоксичність аналізували у стандартному 4-годинному тесті вивільнення ⁵¹Cr з використанням SEE-реактивної лінії Т-клітин людини (A і C) та SEA-реактивної лінії Т-клітин людини (B і D). Клітинними лініями-мішенями були MHC класу II⁺-клітин Rajl (A і B) та MHC класу II⁺/C215⁺-клітин Colo205 (C і D). Представлені дані з окремих тестів, які представляють два (A і C) - п'ять (B і D) незалежних експериментів.

Фіг.2. Аналіз гомології первинної структури SEA і SEE

Варіабельні райони SEA/SEE поблизу сайту зв'язування TCR (A, C, F і H) та варіабельні райони поблизу двох сайтів зв'язування MHC класу II.

Фіг.3. Ескіз моделі SEA

Модель (Molscript model, Kraulls, 1991) кристала SEA (Schad et al., 1995). Варіабельні райони SEA/SEE поблизу сайту зв'язування TCR (A, C, F і H) та варіабельні райони поблизу двох сайтів зв'язування MHC класу II. Іон цинку у вигляді круглого шарика.

Фіг.4. Схематичне представлення химерних молекул SE

Відрізки послідовності SEA знижені. Варіабельні райони SEA/SEE позначені A, B, C, D, F, G і H.

Фіг.5. MHC класу II-залежна та -незалежна цитотоксичність з SEA-CTL людини

(A) MHC класу II-залежна клітинна цитотоксичність і (B) C215-залежна клітинна цитотоксичність C215Fab-SEE/A-A (◆), C215Fab-SEE/A-C (ξ), C215Fab-SEE/A-F (◊), C215Fab-SEE/A-H (●), C215Fab-SEE/A-AH (Δ) і C215Fab-SEA/E-BDEG (O). Цитотоксичність аналізували у стандартному 4-годинному тесті вивільнення ⁵¹Cr з використанням SEA- реактивної лінії Т-клітин людини. Клітинними лініями-мішенями були MHC класу II⁺-клітин Rajl (A) та MHC класу II⁺/C215⁺-клітин Colo205 (B). Представлені дані з окремих тестів, які представляють п'ять незалежних експериментів.

Фіг.6. MHC класу II-залежна та -незалежна цитотоксичність з V β ⁺CTL людини

(A) MHC класу II-залежна клітинна цитотоксичність і (B) C215-залежна клітинна цитотоксичність C215Fab-SEA (■), C215Fab-SEE (◆), C215Fab-SEE/A-A (◆), C215Fab-SEE/A-C (ξ), C215Fab-SEE/A-F (◊), C215Fab-SEE/A-H (●), C215Fab-SEE/A-AH (Δ) і C215Fab-SEA/E-BDEG (O) в якості ефекторних молекул. Цитотоксичність аналізували у стандартному 4-годинному тесті вивільнення ⁵¹Cr з використанням V β 22-відібраної SEA-реактивної лінії Т-клітин людини. Клітинними лініями-мішенями були MHC класу II⁺-клітин Rajl (A) та MHC класу II⁺/C215⁺-клітин Colo205 (B). Представлені дані з окремих тестів, які представляють два незалежних експерименти.

Фіг.7. MHC класу II-залежна та -незалежна проліферація (не наведена у пріоритетних заявках)

Дія гібридів Fab-SE на МНС класу II-залежну (А) та -незалежну (В) проліферацію Т-клітин. Очищені Т-клітини людини стимулювали протягом 96 годин C215Fab-SEA (■), C215Fab-SEE (◆), C215Fab-SEE/A-A (◆), C215Fab-SEE/A-C (ξ), C215Fab-SEE/A-F (○), C215Fab-SEE/A-H (●), C215Fab-SEE/A-AH (Δ) і C215Fab-SEA/E-BDEG

(O) представленими на МНС класу II⁺/C215⁻ CHO-DR4/C215⁻ - трансфектантах (А) та МНС класу II⁺/C215⁺-CHO-CD80/C215⁻ - трансфектантах (В). Після 72 годин клітини імпульсно-мітили [3H]-тімідином протягом 24 годин і включену мітку вимірювали та представляли у вигляді напівмаксимальної концентрації (EC₅₀). Представлені дані з окремих тестів, які представляють два незалежних експерименти.

Фіг.8. Сіркорективність у пулу Іg людини

Пул з > 5000 сироваток зі здорових донорів у Південній Європі проти злитих білків. Серійно розведеному Іg людини давали взаємодіяти протягом 1 години при кімнатній температурі з C215Fab-SEAw_t, C215Fab-SEEW_t, C215Fab-SEE/A-A, C215Fab-SEE/A-H і C215Fab-SEE/A-AH, імобілізованими на мікротитраційних планшетах при концентрації 1нг/лунку. Корекцію на зв'язування з сироватковими білками робили відніманням OD-величини для C215Fab у кожній точці. Кожна точка являє собою середнє з двох повторностей (двох проб). Подальші деталі див. у Матеріалах і способах.

Таблиця 1. Очищені Т-клітини людини стимулювали протягом 96 годин відповідними C242Fab-SE, представленими на МНС класу II-негативних CHO-CD80/C215-трансфектантах. Після 72 годин клітини імпульсно-мітили ³H-тімідином протягом 24 годин і включену мітку вимірювали та представляли у вигляді напівмаксимальної концентрації (EC₅₀)

Таблиця 2. Мишині Т-клітинні гібридами стимулювали протягом 48 годин або химерним Fab-кон'югованим суперантигеном. Активність вимірювали у вигляді продукування ІЛ-2 і представляли у вигляді напівмаксимальної концентрації (EC₅₀).

Робота протягом року пріоритету

У спробі зведення до мінімуму токсичності злитого білка (суперантиген-антитіло) C215Fab-SEE/A-A химеру SEE/A-A мутували у сайтах зв'язування Класу II, як описано у WO 9601650 і зливали з C215Fab. Були одержані конструкції C215Fab-SEE/A-A-D227A, C215Fab-SEE/A-A-F47A/D227A, C215Fab-SEE/A-A-H187A/D227A, C215Fab-SEE/A-A-W130A/D227A, C215Fab-SEE/A-A-D70A/D227A, C215Fab-SEE/A-A-N50S/D227A, C215Fab-SEE/A-A-N50S/D70A/D227A, C215Fab-SEE/A-A-F47Y/D227A och C215Fab-SEE/A-A-D70R/D227A. Всі злиті білки досліджували на здатність індукувати проліферацію PBMC людини для ідентифікації мутантів, що мають знижену активність порівняно з C215Fab-SEE/A-A-D227A. Знижену проліферативну активність спостерігали для C215Fab-SEE/A-A-F47A/D227A, C215Fab-SEE/A-A-F47Y/D227A, och C215Fab-SEE/A-A-D70R/D227A. Деякі з химерних злитих білків досліджували також на титр антитіл у нормальній сироватці людини (C215Fab-SEE/A-A-D227A, C215Fab-SEE/A-A-D70A/D227A і C215Fab-SEE/A-A-D70R/D227A). Проводили порівняння з C215Fab-SEA-D227A і C215Fab-SEE-D227A. Відносно C215Fab-SEA-D227A, титр був набагато нижче для кожної дослідженої химери. Відносно C215Fab-SEE-D227A, титр був трохи вище для кожної химери.

Це означає заміни у положеннях, що відповідають одній або декільком, переважно двом, з положень 47, 50, 70, 130, 187, 227, згідно нумерації у SEQ ID №7 і 8 у Фіг.2.

Оскільки багато різних варіантів та змін можуть бути зроблені в об'ємі описаної тут концепції винаходу, та оскільки можуть бути зроблені модифікації в описаних тут детально варіантах відповідно до передбачених вимог закону до формули винаходу, повинно бути зрозуміло, що описані тут деталі повинні розглядатись як ілюстративні, а не як обмежувальні.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Формула винаходу

1. Кон'югат між суперантигеном дикого типу, який був модифікований, та частиною молекули, що відшукує мішень, який відрізняється тим, що зазначений модифікований суперантиген містить амінокислотну послідовність, яка відрізняється від амінокислотної послідовності першого суперантигену дикого типу тим, що один або декілька амінокислотних залишків в районі I, який знаходиться у TCR (рецептор Т-клітин) – зв'язуючому сайті та визначає зв'язування з V β -ланцюгом TCR і активацію Т-клітин, зазначеного першого суперантигену замінені амінокислотними залишками з відповідних положень у другому суперантигені дикого типу таким чином, що зазначений модифікований суперантиген має покращену здатність індукувати проліферацію та цитотоксичність Т-клітин порівняно з першим суперантигеном дикого типу і має зменшену серореактивність порівняно з другим суперантигеном дикого типу, і модифікований суперантиген додатково містить мутацію, яка зменшує його здатність зв'язуватися з МНС-антигенами класу II порівняно також з вказаним суперантигеном дикого типу.

2. Кон'югат за п. 1, який відрізняється тим, що зазначений перший суперантиген дикого типу є стафілококовим ентеротоксином А (SEA).

3. Кон'югат за п. 1, який відрізняється тим, що зазначений перший суперантиген дикого типу є стафілококовим ентеротоксином Е (SEE).

4. Кон'югат за п. 2, який відрізняється тим, що другий суперантиген дикого типу є стафілококовим ентеротоксином Е (SEE).

5. Кон'югат за п. 3, який відрізняється тим, що другий суперантиген дикого типу є стафілококовим

ентеротоксином А (SEA).

6. Кон'югат за п. 4, який відрізняється тим, що зазначений район І є районом А, що складається з амінокислотних залишків 20-27 амінокислотної послідовності SEQ ID №8:

5	Ser	Glu	Lys	Ser	Glu 5	Glu	Ile	Asn	Glu	Lys 10	Asp	Leu
	Arg	Lys	Lys 15	Ser	Glu	Leu	Gln	Arg 20	Asn	Ala	Leu	Ser
10	Asn 25	Leu	Arg	Gln	Ile	Tyr 30	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Lys 35	Ala

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

U A 4 6 7 7 2 C 2

U A 4 6 7 7 2 C 2

	Ile	Thr	Glu	Asn 40	Lys	Glu	Ser	Asp	Asp 45	Gln	Phe	Leu	7.
5	Glu	Asn 50	Thr	Leu	Leu	Phe	Lys 55	Gly	Phe	Phe	Thr	Gly 60	
10	His	Pro	Trp	Tyr	Asn 65	Asp	Leu	Leu	Val	Asp 70	Leu	Gly	
15	Ser	Lys	Asp 75	Ala	Thr	Asn	Lys	Tyr 80	Lys	Gly	Lys	Lys	
	Val 85	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ala 90	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Gln 95	Cys	
20	Ala	Gly	Gly	Thr 100	Pro	Asn	Lys	Thr	Ala 105	Cys	Met	Tyr	
25	Gly	Gly 110	Val	Thr	Leu	His	Asp 115	Asn	Asn	Arg	Leu	Thr 120	
30	Glu	Glu	Lys	Lys	Val 125	Pro	Ile	Asn	Leu	Trp 130	Ile	Asp	
35	Gly	Lys	Gln 135	Thr	Thr	Val	Pro	Ile 140	Asp	Lys	Val	Lys	
	Thr 145	Ser	Lys	Lys	Glu	Val 150	Thr	Val	Gln	Glu	Leu 155	Asp	
40	Leu	Gln	Ala	Arg 160	His	Tyr	Leu	His	Gly 165	Lys	Phe	Gly	
45	Leu	Tyr 170	Asn	Ser	Asp	Ser	Phe 175	Gly	Gly	Lys	Val	Gln 180	
	Arg	Gly	Leu	Ile	Val 185	Phe	His	Ser	Ser	Glu 190	Gly	Ser	
50	Thr	Val	Ser 195	Tyr	Asp	Leu	Phe	Asp 200	Ala	Gln	Gly	Gln	
55	Tyr 205	Pro	Asp	Thr	Leu	Leu 210	Arg	Ile	Tyr	Arg	Asp 215	Asn	
60	Lys	Thr	Ile	Asn 220	Ser	Glu	Asn	Leu	His 225	Ile	Asp	Leu	
	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Thr								
	230												

65 Кон'югат за п. 4, який відрізняється тим, що зазначений район I є районом C, що складається з амінокислотних залишків 60-62 амінокислотної послідовності SEQ ID №8.

8. Кон'югат за п. 4, який відрізняється тим, що зазначений район I є районом F, що складається з амінокислотних залишків 160-176 амінокислотної послідовності SEQ ID №8.

9. Кон'югат за п. 4, який відрізняється тим, що зазначений район I є районом H, що складається з амінокислотних залишків 200-207 амінокислотної послідовності SEQ ID №8.

10. Кон'югат за п. 5, який відрізняється тим, що зазначений район I є районом A, що складається з амінокислотних залишків 20-27 амінокислотної послідовності SEQ ID №8.

11. Кон'югат за п. 5, який відрізняється тим, що зазначений район I є районом C, що складається з амінокислотних залишків 60-62 амінокислотної послідовності SEQ ID №8.

12. Кон'югат за п. 5, який відрізняється тим, що зазначений район I є районом F, що складається з амінокислотних залишків 160-176 амінокислотної послідовності SEQ ID №8.

13. Кон'югат за п. 5, який відрізняється тим, що зазначений район I є районом H, що складається з амінокислотних залишків 200-207 амінокислотної послідовності SEQ ID №8.

14. Кон'югат за п. 10, який відрізняється тим, що в ньому проведені такі амінокислотні заміни: R20G, N21T, S24G і R27K, де позиції визначені в амінокислотній послідовності SEQ ID №8.

15. Кон'югат за п. 14, який відрізняється тим, що додатково містить мутацію у положенні 227 як визначено у амінокислотній послідовності SEQ ID №8.

16. Кон'югат за п. 15, який відрізняється тим, що зазначена мутація являє собою D227A.

17. Кон'югат за будь-яким з пунктів 1-16, який відрізняється тим, що зазначена частина молекули, що відшукує мішень, вибирається з групи, яка складається з активного щодо зв'язування антигена фрагмента антитіла зв'язуючий антиген антитіла, одноланцюгового антитіла, Fab, F(ab)₂ і Fv.

18. Кон'югат за будь-яким з пунктів 1-17, який відрізняється тим, що використовується для лікування захворювання ссавця шляхом активації його імунної системи.

19. Кон'югат за п. 18, який відрізняється тим, що захворювання зв'язано з клітинами, експресуючими структуру-мішень поверхні, яка зв'язується з суперантигеном в епітопі, що структурно відрізняється від епітопа, що зв'язується з TCR з наступною активацією Т-клітин.

20. Кон'югат за п. 19, який відрізняється тим, що захворювання вибрано з групи, яка складається з ракових захворювань, вірусних інфекцій, паразитарних інвазій і аутоімунних захворювань.

(2) ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ SEQ ID № 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ:

(A) ДОВЖИНА: 3 амінокислоти

(B) ТИП: амінокислота

(D) ТОПОЛОГІЯ: лінійна

(ii) ТИП МОЛЕКУЛИ: пептид

(xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ: SEQ ID № 1:

Gly Gly Pro
1

(3) ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ SEQ ID № 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ:

(A) ДОВЖИНА: 24 п.н.

(B) ТИП: нуклеїнова кислота

(C) КІЛЬКІСТЬ ЛАНЦЮГІВ: один

(D) ТОПОЛОГІЯ: лінійна

(xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ: SEQ ID № 2:

CAATTCTTCTT GTCCACCTTG GTGC

(4) ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ SEQ ID N 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ:

(A) ДОВЖИНА: 35 п.н.

(B) ТИП: нуклеїнова кислота

(C) КІЛЬКІСТЬ ЛАНЦЮГІВ: один

(D) ТОПОЛОГІЯ: лінійна

(xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ: SEQ ID № 3:

ACTAGTCGAC ATGGATGGAG CTATATCATI YTCTT

U A
4 6 7 7 2
C 2

U A
4 6 7 7 2
C 2

(5) ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ SEQ ID № 4

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ

- (A) ДОВЖИНА 41 п н
- (B) ТИП нуклеінова кислота
- (C) КІЛЬКІСТЬ ЛАНЦЮГІВ один
- (D) ТОПОЛОГІЯ лінійна

(xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID № 4

АСТАГТСГАС АТГГГСІТСА АГАТГГАГТС АСАКWYYCWG G

(6) ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ SEQ ID № 5

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ

- (A) ДОВЖИНА 34 п н
- (B) ТИП нуклеінова кислота
- (C) КІЛЬКІСТЬ ЛАНЦЮГІВ одна
- (D) ТОПОЛОГІЯ лінійна

(xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID № 5

GCGCCGTCTA GAATTAACAC TCATTCTGT TGAA

(7) ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ SEQ ID № 6

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ

- (A) ДОВЖИНА 107 амінокислот
- (B) ТИП амінокислота
- (D) ТОПОЛОГІЯ лінійна

(xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID № 6

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

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

(8) ІНФОРМАЦІЯ ДЛІА SEQ ID № 7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ:

(A) ДОВЖИНА: 233 амінокислоти

(B) ТИП: амінокислота

(D) ТОПОЛОГІЯ: лінійна

(ii) ТИП МОЛЕКУЛИ: пептид

(xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ: SEQ ID № 7:

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

(9) ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ SEQ ID № 8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ:

(A) ДОВЖИНА: 233 амінокислоти

(B) ТИП: амінокислота

(D) ТОПОЛОГІЯ: лінійна

(ii) ТИП МОЛЕКУЛИ: пептид

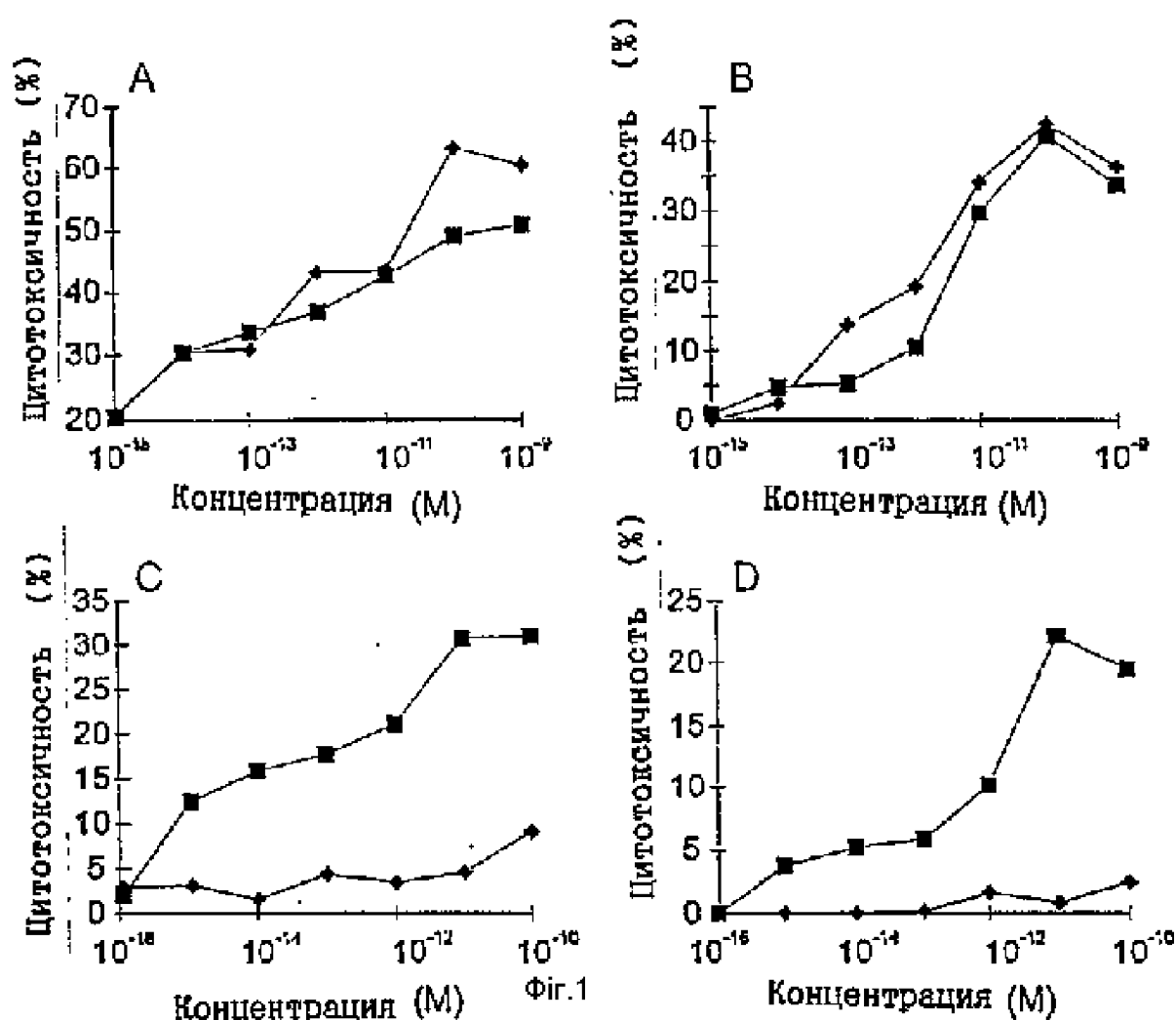
(xi) ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ: SEQ ID № 8:

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

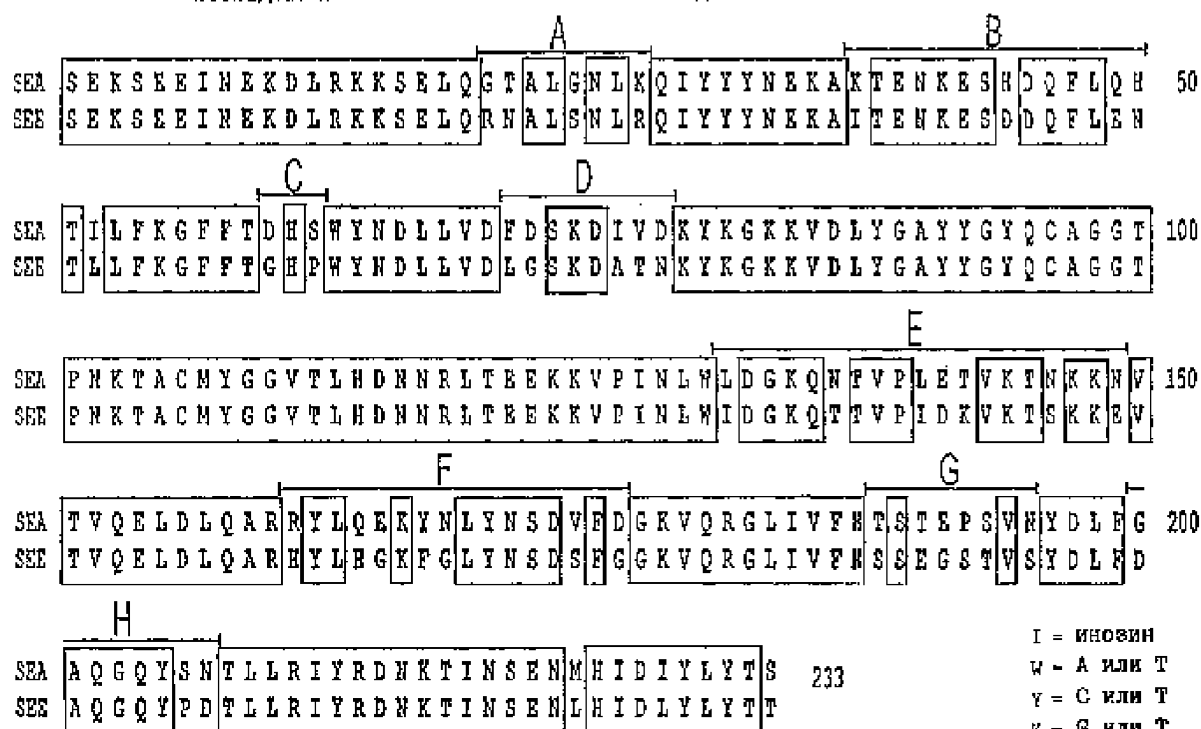
Gly	Lys	Gln 135	Thr	Thr	Val	Pro	Ile 140	Asp	Lys	Val	Lys
Thr 145	Ser	Lys	Lys	Glu	Val 150	Thr	Val	Gln	Glu	Leu 155	Asp
Leu	Gln	Ala	Arg 160	His	Tyr	Leu	His	Gly 165	Lys	Phe	Gly
Leu	Tyr 170	Asn	Ser	Asp	Ser	Phe 175	Gly	Gly	Lys	Val	Gln 180
Arg	Gly	Leu	Ile	Val 185	Phe	His	Ser	Ser	Glu 190	Gly	Ser
Thr	Val	Ser 195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

U A 4 6 7 7 2 C 2

U A 4 6 7 7 2 C 2



ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ID № 7: SEA ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ID № 6: SEE



I = ИНОЗИН
W = А ИЛИ Т
Y = С ИЛИ Т
K = G ИЛИ Т

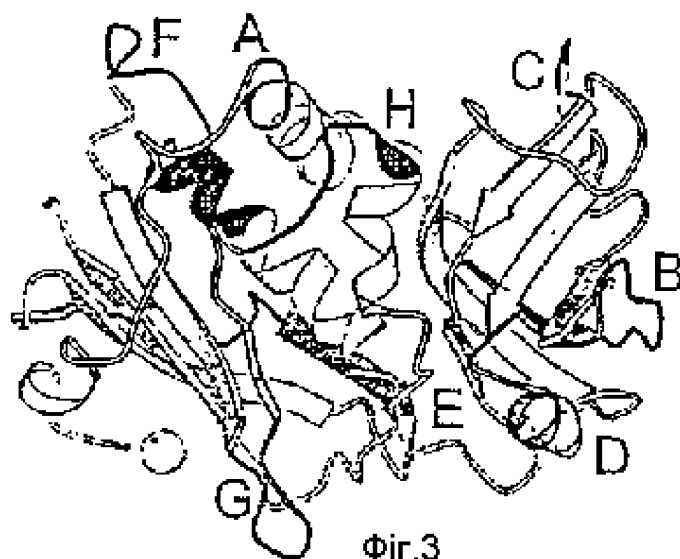
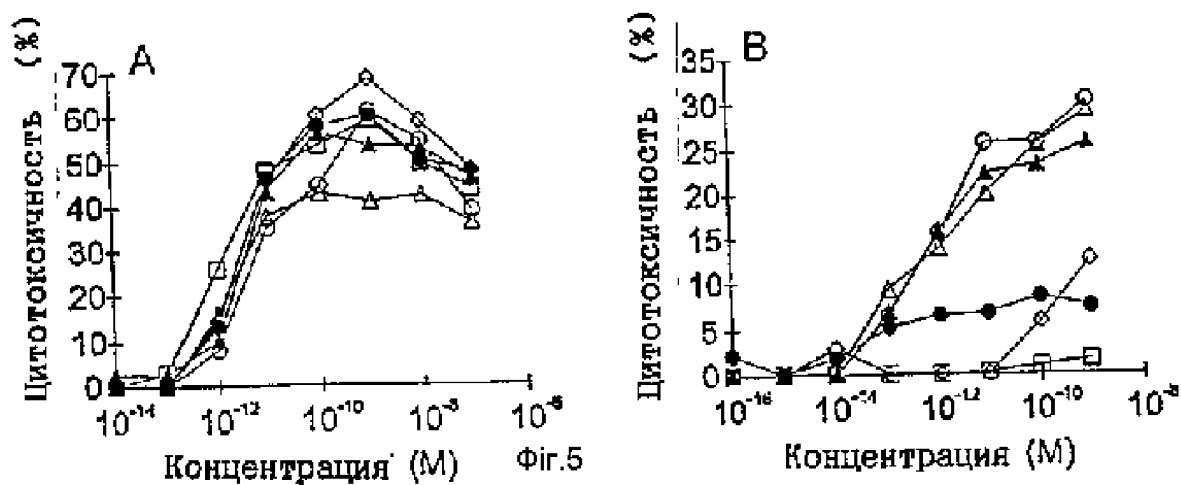
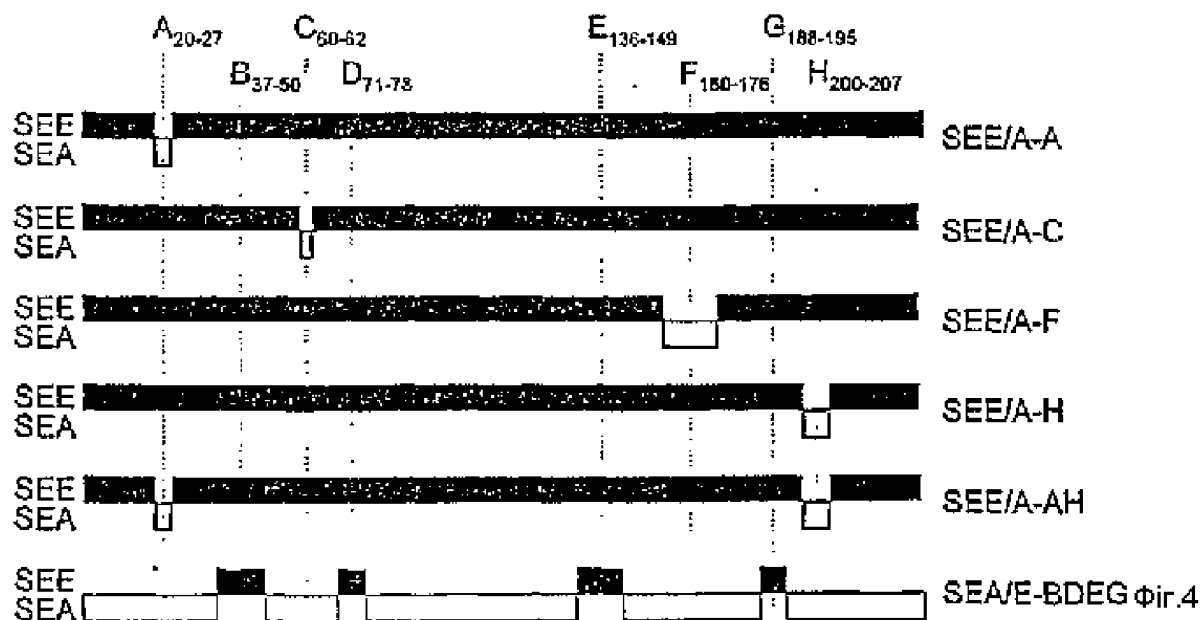
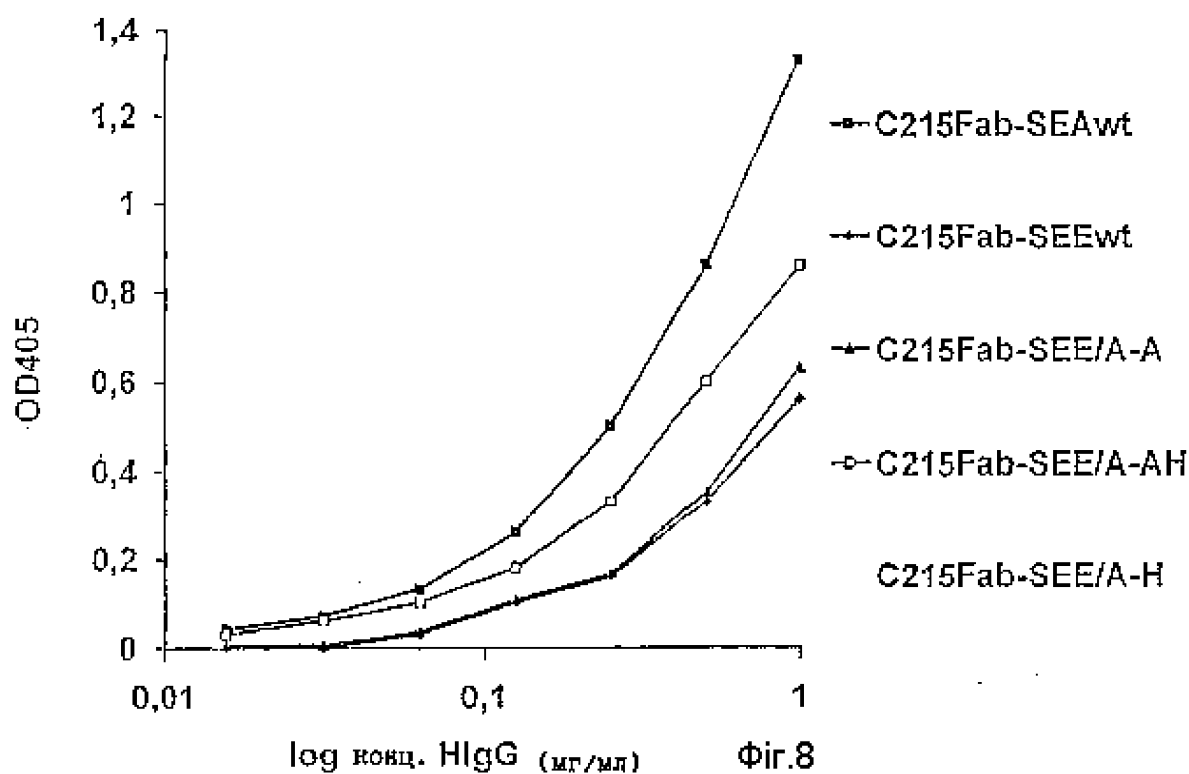
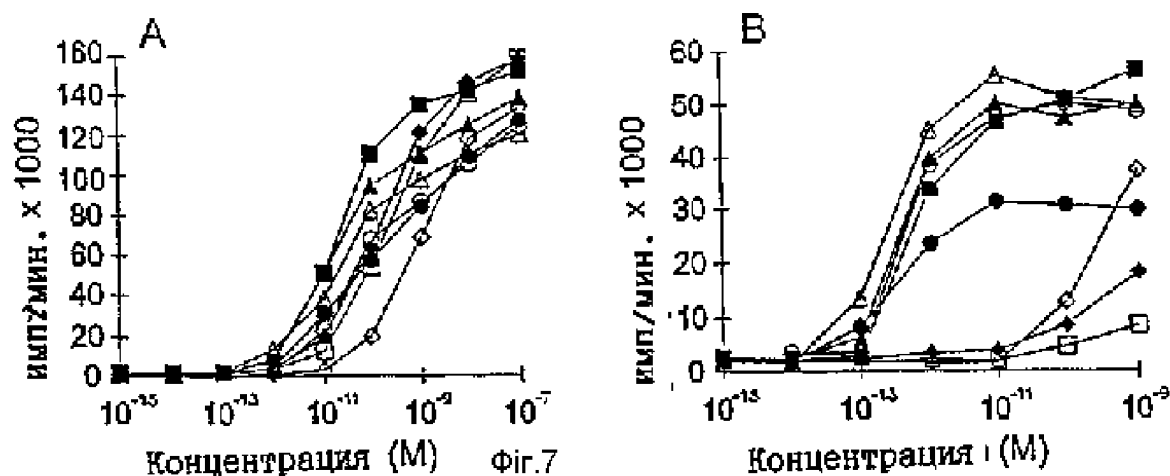
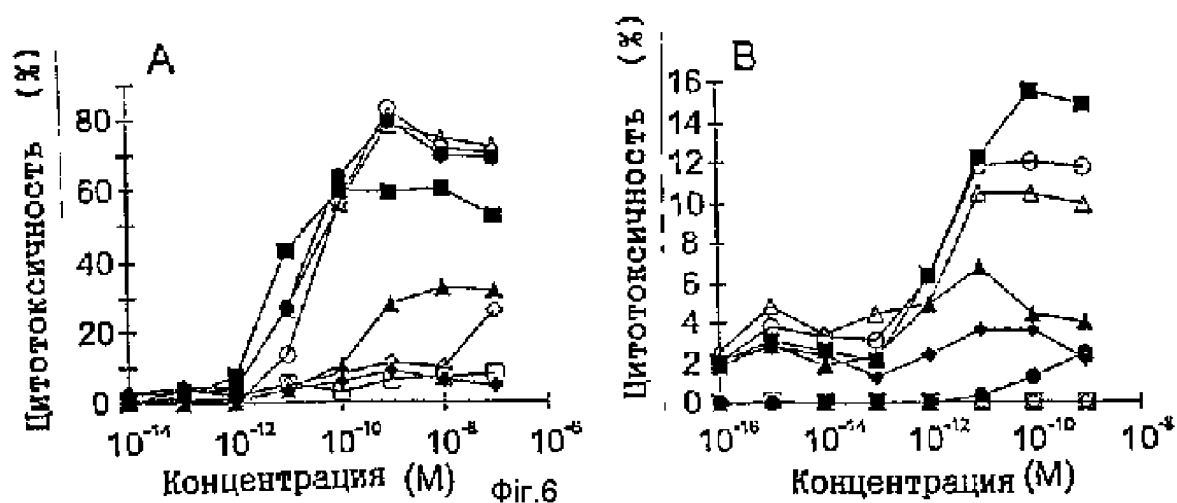


Fig. 3





Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 6, 15.06.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.