



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 067** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **C 07K 16/46, A 61K 39/00,**
47/48, C 07K 19/00, 14/31

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 97020534, 07.06.1995
(24) Дата начала действия патента: 15.06.2005
(30) Приоритет: 11.07.1994 SE 9402430-4
(46) Дата публикации: 15.06.2005
(86) Заявка PCT:
PCT/SE95/006812, 19950607

(72) Изобретатель:
Абрахамсен Ларс, SE,
Бьорк Пер, SE,
Дохлстен Микаэль, SE,
Калланд Терье, SE
(73) Патентовладелец:
ЕКТИВ БАЙОТЕК АБ, SE

(54) КОНЬЮГАТ МЕЖДУ МОДИФИЦИРОВАННЫМ СУПЕРАНТИГЕНОМ И НАПРАВЛЕННЫМ К МИШЕНИ СОЕДИНЕНИЕМ

(57) Реферат:
Изобретение относится к конъюгату, состоящему из ковалентно сшитых между собой биоспецифичного лиганда, способного связываться с predetermined структурой клеточной поверхности, и мутированного суперантигена, который обладает пониженной аффинностью к антигенам МНС класса II. Конъюгат обладает способностью активировать Т-лимфоциты для лизиса клеток, которые экспрессируют указанную клеточную

поверхностную структуру, которая является ассоциированной с заболеванием, таким как злокачественная опухоль, вирусная инфекция, аутоиммунные заболевания.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2005, N 6, 15.06.2005. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** (11) **73 067** (13) **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 07K 16/46, A 61K 39/00,**
47/48, C 07K 19/00, 14/31

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

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

(21), (22) Application: 97020534, 07.06.1995

(24) Effective date for property rights: 15.06.2005

(30) Priority: 11.07.1994 SE 9402430-4

(46) Publication date: 15.06.2005

(86) PCT application:
PCT/SE95/006812, 19950607

(72) Inventor:

Abrachamsen Lars, SE,
Bjoerk Per, SE,
Dohlsten Mikael, SE,
Kalland Terje, SE

(73) Proprietor:

ACTIVE BYOTEC AB, SE

(54) **CONJUGATE BETWEEN MODIFIED SUPERANTIGENE AND COMPOUND DIRECTED TO THE TARGET**

(57) Abstract:

The invention refers to a conjugate which consists of covalently linked between each other biospecific ligand which can bind with predefined structure of cell surface and mutated superantigene which have decreased affinity to antigenes MNS class II. Conjugate have an ability to activate the T-lymphocytes for lysis of cells which express noted cell surface structure that

is associated with disease such as malignant tumor, viral infection, autoimmune diseases.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2005, N 6, 15.06.2005. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 067** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **C 07K 16/46, A 61K 39/00,**
47/48, C 07K 19/00, 14/31

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
97020534, 07.06.1995

(24) Дата набуття чинності: 15.06.2005

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 11.07.1994 SE 9402430-4

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.06.2005

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
PCT/SE95/006812, 19950607

(72) Винахідник(и):

Абрахмсен Ларс , SE,
Бьйорк Пер , SE,
Дохлстен Мікаель , SE,
Калланд Терье , SE

(73) Власник(и):

ЕКТІВ БАЙОТЕК АБ, SE

(54) КОН'ЮГАТ МІЖ МОДИФІКОВАНИМ СУПЕРАНТИГЕНОМ І НАПРАВЛЕНОЮ ДО МІШЕНІ СПОЛУКОЮ

(57) Реферат:

Винахід стосується кон'югату, що складається з ковалентно зшитих між собою біоспецифічного ліганду, здатного зв'язуватись з визначеною структурою клітинної поверхні, і мутованого суперантигену, що має знижену афінність до

антигенів МНС класу II. Кон'югат має здатність активувати Т-лімфоцити для лізису клітин, які експресують вказану клітинну поверхневу структуру, яка є асоційованою з захворюванням, таким як злоякісна пухлина, вірусна інфекція, аутоімунні захворювання.

Суперантигены в основном являются белками вирусной или бактериальной природы и способны к одновременному связыванию с антигенами МНС класса II клеток млекопитающего и V β цепью рецептора Т клетки. Связывание приводит к активации Т-лимфоцитов и лизису клеток, проявляющих МНС класса II. Умеренная степень полиморфизма связывающей части V β цепи приводит к активации относительно большой части Т-лимфоцитов при контакте с суперантигеном (по сравнению с активацией посредством обычного процессинга антигена). Первоначально понятие суперантигена было связано с различными стафилококковыми энтеротоксинами (SEA, SEB, SEC₁, SEC₂ и SEE). Недавно был открыт новый стафилококковый энтеротоксин, названный SEH (Keyonog et al., J. Exp. Med. 180 (1994) 1675-1683). С ростом интереса были открыты дальнейшие суперантигены. Среди прочих, примерами являются Токсин 1 синдрома токсического шока (TCTШ-1-TSST-1), отслаивающие (экзофолирующие) токсины (Exft), которые связаны с синдромом шелушения кожи, стрептококковый пирогенный экзотоксин А, В и С (СПЭ А, В и С), белки вируса опухоли молочной железы мыши (BOMЖМ-MMTV), М белки стрептококков, энтеротоксин Клостридиума перфрингенс (*Clostridia perfringens*) (КПЭТ-CPET). В качестве обзора по суперантигенам и их свойствам [см. Kotpin et al., Adv. Immunol. 54 (1993) 99-166].

В качестве функционального суперантигена рассматривался экзотоксин А *Pseudomonas*, поскольку имеются данные, свидетельствующие, что данный токсин может быть подвержен внутриклеточной процессии под действием вспомогательных клеток на фрагменты, которые экспрессируются на клеточной поверхности, обладающие способностью связываться с V β цепью, с последующей активацией Т клеток. [*Pseudomonas* exotoxin A. Legaard et al., Cell Immunol, 135 (1991) 372-382].

Для терапии различных заболеваний были предложены такие суперантигены с лечебным действием, которое сопровождается активацией иммунной системы [Kalland et al., WO 9104053; Terman et al., WO 9110680; Terman et al., WO 9324136; Newell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 1074-1078].

Совместно с вакцинами было предложено использовать суперантигены, которые мутировали таким образом, чтобы потерять свою TCR связывающую активность [Kapler & Marrack, WO 9314634].

Мутации суперантигенов были описаны ранее [Kapler & Marrack, WO 9314634; Kappler et al, J. Exp. Med. 175 (1992) 387-396; Grossman et al., J. Immunol. 147 (1991) 3274-3281; Hufnagle et al., Infect. Immun, 59 (1991) 2126-2134].

Ранее нами было предположено использовать для терапии конъюгаты между суперантигеном и антителом для того, чтобы лизировать клетки, которые экспрессируют структуры, относительно которых направлены антитела [Dohlstien et al., WO 9201470; Lando et al., Cancer Immunol, Immunother. 36 (1993) 223-228; Kalland et al., Med. Oncol. Tumor Pharmacother, 10 (1993) 37-47; Zando et al., J. Immunol, 150 (8, часть 2) (1993) 114A (Joint Meeting of the American Association of Immunologists and Clinical Immunology Society, Denver, Colorado, USA, May 21-25 (1993), Lando et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res, Annu. Meet. 33(0) (1992) 339 (Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego, California, USA, May 20-25 (1992)); Dohlstien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 9287-9291].

Предположительными заболеваниями, предназначенными для лечения являются рак, вирусные инфекции, паразитарные инвазии, аутоиммунные заболевания и другие заболевания, связанные с экспрессией структур на поверхности клеток, специфических для заболевания. Ранее проведенные экспериментальные работы были направлены на конъюгаты, содержащие рекомбинантные SEA и различные противораковые антитела. Подобные конъюгаты имели несколько сниженную способность связываться с антигеном МНС класса II, сравнимую с таковой у неконъюгированной формы суперантигена. Является ли пониженная способность связывания антигена МНС класса II для достижения оптимального лизиса и оптимального терапевтического эффекта полезной или нет, определено не было.

Эксперименты по иммунной терапии с применением SEB: химически конъюгированным с опухолеспецифическим антиидиотипическим антителом были ранее описаны Ochi et al., (J. Immunol. 151 (1993) 3180-3186).

В период проведения расследования приоритета заявки в Шведском патентном бюро, был дополнительно цитирован Buelow et al., (J. Immunol, 148 (1992) 1-6), который описывает слияния между белком А и фрагментами SEB, без усиления связывания МНС класса II, или использования слияния для уничтожения клеток; и Hartwig et al., (Int. Immunol, 5 (1993) 869-875), который описывает мутацию, влияющую на связывание МНС класса II неслитой формы суперантигена стрептококкового эритрогенного токсина А.

Первым объектом изобретения является усовершенствование ранее известных конъюгатов суперантиген-антитело в отношении к общей иммунной стимуляции по сравнению с направленной цитотоксичностью. Стимуляция приводит к активации Т-лимфоцитов и зависит от способности суперантигена связываться и с рецептором Т клетки, и с антигеном МНС класса II.

Вторым объектом изобретения является получение конъюгатов между дубликатами с биоспецифическим сродством (например, антителами) и суперантигенами с модифицированным сродством к антигенам МНС класса II. Это, как было теперь показано, улучшает селективность по отношению к суперантиген антитело зависимому цитолизу клетки (SADCC) в клетках, проявляющих антиген (по отношению к которому направлен конъюгат антитела/дубликата биоспецифического сродства) по сравнению с другими клетками, проявляющими антигены МНС класса II.

Третьим объектом изобретения является получение конъюгатов, которые могли бы быть использованы в

качестве активного начала при лечении млекопитающих, болеющих раком, аутоиммунными заболеваниями, паразитарными инвазиями, вирусными инфекциями или другими заболеваниями, связанными с клетками, которые экспрессируют на своей поверхности структуры, которые являются специфическими для соответствующего заболевания.

Главным аспектом изобретения является конъюгат, включающий

а. дубликат с биоспецифическим средством, который направлен по отношению к структуре, с которой он предназначен связываться в конъюгате,

б. пептид, который

i. является производным суперантигена,

ii. обладает способностью связываться с V β цепью рецептора Т клетки, и

iii. обладает модифицированной способностью связываться с антигенами МНС класса II, по сравнению с суперантигеном, производным которого является пептид (дикий тип суперантигена =SA(wt)).

Пептид и дубликат по сродству являются ковалентно связанными друг с другом через мостик (В).

Предпочтительные конъюгаты имеют способность активировать и направлять Т-лимфоциты к избирательному лизису клеток, которые на своей поверхности проявляют структуру, по отношению к которой направлен дубликат по сродству. Это означает, что конъюгаты будут вызывать цитоллиз в способе, опосредованном SADCC (суперантиген антитело зависимая клеточная цитотоксичность). См.

экспериментальную часть ниже и наши предыдущие публикации, относящиеся к конъюгатам между суперантигенами и антителами [например, Dohlstien et al., WO 9201470]. Конъюгаты по изобретению имеют структуру, которая является аналогичной к конъюгату суперантигена-антитела, описанной в предшествующей области техники [Dohlstien et al., WO 9201470, которая здесь включена в качестве ссылки], т.е., конъюгат соответствует формуле:

T-B-SA(m)

где, Т представляет дубликат по биоспецифическому сродству, SA(m) представляет модифицированный суперантиген (вышеупомянутый пептид) и В представляет ковалентный мостик, связывающий Т и SA(m) вместе.

Т, в принципе, может быть любой структурой, которая связывается посредством биоспецифического сродства. В большинстве важных случаев, Т способен к связыванию с поверхностной структурой клетки, предпочтительно, специфической для заболевания структурой, как дано выше. Структура, относительно

которой направлен Т, обычно является отличной от (а) эпитопа V β цепи, с которым связывается пептид, производный от суперантигена (SA(m) и (б) эпитопа антигена МНС класса II, с которым связывается немодифицированный суперантиген. Дубликат Т по биоспецифическому сродству может первично быть отобран из интерлейкинов (например, интерлейкин-2), гормонов, антител и фрагментов антител, связывающих антиген, факторов роста и т.п. См., например, Woodworth, Preclinical and Clinical Development of Cytokine Toxines (доклиническая и клиническая разработка цитокинных токсинов), представленная на конференции "Molecular Approaches to Cancer Immunotherapy", Ashvill, ноябрь 7-11, 1993. Связывание полипептидов с константным доменом иммуноглобулинов (например, Протеины А, G и L), лектинами, стрептавидином, биотином и т.п., находилось в порядке очередности, представляющем меньшее значение.

В порядке очередности, было предпочтительным, чтобы Т являлся антителом или фрагментом антитела, связывающим антиген (включая Fab, F(ab)₂, Fv, антитело с одной цепью и т.п.), с конкретным усилением активного фрагмента антитела (такого как Fab) у антител, направленных относительно, так называемых, C242 эпитопов [Lindholm et al, WO 9301303] или по отношению к другим раковоспецифическим эпитопам.

В случае, когда Т является антителом, это первично моноклональное или смесь определенного количества моноклональных (например, 2, 3, 4, 5 или больше) антител. Т может быть поликлональным антителом, в случае, если использование является нетерапевтическим.

Необязательно, для Т иметь полипептидную структуру. Модифицированный суперантиген SA(m) является первично мутированным антигеном, но может также потенциально быть химически модифицированным суперантигеном, включая фрагменты суперантигенов, сохраняющих способность связываться с V β цепью рецептора Т клетки.

Выражение "мутированный суперантиген" означает, что природная способность суперантигена связываться с антигенами МНС класса II была модифицирована на геномном уровне путем замены, вставки или удаления одной или нескольких аминокислот из природного суперантигена.

Фрагменты суперантигена, полученные путем мутаций по удалению части полной аминокислотной последовательности, и фрагменты, полученные путем ферментативного или химического расщепления суперантигена, могут быть использованы эквивалентно в химических конъюгатах по изобретению.

Модифицированный суперантиген SA(m) может включать одну или несколько аминокислотных последовательностей, которые являются производными от различных суперантигенов и, которые могли быть мутированными, например, комбинации предпочтительных суперантигенов, упомянутых выше.

Модифицированный суперантиген SA(m), как таковой, может проявлять пониженную иммуногенность и токсичность, по сравнению с нативным суперантигеном.

Другие группы/соединения, которые способны к перекрестной реакции с V β -цепью рецептора Т клетки, могут также потенциально быть использованы эквивалентно с мутированным суперантигеном (SA(m)), как дано выше. Подобные группы/соединения могут быть не полипептидной структуры.

В конце года приоритета большинство интересующих продуктов-кандидатов по изобретению, включали мутированные формы суперантигенов, имеющих множественные участки связывания МНС класса II, и/или способность к координатной связи с Zn²⁺, например, SEA, SED, SEE и SEH.

Т, также как и SA(m), может быть получен при помощи рекомбинантного способа.

Мостик В может быть выбран, как ранее было описано (Dohlsten et al., WO 9201470), а именно, будет предпочтительно гидрофильным и проявлять одну или несколько структур(у), выбранных из амида, тиоэфира, эфира, дисульфида и т.п. В случае если мостик имеет незамещенные неразрывные углеводородные цепи, они предпочтительно не имеют ароматических колец, таких как фенил. Наиболее важными мостиками являются те, которые получены при помощи рекомбинантного способа, т.е., когда конъюгация имеет место на геномном уровне. В подобных случаях являются предпочтительными олигопептидные мостики, содержащие остатки гидрофильных аминокислот, такие как Gln, Ser, Gly, Glu и Arg. Могут быть включены также Pro и His. В течение года приоритета было решено, что предпочтительным мостиком является пептид, включающий три аминокислотных остатка (GlyGlyPro).

Конъюгат по изобретению может включать один или несколько модифицированных суперантигенов на дубликат по биоспецифическому сродству, и наоборот. Это означает, что Т в вышеуказанной формуле, может содержать один или несколько модифицированных суперантигенов в добавление к биоспецифическому дубликату. По аналогии, SA(m) может содержать один или несколько Т дубликатов по биоспецифическому сродству. Дубликат по сродству Т и SA(m) может также включать другие структуры. Количество модифицированных суперантигенов на дубликат по сродству составляет, предпочтительно, один или два.

Синтез новых конъюгатов по изобретению может быть проведен, в принципе, согласно двум главным путям: 1. рекомбинантным способом и 2. химическим присоединением Т к SA(m). Способы хорошо известны для обычного, квалифицированного в данной области работника и включают большое количество вариантов. Из этого следует, что изобретение относится первично к искусственным конъюгатам, то есть, конъюгатам, которые не обнаруживаются в природе.

Химическое сшивание модифицированного суперантигена с дубликатом Т биоспецифического сродства часто применяет функциональные группы (например, первичные аминогруппы или карбоксигруппы), которые имеются во многих положениях каждого соединения. Из этого следует, что конечный продукт будет содержать смесь конъюгатов молекул, различающихся по отношению к положению, по которому произошло сшивание. Для рекомбинантных конъюгатов (слитых белков), полученные конъюгированные субстанции будут единообразными по отношению к положению сшивания. Или концевой амин модифицированного суперантигена пришивается к карбокси концу дубликата по биоспецифическому сродству, или наоборот. Для подобного слияния для антител, таких как интактные антитела и фрагменты связывания антигена (Fab, FV и т.п.), может быть использована либо легкая, либо тяжелая цепь. В настоящее время предпочтительны рекомбинантные конъюгаты, с предпочтением для Fab фрагментов и пришиванием amino конца модифицированного суперантигена к первому константному домену тяжелой цепи антитела (CH1), без включения аналогов, сшивающихся с легкой цепью или с VH VL доменами, которые также могут дать достаточно хорошие результаты.

Существует два различных способа получения больших количеств суперантигенов (включая модифицированные и слитые формы) на E.coli: внутриклеточная продукция и секреция. Последний способ предпочтителен для конъюгатов по изобретению, поскольку он предполагает очистку правильно уложенного белка из периплазмы и из культуральной среды. Внутриклеточная продукция приводит к сложному способу очистки и часто требует повторное укладывание белка in vitro (для того, чтобы получать белок с правильной третичной структурой). Вышеуказанное не исключает, что, возможно, получить активные конъюгаты также и в других клетках хозяев, например, эукариотических клетках, таких как дрожжи или клетки млекопитающих.

Получение мутированных суперантигенов и отбор мутантов, имеющих модифицированную способность связываться (сродство) к антигену MHC класса II, может быть проведено в соответствии с известными способами [см. Kappler et al., J. Exp. Med., 165 (1992) 387-396]. См. также нашу экспериментальную часть.

Способность конъюгата связываться с V β цепью рецептора Т клетки, со структурой-мишенью и вызывать лизис клетки-мишени зависит, в частности, от пептида (SA(m)), который является производным от суперантигена, дубликата (Т) по биоспецифическому сродству и структуры и длины мостика (В). Квалифицированный работник способен оптимизировать конъюгаты по изобретению в отношении способности связываться и способности вызывать лизис путем изучения взаимоотношения между структурой и эффектом с помощью той модели, которая описана в соответствии с предыдущим знанием по конъюгатам суперантигена и антитела [см. вышеприведенные публикации]. См также экспериментальную часть ниже.

Первоначально предполагалось, что путем модификации способности связывать антиген MHC класса II, соотношение IC₅₀(SA(wt)):IC₅₀(SA(m)) составляет <0,9 (90%), такое как <0,5 (<50%) и возможно также <0,01 (<1%). В альтернативе, модифицированная способность связывания конъюгатов по изобретению может быть измерена в виде отношения констант диссоциации K_d(SA(wt)):K_d(SA(m)), при K_d, измеренной в нМ и в том же пределе, как для соотношения IC₅₀(SA(wt)):IC₅₀(SA(m)). Для определения IC₅₀(SA(wt)), IC₅₀(SA(m)), K_d(SA(wt)) и K_d(SA(m)) см. экспериментальную часть ниже.

Ранее было известно, что некоторые суперантигены могут иметь два или более участков, которые связывают антиген MHC класса II (Fraser et al., In: Superantigen: A pathogens vie on the immune system, Eds. Huber & Palmer, Current Communications in Cell Molecular Biology 7 (1993) 7-29). Для этого типа суперантигенов способность связывания была бы модифицирована, по крайней мере, по одному из связывающих участков, например, в виде снижения вышеупомянутой способности. Вместе с модификацией суперантигена, это возможно достаточно, чтобы создать изменения в разнице в сродстве для двух участков связывания MHC класса II, экспериментально >10%, и, предпочтительно, путем снижения сродства, по крайней мере, одного участка.

Суперантигены связываются с V β цепями TCR различных подгрупп с различным сродством. В белках

слияния/конъюгатах по изобретению, использованный суперантиген может быть модифицированным таким образом, чтобы проявить измененную специфичность подгруппы, или измененное сродство к одному или нескольким членам подгруппы. Имеются серьезные причины полагать, что существует параболическое взаимоотношение между сродством к $V\beta$ TCR и стимуляцией, посредством TCR, то есть, умеренное сродство будет давать максимальную стимуляцию. Соответственно, подходящее сродство модифицированного суперантигена к $V\beta$ TCR может быть близким, в такой же мере, как у сплавления белка/конъюгата, включающего модифицированный суперантиген, способное значительно стимулировать к делению покоящуюся популяцию Т клеток, представляющих, по существу, распределение всех подгрупп $V\beta$ человека. Популяция Т клетки может быть накопленной из Т клеток от случайно выбранных человеческий индивидуумов. Это существенно означало, что стимуляцию возможно измерить. Результаты, представленные в Таблице II (правая колонка) в экспериментальной части отмечают, что способность вызывать SADCC у белков конъюгатов/слияния по изобретению часто, по существу, та же, что для слияния, включающего дикий тип суперантигена.

Основное использование белков конъюгатов/слияния по изобретению.

Конъюгаты, согласно изобретению, первоначально предназначались для лечения тех же заболеваний, что и конъюгаты между обычными суперантигенами и антителами. См. вышеупомянутые публикации. Таким образом, конъюгаты по изобретению могут быть введены либо в качестве основной терапии, либо в качестве адъювантной терапии при хирургическом вмешательстве, или совместно с другими препаратами.

Фармацевтическая композиция по изобретению включает составы, которые подобны известным в данной области, но теперь содержат наши новые конъюгаты. Таким образом, композиции могут быть в виде материала из лиофилизированных частичек, стерильного или асептического производственного раствора, таблеток, ампул и т.п. Могут присутствовать наполнители, такие как вода (предпочтительно, подведенная буфером до физиологического значения pH при помощи, например, PBS) или другой инертный твердый или жидкий материал. В целом, термины композиции, представляют, полученные путем смешивания конъюгата с, растворения в, привязывания к, или составленные другим образом с одним или несколькими водорастворимыми или нерастворимыми в воде водными или неводными наполнителями, если необходимо, вместе с подходящими добавками и адъювантами. Обязательно необходимо, чтобы наполнители и кондиционеры не проявляли неблагоприятного воздействия на активность конъюгата. Вода, как и подобное, включается в понятие наполнитель.

Обычно, конъюгаты будут продаваться и вводиться в предварительно приготовленных дозировках, содержащих каждая эффективное количество конъюгата, которое основано на результатах, представленных в настоящее время, предположительно, в интервале 10мкг-50мкг. Точная доза варьирует от случая к случаю и зависит от веса пациента и возраста, пути введения, типа заболевания, антитела, суперантигена, пришивания (-B-) и т.п.

Пути введения являются широко известными в данной области, то есть, эффективное количество, лизирующее клетку-мишень, или терапевтически эффективное количество конъюгата по изобретению, контактирует с клетками-мишенями. Для назначений, отмеченных выше, это главным образом представляет парентеральное введение, такое как инъекция или инфузия (подкожно, внутривенно, внутриартериально внутримышечно) животному, такому как человек. Конъюгат может быть введен локально или системно.

Предполагается, что "эффективное количество, лизирующее клетку-мишень", является эффективным количеством для активации и направления Т-лимфоцитов на разрушение клетки-мишени.

В конце года приоритета было решено, что предпочтительным путем введения для белка конъюгата/слияния, содержащего немодифицированные суперантигены, является 3-х часовая внутривенная инфузия в день, комбинированная с жаропонижающим агентом (парацетомол). Введение повторяется в течение 4 дней и прекращается перед появлением у пациента второго антитела к слитому белку/конъюгату. Данная схема дозировки, по-видимому, будет применима также для белков конъюгатов/слияния по настоящему изобретению.

Альтернативные области использования

Конъюгаты по изобретению могут также применяться для количественного и качественного определения структур, по отношению к которым направлены отыскивающие мишень группы (Т). В целом, данные способы являются хорошо известными для специалистов в данной области. Таким образом, модифицированный суперантиген может функционировать в качестве маркерной группы в иммуноопределениях, включая иммуногистохимические определения, поскольку маркерная группа, в свою очередь определяется, например, при помощи антитела, которое направлено по отношению к пептиду (SA(m)) и мечено ферментативно, изотопом, флуорофором или другими известными маркерными группами. Другой метод иммуноопределения определяет в клеточной популяции клетки, которые на своей поверхности экспрессируют структуру, способную связываться с группой, отыскивающей мишень (Т). Данное применение означает, что образец из клеточной популяции инкубируется вместе с Т-лимфоцитами и конъюгатами по настоящему изобретению, также как и в SADCC определении. В случае если инкубация приводит к лизису клеток, это показывает, что популяция содержит клетки, которые на своей поверхности экспрессируют структуру.

Получение рекомбинантных белков

Антитела

Экспериментальная работа вместе с изобретением первоначально была выполнена с моноклональным антителом C215 в качестве модельной субстанции. Данное антитело направлено против антигена из семейства GA-733 (см., например, ЕП 376 746), цитируемые здесь ссылки и [Larsson et al., Int. J.Canc. 32 (1988) 877-82]. Эпитоп C215 оценивается как не достаточно специфический для лечения рака у человека. На дату

приоритета, по экспериментальной оценке, mab C242 Larsson et al., WO 9301303] вместе со своим продуктом слияния с диким типом SEA, по-видимому, был лучшим кандидатом.

Бактериальные штаммы и плазмиды

Для экспрессии и клонирования были использованы штаммы E.coli UL635 (xyl-7, ara-14, T4^R, ΔotrT) и HB101 [Boyer and Roulland-Dessoix, J. Mol. Biol. 41 (1969) 459-472], соответственно. Для экспрессии Fab-SEA белков слияния (производных от антитела мыши C215) был использован вектор pKP889 и для секреции SEA (Фиг.1) векторы pKP943 и pKP1055. Вектор pKP889 экспрессии Fab-SEA идентичен pKP865 [Dohlisten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) in press], за исключением того, что спейсером между C_H1 и SEA является ClyGlyAlaAlaHis TyrGly. Экспрессия из pKP943 дает выход SEA с природными аминокислотными остатками. Использование pKP1055 дает SEA, обладающее добавленным Gly к аминоконцу. У обоих векторов для транскрипции и трансляции используют сигналы из стафилококкового белка A (Uhlen et al., J. Biol. Chem. 259 (1984) 1695-1702) и синтетический сигнальный пептид для секреции (L. Abrahmsen, неопубликовано).

Мутагенез

Мутации, полученные при помощи реакции полимеразной цепи, проанализировали на Perkin Elmer Thermocycler. Реакционная смесь (100мкл) содержала: 1x буфера РПЦ от Perkin Elmer Cetus (10мМ Трис/HCl pH8,3; 1,5мМ MgCl₂, 0,001% (вес/объем) желатин; и дополнительные 2мМ MgCl₂; 0,4мМ dNTPS (Perkin Elmer Cetus); 2,5 единицы Ampli Taq ДНК полимеразы (Perkin Elmer Cetus, США) и 100нг матрицы ДНК. Праймеры добавляли в конечной концентрации 0,8мкМ. Оригинальная матрица представляла плазмиду, содержащую ген энтеротоксина A Staphylococcus aureus, идентичный к опубликованному Betley et al., (J. Bacteriol, 170 (1988) 34-41), за исключением того, что первый кодон (кодирующий Ser) заменен на TCC для обставлений сайта Bam HI на 5' конце гена. Далее было использовано производное, содержащее несколько уникальных участков рестрикции ферментами, введенных путем покоящейся мутации. Мутации, введенные в окружение участков рестрикции, были получены путем одного набора праймеров, один из них охватывает мутацию и участок рестрикции. Для большинства мутаций должны были использовать два набора праймеров, и проводить реакцию полимеразной цепи в два последовательных этапа. Новый участок рестрикции ферментом был введен вместе с каждой мутацией для возможности легкой идентификации. Олигонуклеотиды, использованные в качестве праймеров были синтезированы на Gene Assembler (Pharmacia Biotech AB, Sweden). Для подтверждения каждой мутации определяли родственную часть нуклеотидной последовательности на Applied Biosystems DNA-Sequenser, используя набор Taq Dye Deoxy Termination Sequencing Kit.

Получение белков и анализ

Клетки E.coli, содержащие конструкции различных генов, выращивали в течение ночи при комнатной температуре (Fab-SEA векторы) и при 34°C (векторы секреции, оптимум зависит от мутации). Питательная среда содержала 2xYT (16г Бакто триптона, 10г/л дрожжевого Бакто экстракта, 5г/л NaCl), дополненного канамицином (50мг/л). Слияние белков индуцировали путем добавления изопропил - β-Q - тиогалактозида в конечной концентрации 100мкМ. (Промотор белка A, использованный в экспрессии не слитого SEA являлся конститутивным). Клетки осаждали при 5000xg и содержимое периплазмы отделяли путем осторожного размораживания, ранее замороженного осадка клеток в Трис-HCl (pH7,5), на льду при потряхивании в течение 1 часа. Экстракт периплазмы просветляли путем центрифугирования при 9500 xg в течение 15 минут. Fab-SEA белки использовали без дальнейшей очистки. SEA и Gly-SEA далее очищали путем аффинной хроматографии на колонке с анти-SEA. Поликлональные анти-SEA антитела кролика были ранее получены от кроликов, предварительно иммунизированных SEA и очищали путем аффинной хроматографии на протеин G-Сефарозе® (Pharmacia Biotech).

Анализ белков

Белки разделяли на предварительно залитых полиакриламидных SDS Трис-Глицин гелях Novex (градиент 4-20%, или гомогенном 12%, новая экспериментальная технология Novex) и, либо прокрашивали Кумасси бриллиантовым синим, либо использовали в Western блоте. Поликлональные анти-SEA антитела кролика (выше) использовали для определения SEA в Western блот анализе после обработки антителами свиньи против 1g кролика и антителами кролика/против пероксидазы хрена, и пероксидазой. Вместе с белками слияния Fab-SEA, использовали также конъюгированные при помощи пероксидазы хрена антитела крысы, распознающие каппа цепи (AAC O8P, Serotech Ltd, England) Для визуализации пероксидазы использовали 3,3-диаминобензидин (Sigma).

Спектры кругового дихроизма (КД) получали на J-720 спектрополяриметре (JASCO, Япония) при комнатной температуре (22-25°C) в 10мМ фосфатном буфере, pH8,2, в присутствии 0,02мМ ZnSO₄ и 0,005% (объем/объем) Tween® 20. Скорость сканирования составляла 10нм/мин, и каждый спектр представлял среднее из пяти последовательных сканирований. Длина пути ячейки составляла 1мм и концентрация белка от 0,2 до 0,5мг/мл. Денатурацию при равновесии гуанидин гидрохлоридом (Gdn-HCl) определяли при 23°C путем КД при 222нм при концентрации белка 0,3мг/мл и длине пути ячейки 1мм. Эти данные использовали для расчета кажущейся фракции развернутого белка (F_{app}). Параметры равновесия разворачивания выводили путем подбора данных для двухсайтового процесса складывания [Hurle et al., Biochemistry 29 (1990) 4410-4419].

СВЯЗЫВАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ IN VITRO

Материалы

Реактивы: Использовали среду RPMI 1640, полученную от Gibco, Middlesex, Англия. Среда имела pH7,4 и содержала 2мМ L-глутамин (Gibco, Middlesex, Англия), 0,01М HEPES (Biological Industries, Израиль), 1мМ NaHCO₃ (Biochrom AG, Германия), 0,1мг/мл Гентамицин сульфата (Biological Industries, Израиль), 1мМ

Na-перувата (JRH Biosciences Industries, США), 0,05ММ меркаптоэтанола (Sigma Co., США), эссенциальные аминокислоты, концентрированные в 100 раз (Flow Laboratories, Шотландия), дополненные 10% бычьей эмбриональной сывороткой (Gibco, Middlesex, Англия). Рекомбинантный SEA(wt), SEA(m) и продукты слияния C21Fab-SEA(wt) и C21Fab-SEA(m) получили как описано выше. Рекомбинантный IL-2 человека получен от Cetus Corp., США, Митомицин С получен от Sigma Co., США. $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ получен от Merck, Германия. Физраствор на буфере (PBS) без магния и кальция получили от Imperial Англия.

Клетки: Линия клеток карциномы толстой кишки Colo205 и клетки В лимфомы клеточной линии Raji получены от American Type Cell Culture Collection (Rockvill, MD, США) (экспрессирующие HLA-DR3/w10, -DP7, -Dqw1/w2).

Лимфобластоидные В клетки линии BSM трансформированные EBV представляли любезный дар Др. van De Griend, Dept, of Immunology, Dr. Daniel den Hoed Cancer Centre, Leiden, Нидерланды. Клетки неоднократно проверяли на загрязнение микоплазмой при помощи Gen-Probe Mycoplasma T.C. теста, Gen-Probe Inc., San Diego, США.

Линии Т клеток, активированных, SEA, были получены путем активации моноядерных клеток из периферической крови. Кровь получали в виде кожистого слоя от доноров крови из Госпиталя Университета Лунда. Клетки PBM стимулировали при концентрации 2×10^6 клеток/мл, обработанными митомицином С, покрытыми, SEA клетками BSM (преинкубированными с 100нг/мл SEA) в среде с 10% FCS.

Линию Т клеток стимулировали повторно с двухнедельным интервалом рекомбинантным IL-2 человека 20U/мл и еженедельно, обработанными митомицином С, покрытыми SEA клетками BSM. Линии клеток культивировали в течение 4-12 недель перед использованием в определении.

Жизнеспособность эффекторных клеток, согласно определению включения трипанового синего, превышало 50%.

Определение характеристик связывания МНС класса II дикого типа и мутанта SEA

Способы радиоактивного иодирования. Подходящие количества дикого типа или мутанта SEA метили радиоактивностью от 10 до 25мCi Na^{125}I , используя способ с лактопероксидазой и ферментом на подложке (NEN, Boston MA). Реакцию останавливали при помощи гашения азидом натрия, и связанную с белком радиоактивность отделяли от свободного йода путем фильтрации через колонку PD-10 (Pharmacia Biotech AB, Швеция) в среде R10 в качестве буфера элюции. Условия выбирали, чтобы получить стехиометрическое соотношение между иодом-125 и белком $\leq 2:1$. Радиохимическую чистоту подтверждали путем эксклюзионной ЖХВР хроматографии по размеру на колонке TSK SW 3000. Влияние радиоиодирования на связывающую активность тестировали только для дикого типа SEA и изменения не обнаружили (данные не представлены).

Прямое определение связывания. Клетки Raji $6 \times 10^4/100\text{мкл}$, предварительно культивированные в среде R10, добавляли в конические полипропиленовые пробирки и инкубировали ($22^\circ\text{C}/45\text{мин}$) в трипликатах со 100мкл/на пробирку, серийно разбавленного меченного ^{125}I дикого типа или мутанта SEA. Клетки промывали 2мл 1% (вес/объем) бычьим сывороточным альбумином (BSA) в 10мМ физрастворе на фосфатном буфере (PBS), pH7,4, центрифугировали при $300 \times g$ в течение 5 минут и аспирировали. Данную процедуру повторяли дважды. В конце клетки анализировали на связанную с клетками радиоактивность в гамма счетчике [Packard Instruments Co., Downers Grove, IL, США]. Кажущуюся константу диссоциации, K_d , и количество участков связывания, N, при насыщении определяли по Скэтчарду [Scatchard, Ann. N.Y.Acad. Sci, (1949) 660-72], после вычитания неспецифического связывания (т.е. связывания после инкубации только в среде R10).

Определение ингибирования (ингибирование связывания ^{125}I -меченного дикого типа SEA мутантами SEA). Данные эксперименты по ингибированию проводили, как описано для определения прямого связывания с небольшими модификациями. В кратком виде, 50мкл ^{125}I -меченного дикого типа SEA оставляли конкурировать с избытком немеченного дикого типа или мутанта SEA (50мкл/пробирку) для связывания с $6 \times 10^4/100\text{мкл}$ клеток Raji. Для получения максимальной чувствительности в исследовании ингибирования использовали следовые концентрации, дающие $\approx 40\%$ связавшейся радиоактивности от прямого определения. Эффективность вытеснения конкурента выражали в виде концентрации, дающей 50% ингибирование (IC_{50}) связавшейся радиоактивности. Сродство связывания мутантов по отношению к дикому типу SEA рассчитывали, используя уравнение

$$\text{IC}_{50}(\text{SEA}(\text{wt})): \text{IC}_{50}(\text{SEA}(\text{m}))$$

Для того чтобы проанализировать, действительно ли мутанты конкурируют за связывание с тем же участком на клетках Raji, как и дикий тип SEA, данные по связыванию, полученные с мутантами SEA, выражали графически в виде двойной логарифмической функции и исследовали на параллельность с соответствующими данными для дикого типа SEA.

Определение ингибирования (ингибирование связывания меченного флуоресцентной меткой SEA дикого типа под действием немеченного SEA дикого типа и мутантов SEA). Клетки Raji ($2,5 \times 10^5$) инкубировали с ингибитором (диким типом или мутантом SEA; 0-6000нМ), разведенным в 50мкл CO_2 -независимой среды (Gibco) дополненной 10% FCS , глютамином и гентамицином при 37°C в течение 30 минут. Добавляли флуоресцеин, конъюгированный с диким типом SEA в конечной концентрации 30нМ и образцы инкубировали дополнительные полчаса при 37°C . Образцы промывали три раза ледяным PBS, дополненным 1% BSA (PBS-BSA) и окончательно выдерживали в 0,4мл PBS-BSA во льду до анализа. Из каждого образца анализировали 10000 живых клеток по зеленой флуоресценции на FACStar (Becton Dickinson) проточном цитометре и рассчитывали среднее значение флуоресценции, используя программу LYSIS II.

Определение SDCC и SADCC SEA(wt), SEA(m) и их белков слияния при помощи C21Fab.

Определение SDCC. Анализировали цитотоксичность SEA(wt),SEA(m) и их белков слияния при помощи C21Fab по отношению МНС класса II⁺ клеток Raji в обычном исследовании высвобождения ⁵¹Cr³⁺, используя стимулированную in vitro SEA-специфическую линию Т клеток в качестве эффекторных клеток. В кратком виде, клетки Raji меченные ⁵¹Cr, инкубировали в количестве 2,5×10³ клеток на 0,2мл среды (RPMI, 10% FCS) в микротитровальных ячейках при определенном соотношении эффектора для клетки-мишени, в присутствии или отсутствии (контроль) добавок. Рассчитывали процент специфической цитотоксичности в виде 100× ([счет в мин, высвобождение в эксперименте - счет в мин, фоновое высвобождение] / [счет в мин, общее высвобождение - счет в мин, фоновое высвобождение]). Соотношение эффекторов к клеткам составляло 30:1 для неслитых белков, и 40:1 для белков слияния.

SADCC против клеток рака толстой кишки человека

Анализировали цитотоксичность C21Fab-SEA(wt), C21Fab-SEA(m), SEA(wt) и мутантов SEA по отношению к C215⁺ МНС класса II клеток карциномы толстой кишки SW620 в обычных условиях в течение 4 часов по определению выхода ⁵¹Cr³⁺, используя стимулированную in vitro под действием SEA, линию Т клеток в качестве эффекторных клеток. В кратком виде, клетки SW620, меченные ⁵¹Cr³⁺, инкубировали в количестве 2,5×10³ клеток на 0,2мл среды (RPMI, 10% FCS) в микротитровальных ячейках при соотношении эффектора к клеткам-мишеням 30:1 в присутствии или отсутствие (контроль) добавок. Процент специфической цитотоксичности рассчитывали также, как и для определения SDCC.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ IN VIVO

Опухолевые клетки. Клетки меланомы B16-F10, трансфецированные кДНК, кодирующей ассоциированный антиген рака человека C215(B16-C215) (Dohlstien et al., Monoclonal antibody-Superantigen fusion proteins: Tumor specific adents for T cell based tumor therapy; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, In press, 1994), выращивали в виде налипших клеток до субконфлуентности. Культуральная среда состояла из RPMI 1640 (G-LBCO, Middlesex, UK), дополненной 5×10⁻⁵M β-меркаптоэтанолом (Sigma, St Louis, MO, США), 2мМ L-глутамин (GIBCO), 0,01 Нерес (Biological Industries, Израиль) и 10% эмбриональной сывороткой теленка (GIBCO). Клетки снимали путем быстрой инкубации в 0,02% ЭДТА и суспендировали в ледяном физрастворе на фосфатном буфере с 1% сывороткой сингенных мышей (наполнитель) в концентрации 4×10⁵клеток/мл.

Животные и лечение животных. Мыши, возрастом 12-19 недель, являлись трансгенными мышами C57B1/6 по Vβ 3 цепи рецептора Т клеток (Dohlstien et al., Jmmunology 79 (1993) 520-527). Внутривенно в хвостовую вену инъецировали сто тысяч опухолевых клеток B16-C215 в 0,2мл наполнителя. На 1,2 и 3 дни мыши получали при внутривенной инъекции C215Fab-SEA(wt) или C215Fab-SEA(D227A) в 0,2мл наполнителя в дозах, отмеченных на Фиг.5а и 5b. Контрольные мыши получали только наполнитель, согласно той же схеме. На 21 день после инъекции опухолевых клеток, мышей забивали путем смещения шейных позвонков, извлекали легкие и фиксировали в растворе Bouin подсчитывали количество метастазов в легких.

РЕЗУЛЬТАТЫ

"Сканирование аланина" в стафилококковом энтеротоксине А.

Первоначально структура SEA была неизвестна и можно было только делать спекуляции в том, какие боковые цепи доступны на поверхности. Следовательно, большинство мутантов, выбрали из линейно расположенных гомологичных суперантигенов (Marrack and Kappler, Science 248 (1990) 705-711). Чтобы некоторые из тех суперантигенов предположительно связывались с HLA-DR консервативным образом, по традиции выбирали консервативные (в основном полярные) остатки, [Chitagumpala et al., J. Immunol. 147 (1991) 3876-3881]. Замещения на аланин использовали в соответствии с опубликованной стратегией [Cunningham and Wells, Science 244 (1988) 1081-1085]. В процессе выполнения настоящей работы появилась доступная информация:

i) было показано, что ион Zn²⁺ является важным для взаимодействия между SEA и МНС классом II (HLA-DR) (Fraser et al., Pros Natl. Acad. Sci. USA 89 (1991) 5507-5511),

ii) был представлен множественный анализ энтеротоксина В стафилококка (SEB) (Kappler et al., J.Exp. Med, 175 (1992) 387-396),

iii) представлена структура SEB (Swaminathan et al., Nature 359 (1992) 801-806).

Было обнаружено, что наш первый мутант, проявляющий серьезно пониженное сродство к HLA-DR, D227A очень плохо образует координатную связь с Zn²⁺ (данные не представлены). Учитывая полную укладку SEA. и SEB, новые данные предполагают две области связывания МНС класса II; одна включает ион Zn²⁺, и одна соответствует участку, определенному у SEB. На основе данного предположения был получен второй набор мутантов. Этот второй набор мутантов экспрессировали в виде SEA, несущего глицин, добавленный к аминоконцу. Сначала было показано, что расширение не имеет влияния на связывающие свойства дикого типа SEA (следующий раздел).

Большинство мутантов экспрессировались и секретиrowались E.coli. в функциональном виде, что определяли по данным анализа связывания моноклональных антител (Таблица 1). Были получены очень небольшие количества мутантов E154A/D156A и R160A. Они были последовательно исключены из исследования. Мутанты, обладающие замещением на Ала по остаткам 128, 187, 225 или 227 не различались моноклональным антителом 1Е. Последние два мутанта, проявляющие пониженный уровень экспрессии (более выраженный при 34°C, чем при 24°C) мигрировали быстрее при SDS-PAGE электрофорезе в денатурирующих, но не восстанавливающих условиях (все другие мутанты мигрировали как дикий тип SEA, данные не представлены). При оценке анализа КД спектра, структура D227A могла немного отличаться от нативного SEA

(Фиг.2), но стабильность была очень близка к дикому типу SEA (определяли по устойчивости к денатурации гуанидинхлоридом). Рассчитанная $\Delta\Delta G$ между мутантом и нативным SEA (SEA(wt)) составляла 0,16ккал/моль, что составляет только около 4% от значений ΔG° (данные не представлены). В целом, все сигналы при КД

анализе были очень низкими, как ожидается, преимущественно, от β -складчатой структуры. Недавно было доложено, что His225 координирует Zn^{2+} [неопубликованные данные в работе Fraser et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA 89 (1991) 5507-5511].

Поскольку ASP 227 участвует в координатной связи Zn^{2+} (выше) и предположительно расположен в той же β -складчатой структуре, как и His 225, это предполагает, что данных два остатка составляют цинк-связывающие

ядра, обнаруженные в белках с цинк-координирующими структурами [Vallee and Alud, Biochemistry, 29 (1990) 5647-5659].

Связывание с МНС классом II и рецептором Т клетки

Сродство МНС класса II рассчитывали из количества, требующегося для конкуренции с меченным флуоресцеином SEA дикого типа для клетки Raji, проявляющей большое количество МНС класса II. Способность вытеснения для мутанта рассчитывали из концентрации, дающей 50% ингибирования (IC_{50}), связанной флуоресцентной метки, по сравнению с концентрацией, требующейся для SEA дикого типа, в качестве конкурента. Для SEA дикого типа и некоторых мутантов сравнивали результаты данного анализа с результатами, где использовали меченный ^{125}I SEA дикого типа, в качестве следового количества. Как можно

видеть из Таблицы II значения, полученные из этих двух анализов ингибирования, хорошо коррелируют. Было определено прямое связывание МНС класса II для шести выбранных мутантов, используя меченный мутант SEA (Таблица II). Для мутанта H50A значения, полученные из прямого определения связывания и определения ингибирования коррелируют хорошо, однако с мутантом F47A было обнаружено большое расхождение: непосредственное связывание показывает только в 7 раз более слабое связывание, чем для дикого типа SEA, но оба конкурентных анализа показывают, около, в 70 раз пониженное связывание. Данные двух из других мутантов показывают два различных типа взаимодействий при связывании. Для мутантов H225A и D227A в тех же определениях сродство было ниже, чем предел определения.

Ранее мы показали, что белки, слияния, состоящие из Fab фрагмента реактивного к карциноме антитела и SEA могут быть использованы для направления цитотоксического действия Т клеток на специфический лизис раковых клеток, несмотря на то, что взаимодействие между SEA и рецептором Т клетки (TCR) являлось слишком слабым, чтобы быть зарегистрированным само по себе (Dohlsien et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA, в печати). Таким образом, в противоположность к анализам, включающим контекст выделенного суперантигена слияния Fab, позволяет проводить функциональное определение для взаимодействия между SEA и TCR, независимо от связывания МНС класса II. Соответственно, эффективность различных конъюгатов непосредственно направлять Т клетки на лизис клеток, распознаваемых по Fab остатку, определяли по выходу хрома. Данный анализ подтверждает, что мутации, проявляющие воздействие на связывание МНС класса II, не влияют на связывание TCR (Таблица II).

Биологические эффекты мутаций

Пролиферативное действие было определено в виде способности стимулировать периферические лимфоциты к делению. Все три мутанта, которые очень слабо конкурировали за МНС класс II, индуцировали слабую пролиферацию, или не вызывали ее, а промежуточный мутант H187A проявлял некоторую пролиферативную способность, тогда как другие исследованные мутанты были неразличимы от дикого типа (таблица III). Harris et al., [Infect. Immun 61 (1993) 3175-3183] недавно доложил о сходной сильной редукции стимуляторной активности Т клетки для мутантов SEA F47G и L48G. Очевидно, сильная редукция в любой из двух предполагаемых областей связывания, приводит к сильному воздействию на способность индуцировать пролиферацию. Это предполагает, что SEA перекрестно сшивает две молекулы МНС класса II, приводя к димеризации TCR и, что это является необходимым для получения сигнала трансдукции.

В отличие от эффективности различных мутантов по направлению, стимулированных *in vitro* под действием SEA Т клеток, к лизису клеток-мишеней, обладающих МНС класса II, скорее наблюдается корреляция со сродством связывания, чем со способностью конкурировать (Таблица III). Например, эффективности F47A и S48A являются пониженными только в 2,5 раза и 300 раз, соответственно. Таким образом, здесь, очевидно, также нет неотъемлемого требования для двухвалентности.

Увеличение в мультивалентности, являющееся результатом значительно большего количества TSR, на поверхности активированной Т клетки, возможно, частично экранирует эффект низкой способности взаимодействия SEA/МНС класса II. Путем использования специфических бифункциональных антител карциномы, содержащих один анти-CD3 остаток и один антикарциномный остаток, ранее было показано, что данная димеризация не является необходимой для непосредственной цитотоксичности Т клетки (Renner et al., Science 264 (1994) 833-35).

Функциональные эксперименты *in vivo*: Результаты представлены на фигурах 6а и 6б. Лечение мышей C21Fab-SEA(wt) и C21Fab-SEA(D227A) по понижению количества метастазов в легких клеток B16-C215 меланомы являлось высокоэффективным. Терапевтическое действие, по существу, было идентичным для двух вариантов целевых суперантигенов. Лечение C21Fab-SEA(wt) приводило к 70% летальности в дозах 5мкг/инъекцию. В противоположность этому, смертность мышей в тех же дозах при применении C21Fab-SEA (D227A) не было. Рассматривая вместе, SEA(D227A) является примером мутанта с пониженной токсичностью и сохраненной терапевтической эффективностью при включении в Fab-SEA белок слияния.

ДИСКУССИЯ

Недавно была доложена структура комплекса между SEB и HLA-DR (Jardetzky et al., Nature 368 (1994) 711-718). Большинство идентифицированных остатков SEB, участвующих в данном взаимодействии являются консервативными в SEA. Наши данные по мутанту D227A показывают слабое сродство взаимодействия между данным участком в SEA (амино концевой участок) и MHC классом II, имеющим значение K_d выше 8мкМ. Недавно было доложено, что K_d взаимодействия между SEB и HLA-DR составляет 1,7мкМ [Seth et al., Nature (1994) 324-27]. Были исследованы различия во взаимодействии между SEB, TCR и HLA-DR и было показано, что комплекс между SEB и HLA-DR не являлся стабильно поддерживаемым в отсутствие TCR. Эксперименты по плазмонному (рентгеновскому) резонансу показывают, что это происходило из-за очень быстрой скорости распада. Полученные эффекты захвата, если SEA перекрестно пришивает две молекулы MHC класса II, вслед за последовательной полимеризацией TCR, могли бы объяснить, каким образом SEA может индуцировать пролиферативное действие при концентрациях, много ниже K_d . Учитывая, что мутация F47A снижает сродство аминоконцевого участка ниже значимого, K_d участка с Zn^{2+} составляет около 95нМ. Данная гипотеза недавно была подтверждена наблюдением, что мутанты F47R, F47R/H50A и F47R/L48A/H50D проявляют идентичное сродство к MHC класса II, также как и F47A (неопубликовано).

Основываясь на структуре SEB (Kappler et al., J. Exp. Med, 175 (1992) 387-396) и на линейной гомологии (Marrack and Kappler, Science 248 (1990) 705-711), строго подтверждается, что His 225 и Asp227 расположены в той же β -складке и, таким образом, цепи должны быть проксимальными. Следовательно, наиболее вероятно, что эти два остатка составляют цинк-связывающее ядро, обнаруженное в цинк-координирующих белках (Vallee and Auld, Biochemistry, 29 (1990) 5647-5659). Подобно данным мутантам, мутанты с заменами по остаткам 128 и 187 также являются распознаваемыми всеми моноклонами, за исключением IE. Fraser et al., (Proc. Natl. Acad. Sci, USA 89 (1991) 5507-5511) показали, что Zn^{2+} связывается с SEA и требуется для высокоаффинного взаимодействия с MHC класса II. Сродство для цинка не изменяется путем добавления HLA-DR. Основываясь на данном наблюдении и высоком сродстве к Zn^{2+} (K_d около 1мкМ) было предположено, что координатная связь обеспечивается исключительно SEA и включает 4 координатных складки. Наши данные отмечают участие четырех остатков N128, H187, H225 и D227. Функции двух бывших остатков не ясны; за исключением обеспечения возможной помощи лиганда N128 в депротонировании D227. Одним из аргументов в пользу этого является то, что влияние замены D227 более серьезное, чем замены H225.

Ранее было доложено, что корреляция между сродством различных суперантигенов к MHC класса II и способностью стимулировать Т клетки к пролиферации отсутствует (Chintagumpala et al., J. Immunol. 147 (1991) 3876-3881). Эти данные возможно частично объясняются различным сродством суперантигенов по отношению к различным $V\beta$ -цепям TCR. Здесь нами обнаружено такое же отсутствие корреляции, но в отличие от отдельных суперантигенов, мутанты проявляют идентичное сродство к TCR, как показано в контексте Fab-SEA (определяемого в виде SADCC). Наиболее вероятным объяснением отсутствия корреляции является то, что две связывающих области, идентифицированные в данном анализе, представляют два различных участка связывания, которые обеспечивают не только кооперативное связывание, но которые приводят к перекрестному сшиванию двух молекул MHC класса II, который, в свою очередь, обеспечивает димеризацию двух молекул рецептора Т клетки. Это означало бы, что сродство обеих участков является важным для получения пролиферативного эффекта. Взаимодействия внутри гексамерного комплекса, включающего две молекулы SEA, TCR и MHC класса II, приводят к высокой захватываемости. Таким образом, сильное сродство/захватываемость SEA по отношению к MHC класса II, дает возможность взаимодействия SEA с TCR, несмотря на низкое непосредственное сродство.

Другие дубликаты биоспецифического сродства: Белок слияния SEA(D227A) и IgG-связывающего домена белка А стафилококка был получен путем рекомбинантной технологии и экспрессируется в E.coli. Данный реактив успешно применяли для нацеливания Т-лимфоцитов на клетки Mot4 и CCRF-CEM (полученные из ATCC), которые являются SD7 и CD38 позитивными, но HLA-DP, -DQ и -DR, негативными. Клетки Mot4 и CCRF-CEM преинкубировали с анти-CD7 или анти-CD38 моноклонами мыши (Dianova, Hamburg, Германия). Для того чтобы усилить связывание между моноклонами мыши и IgG-связывающей частью белка слияния, было также добавлено антитело кролика против Ig мыши.

По сравнению с белком A-SEA(wt) белок A-SEA(D227A) имеет пониженную способность связываться с клетками Daudi, экспрессирующими антиген MHC класса II.

Таблица I						
Подтверждение структурной целостности мутанта. Определяли связывание шести моноклональных антител						
Мутация	Моноклональное антитело					
	1A	2A	3A	1E	4E	EC-A1
Дикий тип	+	+	+	+	+	+
D11A/K14A	+	+	+	+	+	+
D45A	+	+	+	+	+	+
F47A	+	+	+	+	+	+
H50A	(+)	+	(+)	+	+	+
K55A	+	+	+	+	+	+
H114A	+	+	+	+	+	+
K123A/D132G	+	+	+	+	+	+
N128A	+	+	+	-	+	+

5	K147A/K148A	+	+	+	+	-	+
	E154A/D156A	HO	HO	HO	+	HO	HO
	R160A	HO	HO	HO	+	HO	HO
	H187A	+	+	+	-	+	+
	E191A/N195A	+	+	+	+	+	+
	D197A	+	+	+	+	+	+
	H225A	+	+	+	-	+	+
	D227A	+	+	+	-		+
10	Примечания: Знак плюс означает связывание, скобки означают от 50 до 90% связывания, по сравнению с диким типом SEA. HO означает не определено						

Таблица II				
Связывание мутантов с МНС класса II и рецептором Т клетки. Последнее определяли в виде способности специфически направлять активированные цитотоксические Т-клетки к клеткам карциномы, используя слияния Fab-SEA различных мутантов (SADCC)				
Мутация	IC ₅₀ (нМ) SEA-FITS ¹	IC ₅₀ (нМ) 125I-SEA ¹	K _d (нМ) меч. 125I	SADCC (% от дикого типа ¹)
дикий тип	50	38	13	100 ²
Gly-SEA	50	HO	HO	100 ²
D11A/K14A	50	HO	HO	HO
D45A	53	HO	HO	HO
F47A	3150	2943	95	100
H50A	150	132	32	100
K55A	44	HO	HO	HO
H114A	48	HO	HO	HO
K123A/D132G	188	75	12/237	100
N128A	1150	HO	2,9/76	100
K147A/K148A	58	HO	HO	HO
H187A	1030	602	97	100
E191A/N195A	51	HO	HO	HO
D197A	78	HO	HO	HO
H225A	>9000	9600	HO	HO
D227A	>9000	>10000	>8000	100
Примечания: 1) HO означает не определено. 2) В контексте Fab-SEA спейсер между C _H 1 и SEA оканчивается на Gly				

Таблица III		
Биологические эффекты мутаций. Была определена способность стимулировать покаящиеся Т клетки к пролиферации и способность направлять цитотоксические клетки к лизису клеток-мишеней, проявляющих МНС класса II (SDCC - зависимая от суперантигена опосредованная клеточная цитотоксичность)		
Мутация	Пролиферация %	SDCC EC ₅₀ (относительная)
дикий тип	100	1
Gly-SEA	HO	1
D11A/K14A	HO	0,8
D45A	50	1,3
F47A	<0,2	2,5
H50A	20	1,4
K5.5A	100	1,3
H114A	HO	1
K123A/D132G	40	2,1
N128A	40	1,2
K147A/K148A	HO	0,7
E154A/D156A	HO	HO
R160A	HO	HO
H187A	15	4
E191A/N195A	100	1,1
D197A	HO	1,3
H225A	<0,2	3×10 ²
D227A	<0,01	3×10 ²
Примечания: HO означает не определено		

ПОДПИСИ К ФИГУРАМ

Общее: Мутант SEA (D227A) (=SEA(m9), или мутант m 9) ко времени даты приоритета был наиболее многообещающим вариантом SEA. Таким образом, мы отбирали для представления результаты in vitro и in vivo с данным вариантом (Фиг.3-6).

Фиг.1.

Схематическое изображение плазмиды, используемой для экспрессии SEA и C21Fab-SEA. Кодированные области и два транскрипционных терминатора, следующие за продуктами генов, отмечены прямоугольниками. Ген, кодирующий белок устойчивости к канамицину, отмечен K_m. lacI представляет репрессор гена lac. V_H и C_H1 отмечают гены, кодирующие F_d фрагмент тяжелой цепи антигена мыши C215. Подобно, V_K и C_K отмечают гены, кодирующие kappa цепь. Rop представляет ген, кодирующий белок контроля репликации из pB322. Промотеры, направляющие транскрипцию продукта генов, показаны стрелками, в pK889 промотор trc и в других двух векторах промотор белка A стафилококка (Spa). Область, содержащая природу репликации, отмечена ori. Различие между SEA, кодирующим pKP943 и pKP1055 является только глициновый остаток, добавленный к N-концу последнего. Ген SEA, содержащий последний вектор, также содержит несколько уникальных участков для рестрикционных ферментов, введенных путем молчащих мутаций.

Фиг.2.

Спектр кругового дихроизма SEA дикого типа и мутантов F47A и D227A, представляющих мутации с наиболее серьезными редукциями в области связывания каждого МНС класса II. Сплошная линия представляет кривую для дикого типа SEA. Кривые для мутантов представлены пунктирной или точка-пунктирной линиями для F47A и D227A, соответственно.

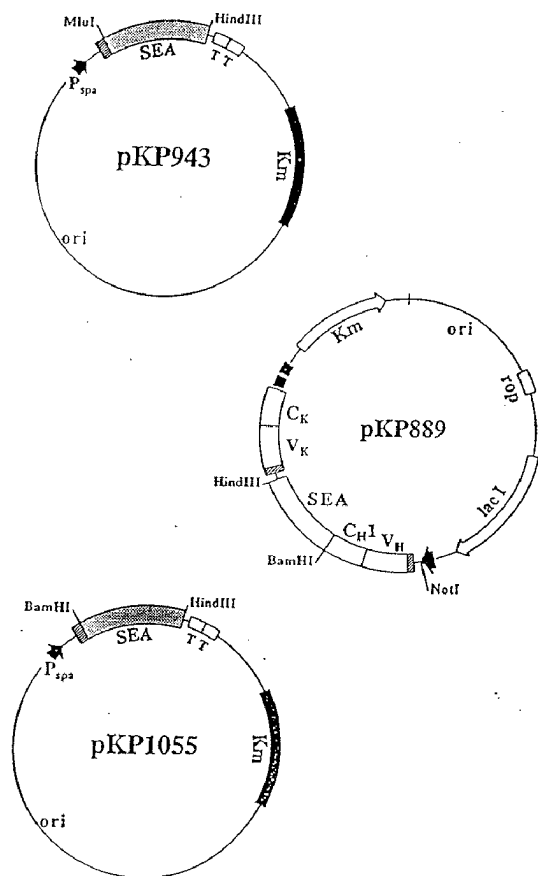
Фиг.3 представляет концентрационную зависимости суперантиген зависимой опосредованной клеточной цитотоксичности (SDCC) для SEA(wt) и SEA(D227A).

Фиг.4 представляет концентрационную зависимость суперантиген зависимой опосредованной клеточной цитотоксичности (SDCC) для C21Fab-SEA(wt) и C21Fab-SEA(D227A).

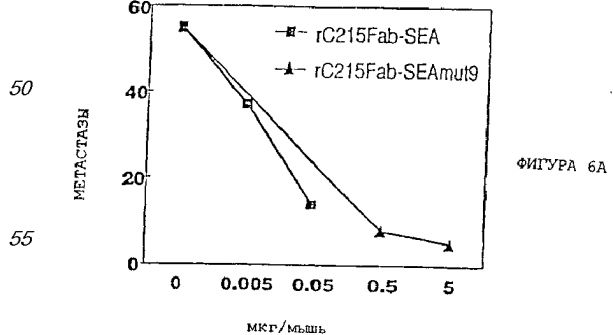
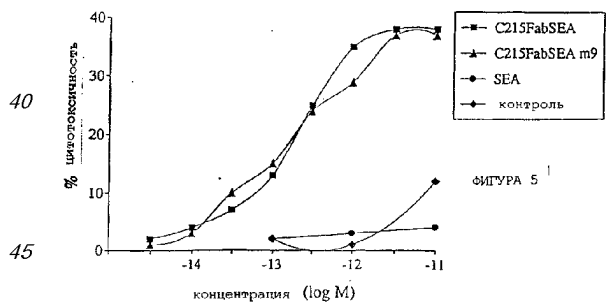
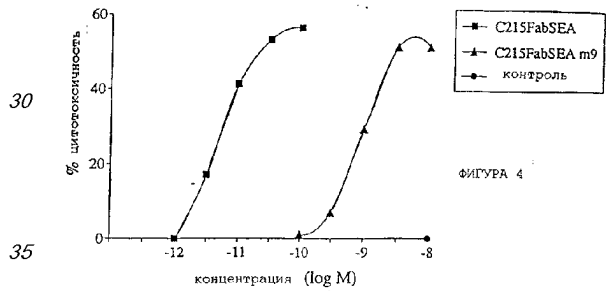
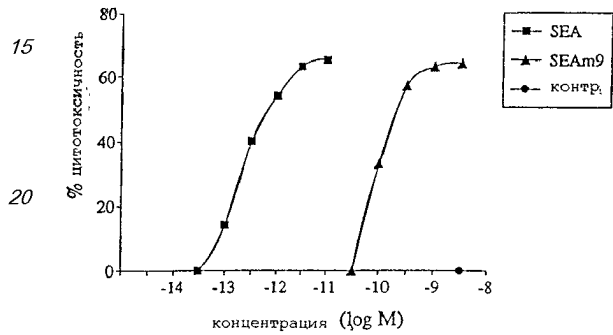
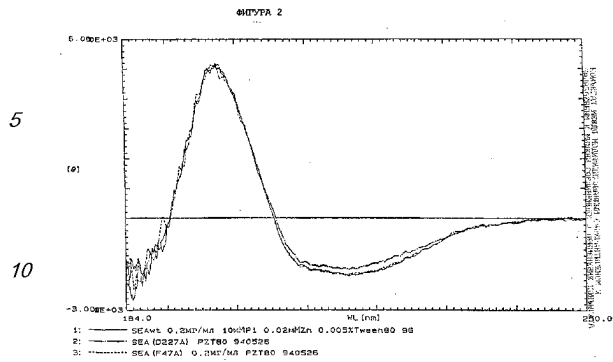
Фиг.5 представляет концентрационную зависимость суперантиген таб зависимой опосредованной клеточной цитотоксичности (SADCC) для C215Fab-SEA(wt) и C215Fab-SEA(D227A).

Фиг.6А представляет сравнение терапевтического действия, полученного на C57B1/6 мышах, несущих легочные метастазы клеток меланомы B16-C215 при лечении с C215Fab-SEA(wt) и C215Fab-SEA(D227A).

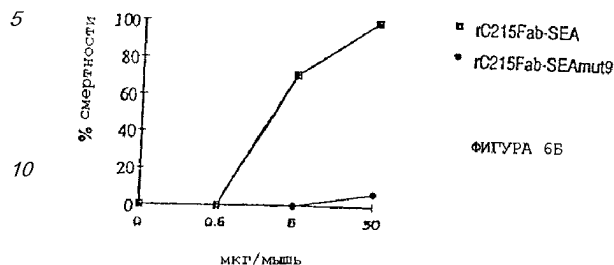
Фиг.6Б представляет токсическое действие C215-SEA(wt) и C215-SEA(D227A) при лечении, как представлено на Фиг.6а.



ФИГУРА 1



ТОКСИЧНОСТЬ



ФИГУРА 6Б

Формула винаходу

1. Конъюгат, содержащий
 - а) биоспецифичный аффинный лиганд, способный связываться с predetermined ассоциированной с заболеванием структурой клеточной поверхности, и
 - б) пептид, который
 - i) содержит аминокислотную последовательность, которая происходит от суперантигена,
 - ii) обладает способностью связываться с $V\beta$ T-клеточного рецептора, и
 - iii) мутирован таким образом, что обладает пониженной аффинностью к антигенам МНС класса II по сравнению с суперантигеном, производным которого является пептид, причём указанные части ковалентно сшиты вместе.
2. Конъюгат по п. 1, обладающий способностью активировать Т-лимфоциты для лизиса клеток, которые экспрессируют указанную клеточную поверхностную структуру на своей поверхности.
3. Конъюгат по п. 2, причём заболевание выбрано из группы, состоящей из злокачественных опухолей, вирусных инфекций, аутоиммунных заболеваний и паразитарных инвазий.
4. Конъюгат по п. 3, причём заболевание представляет собой злокачественную опухоль.
5. Конъюгат по п. 4, причём биоспецифичный аффинный лиганд содержит полипептидную структуру.
6. Конъюгат по п. 5, причём биоспецифичный аффинный лиганд и пептид слиты.
7. Конъюгат п. 6, причём биоспецифичный аффинный лиганд представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент.
8. Конъюгат по п. 7, причём суперантиген представляет собой суперантиген, которому требуются ионы цинка для связывания с антигенами МНС класса II.
9. Конъюгат по п. 8, причём суперантиген является стафилококковым энтеротоксином А (SEA).
10. Конъюгат по п. 9, причём SEA мутирован по кодону, кодирующему аминокислотный остаток, который координирует цинк при связывании суперантигена с антигенами МНС класса II.
11. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, применимый для лечения болезненного состояния у млекопитающего, причём указанное состояние подразумевает присутствие специфических клеток, связанных с указанным состоянием посредством экспрессии специфичной для заболевания поверхностной структуры, причём биоспецифичный аффинный лиганд направлен против специфичной для заболевания поверхностной структуры.

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2005, N 6, 15.06.2005. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.