



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85365 (13) C2

(51) МПК (2009)

C07K 14/525 (2006.01)

C07K 14/57 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 19/00

C12N 15/23 (2006.01)

C12N 15/28 (2006.01)

C12N 15/62

A61K 38/19

A61K 38/21

A61K 48/00

A61K 31/7105

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПРОДУКТ КОН'ЮГУВАННЯ ЦИТОКІНУ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У ПРОТИРАКОВІЙ ТЕРАПІЇ

1

2

(21) 2002097447

(22) 13.02.2001

(24) 26.01.2009

(86) PCT/EP01/01543, 13.02.2001

(31) MI2000A000249

(32) 15.02.2000

(33) IT

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) КОРТІ АНДЖЕЛО

(73) ФОНДАЦІОНЕ ЧЕНТРО САН РАФАЕЛЕ  
ДЕЛЬ МОНТЕ ТАБОР

(56) ARAP W ET AL: "CANCER TREATMENT BY  
TARGETED DRUG DELIVERY TO TUMOR  
VASCULATURE IN A MOUSE MODEL" SCIENCE,  
AMERICAN ASSOCIATION FOR THE  
ADVANCEMENT OF SCIENCE., US, vol. 279, 16  
January 1998 (1998-01-16), pages 377-380,  
XP000857470 ISSN: 0036-8075

PASQUALINI RENATA ET AL: "Aminopeptidase N is  
a receptor for tumor-homing peptides and a target for  
inhibiting angiogenesis." CANCER RESEARCH, vol.  
60, no. 3, 1 February 2000 (2000-02-01), pages 722-  
727, XP002180667 ISSN: 0008-5472

A. GASPARRI ET AL: "Tumor pretargeting with avidin  
improves the therapeutic index of biotinylated Tumor  
Necrosis Factor alpha in mouse models" CANCER  
RESEARCH., vol. 59, 15 June 1999 (1999-06-15),  
pages 2917-2923, XP002180668 MD US

MORO M ET AL: "TUMOR CELL TARGETING WITH  
ANTIBODY-AVIDIN COMPLEXES AND  
BIOTINYLATED TUMOR NECROSIS FACTOR  
ALPHA1" CANCER RESEARCH, AMERICAN  
ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH,  
BALTIMORE, MD, US, vol. 57, no. 10, 15 May 1997

(1997-05-15), pages 1922-1928, XP000764022 ISSN:  
0008-5472

YANG J ET AL: "A GENETICALLY ENGINEERED  
SINGLE-CHAIN FV/TNF MOLECULE POSSESSES  
THE ANTI-TUMOR IMMUNOREACTIVITY OF FV AS  
WELL AS THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF TUMOR  
NECROSIS FACTOR" MOLECULAR  
IMMUNOLOGY, ELMFORD, NY, US, vol. 32, no.  
12, 1 August 1995 (1995-08-01), pages 873-881,  
XP000653177 ISSN: 0161-5890

A. CORTI ET AL: "Tumor targeting with biotinylated  
Tumor Necrosis factor alpha: Structure-Activity  
relationship and mechanism of action on avidin  
pretargeted tumor cells." CANCER RESEARCH., vol.  
58, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 3866-  
3872, XP002180669 MD US

CHEN WANG-QIU ET AL: "Enhanced anti-tumor  
effect of an IFN-gamma-EGF fusion protein." BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES,  
vol. 10, no. 4, December 1997 (1997-12), pages 387-  
395, XP001030801 ISSN: 0895-3988

PAGANELLI G. ET AL: "clinical application of the  
avidin/biotin system for tumor targeting pp.239-253"  
1995, IN D. GOLDENBERG (ED. CANCER  
THERAPY WITH RADIOLABELED ANTIBODIES.  
CRC PRESS, BOCA RATON, XP001033462

CURNIS FLAVIO ET AL: "Enhancement of tumor  
necrosis factor alpha antitumor immunotherapeutic  
properties by targeted delivery to aminopeptidase N  
(CD13)." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 18, no.  
11, November 2000 (2000-11), pages 1185-1190,  
XP002180671 ISSN: 1087-0156

CURNIS FLAVIO ET AL: "Targeted delivery of tumor  
necrosis factor alpha (TNF) to tumor associated

(13) C2

(11) 85365

(19) UA

vessels." INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, vol. 6, no. Supplement 1, 19 - 21 October 2000, page S72 XP001030678 Joint Meeting of the 5th World Congress on Advances in Oncology and the 3rd International Symposium on Molecular Medicine; Crete, Greece; October 19-21, 2000 ISSN: 1107-3756

WO 9913329 A, 18.03.1999

WO 9810795 A, 19.03.1998

(57)

1. Продукт кон'югування цитокіну, вибраного з TNF або IFN $\gamma$ , і пептиду, який містить мотив NGR, де вказаний пептид є лігандом рецептора CD13.
2. Продукт кон'югування за п. 1, де вказаним цитокіном є TNF $\alpha$  або TNF $\beta$ .
3. Продукт кон'югування за п.1 або 2, де вказаний пептид вибраний з групи, що складається з CNGRCVSGCAGRC, NGRANA, GNCRG, циклоCVLNGRMEC, лінійного або циклічного CNGRC.
4. Продукт кон'югування за будь-яким з попередніх пунктів, де цитокін зв'язаний з пептидом за допомогою спейсера.
5. Продукт кон'югування за п. 4, де вказаний пептид являє собою лінійний або циклічний CNGRC і де вказаний пептид зв'язаний з цитокіном за допомогою спейсерного гліцину.
6. Продукт кон'югування за будь-яким з попередніх пунктів, де вказаний цитокін дериватизований поліетиленгліколем або ацильним залишком.
7. Продукт кон'югування за будь-яким з попередніх пунктів, де цитокін додатково кон'югований з антитілом або з його фрагментом, направленим на пухлинний антиген, пухлинний ангіогенний маркер або компонент позаклітинного матриксу, або з біотином.

8. Продукт кон'югування за п. 7, де вказаним цитокіном є TNF і цитокін, кон'югований і з пептидом, який містить мотив NGR, і з антитілом або його фрагментом на різних субодиницях, де антитіло або його фрагмент направлене на пухлинний антиген, пухлинний ангіогенний маркер або компонент позаклітинного матриксу, і де вказаний пептид є лігандом рецептора CD13.

9. кДНК, що кодує цитокін, вибраний з TNF і IFN $\gamma$ , що несе 5'- або 3'-неперервну послідовність, яка кодує пептид, що містить мотив NGR, де вказаний пептид є лігандом рецептора CD13.

10. кДНК за п. 9, де вказаний пептид являє собою пептид за п. 3.

11. кДНК за п. 9, що кодує продукт кон'югування за п. 5.

12. Вектор для генної терапії, що містить кДНК за будь-яким з пп. 9-11.

13. Фармацевтична композиція, що містить ефективну кількість продукту кон'югування за будь-яким з пп.1-8, кДНК за будь-яким з пп. 9-11 або вектора за п. 12 разом з фармацевтично прийнятими носіями та наповнювачами.

14. Композиція за п.13 у формі розчину або суспензії для ін'єкції або рідини для вливань.

15. Композиція за п.13 або 14 у формі ліпосом.

16. Застосування продукту кон'югування за будь-яким з пп. 1-8, кДНК за будь-яким з пп. 9-11 або вектора за п. 12 для виготовлення лікарських або діагностичних засобів для лікування злоякісної пухлини.

17. Застосування продукту кон'югування за п.16 у комбінації з іншими протипухлинними агентами або діагностичними пухлиновізуалізуючими сполуками.

Даний винахід відноситься до модифікованих цитокінів, які використовуються для лікування злоякісних пухлин. Більш конкретно, даний винахід відноситься до похідних цитокінів, здатних до самонацілювання на клітини пухлинних судин та антигенпрезентуючі клітини (хомінгу).

Протипухлинна активність деяких цитокінів добре відома і описана. Деякі цитокіни вже використовуються для терапевтичного лікування людини [29]. Так, наприклад, такі цитокіни, як інтерлейкін-2 (IL-2) та інтерферон  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) володіють позитивною протипухлинною активністю у пацієнтів з різними типами пухлин, таких як карцинома нирок з метастазами, волохатоклітинний лейкоз, саркома Калозі, меланома, множинна мієлома і т.п. Інші цитокіни, такі як IEN $\beta$ , фактор некрозу пухлини (TNF),  $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1, 4, 6, 12, 15 та колонієстимулюючі фактори (КСФ), також виявляють деяку протипухлинну активність, направлену на деякі типи пухлин, а тому вони є об'єктами для подальших досліджень.

У загальних рисах, терапевтичне використання цитокінів сильно обмежене їх системною токсичністю. Так, наприклад, TNF був спочатку виявле-

ний за його здатністю індукувати геморагічний некроз деяких пухлин [1] і за його *in vitro* цитотоксичною дією на різні пухлинні клітинні лінії [2], але згодом було показано, що він володіє сильною прозапальною активністю, яка, у випадку його надпродуктування, може представляти небезпеку для людського організму [3].

Оскільки системна токсичність є головною проблемою, пов'язаною з використанням фармакологічно активних кількостей цитокінів у людини, то в даний час ведеться пошук нових похідних і терапевтичних схем, метою якого є зниження токсичної дії біологічних ефекторів цього класу при збереженні їх терапевтичної ефективності.

Деякі нові підходи спрямовані на:

а) розробку гібридних білків, які можуть доставляти TNF у пухлину і підвищувати його локальну концентрацію. Так, наприклад, були продуковані гібридні білки, що складаються з TNF і пухлинноспецифічних антитіл [4]:

б) розробку TNF-мутантів, які зберігають протипухлинну активність і мають знижену системну токсичність. Відповідно до цього вже були одержані мутанти, які володіють здатністю селективно

розпізнавати тільки один рецептор (p55 або p75) [5];

с) використання антитіл проти TNF, які здатні знижувати деякі токсичні ефекти TNF, не впливаючи на їх протипухлинну активність. Такі антитіла вже були описані у літературі [30];

д) використання похідних TNF з більш високим часом напівжиття (наприклад, TNF, кон'югованих з поліетиленгліколем).

Нещодавно повідомлялося про одержання похідних TNF, здатних до селективної доставки у пухлинні ділянки. Так, наприклад, був описаний гібридний білок, одержаний шляхом приєднання гена важкого ланцюга mAb проти рецептора трансферну до гена TNF [4], або гібридний білок, утворений TNF з «шарнірною» областю моноклонального антитіла проти пухлинноасоційованого антигену TAG72 (6), або гібридний білок «Fv-TNF» [6].

У [EP 2512494] описана система введення діагностичного або терапевтичного агента, яка включає: антитіло, кон'юговане з авідином або стрептавідином; агент, здатний утворювати комплекс з кон'югованим антитілом; і сполуку, що складається з діагностичного або терапевтичного агента, кон'югованого з біотином; де вказану систему вводять послідовно і через адекватні проміжки часу, так, щоб таке введення сприяло локалізації терапевтичного або діагностичного агента, за допомогою взаємодії біотин-стрептавідин, на клітині-мішені, яка розпізнається вказаним антитілом. Описані терапевтичні або діагностичні агенти включають желатні комплекси з металами, а зокрема, желатні комплекси з радіонуклідами та з низькомолекулярними протипухлинними агентами, такими як цисплатина, доксорубіцин і т.п.

У [EP 496074] описаний спосіб, який дозволяє здійснювати послідовне введення біотинільованого антитіла, авідину або стрептавідину та біотинільованого діагностичного або терапевтичного агента. Хоча цитотоксичні агенти, такі як рицин вже у загальних рисах описані в літературі, однак, в основному, цей опис стосується їх застосування по відношенню до радіоактивно мічених сполук.

У [WO 95/15979] описаний спосіб локалізації високотоксичних агентів на клітинних мішенях, який базується на введенні першого кон'югату, що включає специфічну молекулу-мішень, кон'юговану з лігандом або з антилігандом, з подальшим введенням другого кон'югату, що складається з токсичного агента, зв'язаного з антилігандом або з лігандом.

У [WO 99/13329] описаний метод направленої доставки молекули у пухлинні ангіогенні судини, який базується на кон'югуванні вказаної молекули з лігандами рецепторів NGR. Як можливі кандидати пропонувався ряд молекул, але конкретно описаний був тільки доксорубіцин. У вказаній роботі не описане використання лігандів NGR-рецепторів як носіїв для цитокінів з метою індукції імунних відповідей.

Було несподівано виявлено, що терапевтичний індекс деяких цитокінів може бути помітно збільшений, а їх імунотерапевтичні властивості можуть бути посилені шляхом їх скріплення з лігандом амінопептидаза-N-рецептора (CD13).

CD13 являє собою трансмембранний глікопротеїд масою 150 кДа, який є висококонсервативним для деяких видів. Він експресується на нормальних клітинах, а також у мієлоїдних пухлинних лініях, в ангіогенному ендотелії та у деяких епітеліальних клітинних лініях. CD13-рецептор звичайно ідентифікується як «NGR»-рецептор, оскільки його пептидні ліганди мають спільний амінокислотний мотив «NGR».

Відповідно до свого першого аспекту, даний винахід відноситься до продукту кон'югування цитокіну, вибраного з TNF та IFN $\gamma$ , з лігандом рецептора CD13. Вказаним лігандом може бути антитіло або його фрагмент, такий як Fab, Fv, одноланцюговий Fv, пептид або пептидоміметик, а саме пептидоподібна молекула, здатна зв'язуватися з рецептором CD13 і яка необов'язково містить модифіковані неприродні амінокислоти. Вказаний ліганд переважно являє собою прямий або циклічний пептид, що включає мотив NGR, такий як CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, циклоCVLNGRMEC або циклоCNGRC або, більш переважно, пептид CNGRC. Вказаний пептид може бути безпосередньо зв'язаний з цитокіном, або він може бути зв'язаний через спейсер, який може являти собою одну амінокислоту, амінокислотну послідовність або органічний залишок, такий як 6-амінокаприл-N-гідроксисукцинімід. Процедури скріплення відомі фахівцям і передбачають втілення методів генної інженерії або методів хімічного синтезу.

Пептидний ліганд переважно зв'язується з N-кінцем цитокіну, мінімізуючи, тим самим, будь-який вплив на скріплення модифікованого цитокіну з його рецептором. Альтернативно, вказаний пептид може бути зв'язаний з амінокислотними залишками, які являють собою акцептор амідних або карбоксильних зв'язків, звичайно присутні на даній молекулі або штучно введені методами генної інженерії. Вказаний модифікований цитокін переважно одержують з використанням кДНК, що включає 5'-безперервну послідовність, яка кодує даний пептид.

Відповідно до переважного варіанту свого втілення, даний винахід відноситься до продукту кон'югування TNF і послідовності CNGRC. Більш переважно, аміно-кінець TNF зв'язаний з пептидом CNGRC через спейсер G (гліцин).

На моделях тварин з лімфомаю RMA-T було підтверджено, що одержаний продукт (NGF-TNF) є більш активним, ніж TNF. Крім того, у тварин, оброблених NGR-TNF, спостерігалася здатність до відторгнення додатково введених онкогенних доз клітин RMA-T або RMA. Збільшення протипухлинної активності, у порівнянні з нормальним TNF, могло спостерігатися у імунотропних тварин, але не у імунodefіцитних тварин. Це вказує на те, що підвищення протипухлинної активності TNF, кон'югованого з пептидами «NGR», обумовлене посиленням імунної відповіді, а не прямою цитотоксичною активністю вказаного кон'югата.

Було також продемонстровано, що *in vivo* імунні ефекти, індуквані NGR-TNF, безпосередньо пов'язані з рецептором CD13. Так, наприклад, спостерігалася, що антитіло проти рецептора CD13, а також ліганд GNGRC, конкурують з NGR-

TNF *in vivo*, що дає підстави припускати наявність механізму націленої NGR-TNF-доставки до рецептора.

Терапевтичний індекс кон'югатів «TNF/ліганд CD13» може бути, крім того, поліпшений з використанням мутантної форми TNF, здатної селективно зв'язуватися з одним з двох рецепторів TNF, p75TNFR і p55TNFR. Вказаний мутант TNF може бути одержаний за допомогою сайт-направленого мутагенезу [5; 7].

Фармакокінетичні властивості модифікованих цитокінів даного винаходу можуть бути поліпшені шляхом одержання поліетиленгліколевих похідних, що дозволяє, тим самим, збільшувати час напівжиття самих цитокінів у плазмі.

В іншому варіанті свого втілення, даний винахід відноситься до біфункціональних похідних, в яких цитокіни, модифіковані вказаним лігандом CD13, кон'юговані з антитілами або з їх фрагментами проти пухлинних антигенів або інших пухлинних ангіогенних маркерів, наприклад,  $\alpha$ -інтегринів, металопротеаз або судинного фактора росту, або з антитілами або з їх фрагментами проти компонентів позаклітинного матриксу, такими як антитіла проти тенасцину або домен проти фібронектину EDB. Нещодавно було описане одержання гібридного продукту, утвореного між TNF і шарнірною областю mAb проти пухлинноасоційованого антигену TAG72, що експресується аденокарциною шлунка та яєчника [6].

В іншому варіанті втілення винаходу, даний винахід відноситься до попереднього націлювання на пухлину за допомогою системи біотин/авідин. Відповідно до цього підходу одержують третинний комплекс на пухлинному антигенному сайті у різних стадіях, де вказаний комплекс утворений 1) біотинільованим mAb, 2) авідіном (або стрептавідином) і 3) двовалентним цитокіном, модифікованим лігандом CD13 та біотином. Ряд робіт підтвердив, що спосіб попереднього націлювання, у порівнянні зі стандартним способом націлювання з використанням імунокон'югатів, може фактично збільшувати відношення активних молекул, направлених на мішень, до вільних активних молекул, що приводить до зниження токсичності при лікуванні [11, 10, 9, 8]. Даний спосіб дає хороші результати при використанні біотинільованого TNF, який здатний індукувати цитотоксичність *in vitro* та знижувати ріст пухлинних клітин в умовах, за яких нормальний TNF є неактивним [14, 26]. Спосіб попереднього націлювання може бути також здійснений шляхом проведення двофазової процедури з використанням біспецифічного антитіла, яке одночасно зв'язується з пухлинним антигеном і з модифікованим цитокіном. Нещодавно було описане використання біспецифічного антитіла проти карциноембріонального антитіла та TNF як спосіб для попередньої доставки TNF у пухлину [31].

Відповідно до іншого варіанту свого втілення, даний винахід відноситься до молекули TNF, кон'югованої як з лігандом CD13, так і з антитілом, або з його фрагментом (безпосередньо або опосередковано зв'язаним через біотин-авідиновий місток) на різних субодинацях TNF, де вказане антитіло або його фрагменти направлені проти антигену,

який експресується на пухлинних клітинах або інших компонентах пухлинної стромы, наприклад, домен EDB тенасцину або фібронектину. Це приводить до додаткового поліпшення здатності модифікованого цитокіну до хомінгу у пухлину та до уповільненого вивільнення даного цитокіну у мікрооточенні пухлини за допомогою переходів тример-мономер-тример. Дійсно, як показано у попередніх роботах, модифіковані субодинаці кон'югатів TNF можуть відщеплюватися від комплексу, що націлюють, і повторно асоціюватися з утворенням немодифікованих тримірних молекул TNF, які потім дифундують у мікрооточення пухлини. Було показано, що вивільнення біологічно активного TNF відбувається протягом 24-48 годин після доставки [21].

Для використання у терапії, модифіковані цитокіни даного винаходу можуть бути відповідним чином включені до фармацевтичних препаратів для перорального або парентерального введення. Препарати для парентерального введення є переважними, і вони являють собою розчини або суспензії для ін'єкцій та рідини для вливань.

Для одержання парентеральних форм, ефективна кількість активного інгредієнту може бути розчинена або суспендована у стерильному носії, необов'язково з доданням наповнювачів, таких як солюбілізатори, агенти, що надають ізотонічність, консерванти, стабілізатори, емульгатори або диспергуючі агенти, після чого одержані розчин або суспензія можуть бути розподілені по герметичних посудинах або ампулах.

Одержання препаратів цитокінів у формі ліпосом може поліпшувати їх біологічну активність. Дійсно, спостерігалось, що ацилювання аміногруп TNF індукує збільшення його гідрофобності без втрати біологічної активності *in vitro*. Крім того, повідомлялось, що TNF, зв'язаний з ліпідами, має незмінені цитотоксичність *in vitro*, імуномодуючу дію та знижену токсичність *in vivo* [12, 13].

Максимальна гранично допустима болюсна доза TNF для людини становить 218-410 мкг/м<sup>2</sup> [32], що приблизно у 10 разів нижче, ніж ефективна доза для тварин. Виходячи з даних, одержаних на мишачих моделях, очевидно, що для досягнення протипухлинних ефектів у людини необхідна, принаймні у 10 разів, більш висока доза [15]. У першому клінічному дослідженні на перфузію у гіпертермічно ізольованій кінцівці були одержані високі рівні відповіді з використанням єдиної дози 4 мг TNF у комбінації з мелфаланом та інтерфероном  $\gamma$  [16]. В інших роботах було показано, що інтерферон  $\gamma$  може бути відсутнім, і що для індукування терапевтичної відповіді можуть виявитися достатніми навіть більш низькі дози TNF [17, 18]. Оскільки два цитокіни здійснюють синергічну дію на ендотеліальні клітини, і їх об'єднане селективне націлювання на ці клітини приводить, ймовірно, до більш сильної протипухлинної активності, то таким чином можна вирішити проблеми, пов'язані з системною токсичністю, які звичайно виникають при лікуванні злоякісних пухлин з використанням тих же цитокінів, взятих у комбінації один з одним. Крім того, відомо, що TNF може знижувати бар'єрну функцію судин з ендотеліальною вистилкою, що приводить до збільшення їх проникності для мак-

ромолекул. Враховуючи більш низьку токсичність модифікованих молекул TNF даного винаходу, що використовуються для лікування, та їх самонацілюючих властивостей по відношенню до пухлинних судин, то вони можуть мати альтернативне застосування у терапії або у діагностиці, яке базується на збільшенні проникності пухлинних судин для інших сполук. Так, наприклад, модифікований TNF може бути використаний для збільшення поглинання пухлиною радіоактивно мічених антитіл або гормонів (сполук, що візуалізують пухлину) при радіоімуносцинтиграфії або радіоімунотерапії пухлин. Альтернативно, може бути також збільшене поглинання хімотерапевтичних лікарських засобів, імунотоксинів, ліпосом, що несуть лікарські засоби або гени, або інших протиракових лікарських засобів, так, щоб їх протипухлинна дія посилювалася.

Відповідно до цього, цитокіни даного винаходу можуть бути використані у комбінованих препаратах, окремих препаратах або препаратах, які вводяться послідовно, а також разом з іншими діагностичними або терапевтичними речовинами для лікування або діагностики злоякісних пухлин.

В останньому своєму аспекті, даний винахід відноситься до кДНК, що кодує описані тут кон'юговані цитокіни, які можуть бути одержані з кДНК цитокінів шляхом додання 5'- або 3'-безперервної ДНК-послідовності, що кодує ліганд CD13, а переважно, вищеописані пептиди, відповідальні за хомінг. Комбінована кДНК може бути використана безпосередньо або після введення у вектори, які застосовуються у генній терапії. Одержання і терапевтичне застосування відповідних векторів описане у роботі [19], яка вводиться у даний опис за допомогою посилання.

Фігура 1: Вплив TNF і NGR-TNF на ріст лімфом RMA-T (a і b) та на масу тварини (c і d)

5 тварин на групу обробляли разовою дозою TNF або NGR-TNF (і.р.) через 10 днів після імплантації пухлини. Площу пухлини оцінювали на 14-й день в залежності від дози (b), а втрату маси після лікування (середнє у дні 11 і 12) (d) інтерполювали, виходячи з логарифмічних кривих. Протипухлинна дія, індукована введенням 1мкг або 9мкг NGR-TNF на 14-й день, перевищувала дію, індуковану порівнянними кількостями TNF ( $P=0,024$  і  $P=0,032$ , відповідно), при цьому, втрата маси після вказаної обробки була аналогічною. Стрілками вказані екстрапольовані дози TNF і NGR-TNF, які індукують порівнянну дію.

Фігура 2: Дія mAb R3-63 і CNGRC на протипухлинну активність NGR-TNF (a) і TNF (b).

mAb R3-63 або CNGRC змішують з NGR-TNF або TNF і вводять тваринам з пухлиною RMA-T на 12-й день після імплантації пухлини ( $n=5$  тварин/групу). В окремому експерименті (c), TNF і NGR-TNF спільно вводять з CNGRC або CARAC (контрольний пептид) тваринам з 11-денними пухлинами ( $n=5$ ). Протипухлинна дія 1мкг NGR-TNF була сильнішою за протипухлинну дію 9мкг TNF ( $P=0,009$ , т-критерій, день 20) і ця дія значною мірою інгібувалася CNGRC ( $P=0,035$ ) та mAb R3-63 ( $P=0,011$ ).

Фігура 3: Вплив обмеженого трипсिनного гідролізу NGR-TNF і TNF на їх масу (a) та протипухлинну активність (b)

Трипсин-агарозу одержують шляхом взаємодії 1мг трипсину з 1мл активованої CN-сефарози (Pharmacia-Upjohn) відповідно до інструкцій виробників. NGR-TNF і TNF (170мкг кожного у 300мкл 0,15М хлориду натрію, 0,05М фосфату натрію, pH 7,3) змішують з 15мкл суспензії смоли (1:4) або тільки з буфером, і перемішують шляхом безперервного обертання при 37°C протягом певного часу. Чотири продукти фільтрують через фільтруючий пристрій Spin-X 0,22мкм (Costar, Cambridge, MA) і зберігають при -20°C аж до їх використання, (a) Мас-спектрометричний аналіз шляхом електроннапилення. Величини молекулярних мас і відповідні продукти (N-кінцеві послідовності) вказані на кожному піку. Стрілки на послідовностях означають сайт розщеплення. (b) Дія 1 або 3мкг NGR-TNF і TNF, інкубованих без трипсину (верхні панелі) або з трипсином (нижні панелі), на ріст пухлин RMA-T і вагу тварин (середнє±середня квадратична похибка для груп, оброблених дозами 1 і 3мкг). Тварин обробляють на 13-й день після імплантації пухлини ( $n=5$  тварин/групи).

Фігура 4: Електрофорез у ПААГ з ДСН та протипухлинна активність людського NGR-TNF до і після денатурації/повторного укладання

Електрофорез у ПААГ з ДСН в умовах, що нередукують, (A) людського TNF (a), NGR-TNF до (b) і після (c) процесу денатурації/повторного укладання описаний у Прикладі V.

Вплив TNF і NGR-TNF, не підданого повторному укладанню, на ріст лімфом RMA-T (B) і на масу тіла (C). Дія людського TNF (D) та повторно укладеного NGR-TNF (що складається з >95% тримерів з дисульфідами всередині ланцюга) (E) на ріст пухлини. Тварин (15 або 5 мишей/групу як показано у кожній панелі) обробляли і.р. однією дозою TNF або NGR-TNF через 10 днів після імплантації пухлини.

Даний винахід більш детально проілюстрований нижченаведеними прикладами.

Приклад I

Одержання мишачих TNF і NGR-TNF

Мишачий рекомбінантний TNF і Cys-Asn-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF (NGR-TNF) продукували шляхом експресії цитоплазматичної кДНК у *E.coli*. кДНК, що кодує мишачий Met-TNF<sub>1-156</sub> [20], одержували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскриптазою (ОТ-ПЛР) на мРНК, що виділена з стимульованих ліпополісахаридом мишачих моноцитарних-макрофагальних клітин RAW-264.7 з використанням 5'-CTGGATCCTCACAGAGCAATGACTCCAAAG-3' і 5'-TGCCTCACATATGCTCAGATCATCTTCTC-3' як 3'- і 5'- 14 праймерів.

Ампліфікований фрагмент гідролізували ферментами NdeI та BatHI (New England Biolabs, Beverly, MA) і клонували у вектор pET-11b (Novagen, Madison, WI), заздалегідь гідролізований тими ж ферментами (pTNF).

кДНК, що кодує Cys-Asn-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF<sub>1-156</sub>, ампліфікували за допомогою ПЛР на pTNF, з використанням 5'-GCAGATCATATGTGCAACGGCCGTTGCGGCCTC

AGATCATCTTCTC-3' як 5'-праймера та вищезгаданого 3'-праймера. Ампліфікований фрагмент гідролізували та клонували у pET-11b, як описано вище, і використовували для трансформації клітин BL21(DE3) *E.coli* (Novagen). Експресію TNF і NGR-TNF індукували ізопропіл- $\beta$ -D-тіогалактозидом відповідно до інструкцій виробників pET11b. Розчинний TNF і NGR-TNF виділяли з дволітрових культур шляхом обробки бактерій ультразвуком у 2ММ етилендіамінотетраоцтовій кислоті, 20ММ Трис-HCl, pH 8,0, з подальшим центрифугуванням (15000 $\times$ g, 20хв., 4°C). Обидва екстракти змішували з сульфатом амонію (25% насичення), залишали на 1год. при 4°C, а потім центрифугували, як описано вище. Потім сульфат амонію у супернатантах доводили до 65%-ного насичення, залишали при 4°C на 24год., після чого центрифугували. Кожний осад розчиняли у 200мл 1М сульфату амонію, 50ММ Трис-HCl, pH 8,0, і очищали за допомогою гідрофобної хроматографії на фенілсефарозі 6 Fast Flow (Pharmacia-Upjohn) (градієнтне елюювання, буфер А: 50ММ фосфат натрію, pH 8,0, що містить 1М сульфат амонію; буфер В: 20% гліцерин, 5% метанол, 50ММ фосфат натрію, pH 8,0). Фракції, які містять TNF-імунореактивний матеріал (Вестерн-блотінг), об'єднували, діалізували проти 2ММ етилендіамін-тетраоцтової кислоти, 20ММ Трис-HCl, pH 8,0, а потім очищали іонообмінною хроматографією на DEAE-сефарозі 6 Fast Flow (Pharmacia-Upjohn) (градієнтне елюювання, буфер А: 50ММ Трис-HCl, pH 8,0; буфер В: 1М хлорид натрію, 20ММ Трис-HCl, pH 8,0). Фракції, які містять TNF-імунореактивний матеріал, об'єднували і очищали гель-хроматографією на сефакрил-S-300 HR (Pharmacia-Upjohn), заздалегідь зрівноважували та елюювали 150ММ хлоридом натрію, 50ММ фосфатно-натрієвим буфером, pH 7,3 (PBS). Фракції, які відповідають продуктам з відносною молекулярною масою (Mr) 40000-50000, об'єднували, розділяли на аліквоти та зберігали у замороженому вигляді при -20°C. Усі розчини, що використовуються у хроматографічних стадіях, одержували з використанням стерильної води, яка не містить ендотоксинів (Salf, Bergamo, Italy). Кінцеві виходи складали 45мг TNF і 34,5мг NGR-TNF.

Молекулярну масу очищеного TNF і NGR-TNF вимірювали за допомогою мас-спектрометрії шляхом електронапилення. Вміст білка вимірювали з використанням комерційно доступного набору для аналізу білків (Pierce, Rockford, IL). Вміст ендотоксину у NGR-TNF і TNF становив 0,75одиниць/мкг та 1,38одиниць/мкг, відповідно, як було визначено за допомогою кількісної хромогенної проби з лізатом амебоцитів (лімулюс-тест) (BioWhittaker).

Електрофорез у поліакриламідному гелі з десятильним сульфатом натрію (ДСН-ПААГ) та вестерн-блот-аналіз здійснювали з використанням 12,5 або 15% поліакриламідного гелю у відповідності зі стандартними процедурами.

Невелику кількість TNF і NGR-TNF додатково очищали афінною хроматографією на розчинному p55-TNF-рецепторі (sTNF-R1)-сефарозі, як описано нижче: 5мг рекомбінантного sTNF-R1 одержували, як описано у роботі [22], і зв'язували з 2мл активованої СН-сефарози (Pharmacia) відповідно до інструкцій виробників. Дві окремі колонки (по

одному мл кожна) інтенсивно промивали стерильними розчинами, які не містять ендотоксинів, завантажували очищений TNF або NGR-TNF у PBS і десорбували шляхом градієнтного елюювання (1год., буфер А: PBS; буфер В: 0,5М хлорид натрію, 0,2М гліцин-HCl). Фракції, які містять TNF-антиген, нейтралізували та діалізували проти стерильного фізіологічного розчину. Для запобігання адсорбції білка на мембранах, перед діалізом додавали альбумін сироватки людини, що не містить ендотоксину (0,5мг/мл). Вміст TNF у кожній фракції вимірювали за допомогою ELISA та аналізу на цитоліз.

Електрофорез TNF у нередукуючому ПААГ з ДСН виявив одну смугу 17-18кДа, очікувану для мономерного TNF (не показано). На відміну від цього, електрофорез NGR-TNF у нередукуючому ПААГ з ДСН і вестерн-блот-аналіз NGR-TNF виявили різні імунореактивні форми 18, 36 і 50кДа, ймовірно відповідні мономерам, димерам і тримерам. У редукуючих умовах, більшість з 50- і 36кДа-смуг були перетворені у 18кДа-форму, що вказувало на присутність молекул NGR-TNF з дисульфідними містками всередині ланцюга. 18кДа-смуга становила, за оцінками, приблизно 2/3 від всього матеріалу, тоді як 36кДа-смуга становила більшу частину решти матеріалу. Ці електрофоретичні картини дають підставу припустити, що NGR-TNF являє собою суміш тримерів, яка складається з трьох мономерних субодиниць з «правильними» дисульфідами всередині ланцюга (принаймні, 50%), а інша частина, в основному, складається з тримерів з одним або декількома дисульфідами, розташованими між ланцюгами. Наявність 36кДа-смуги, що ще спостерігається за допомогою електрофорезу у редукуючому ПААГ з ДСН, дозволяє припустити, що NGR-TNF містить також необоротно денатурований димер (приблизно 10% від загальної кількості).

Молекулярна маса мономерів TNF і NGR-TNF складала 17386,1 $\pm$ 2,0Да і 17843,7 $\pm$ 2,5Да, відповідно, як було визначено за допомогою мас-спектрометрії шляхом електронапилення. Ці значення дуже добре відповідають масі, очікуваній для Met-TNF<sub>1-156</sub> (17386,7Да) та для CNGRCG-TNF<sub>1-156</sub> (17844,2Да).

#### Приклад II

In vitro-цитотоксична активність мишачих TNF і NGR-TNF

Біологічну активність TNF і NGR-TNF оцінювали за допомогою стандартного аналізу на цитоліз, проведеного на мишачих фібробластах L-M (ATCC CCL1.2), як описано у роботі (23). Цитолітичну активність TNF і NGR-TNF на клітинах RMA-T тестували у присутності 30нг/мл актиноміцину D. Кожний зразок аналізували у дублікатах при трьох різних розведеннях. Результати виражені як середнє $\pm$ сер.кв.пох. для двох-трьох незалежних аналізів.

In vitro-цитотоксична активність TNF і NGR-TNF складала (1,2 $\pm$ 0,14) $\times$ 10<sup>8</sup>одиниць/мг і (1,8 $\pm$ 0,7) $\times$ 10<sup>8</sup>одиниць/мг, відповідно, як було визначено за допомогою стандартного аналізу на цитоліз з використанням клітин L-M. Ці результати показали, що група CNGRCG у молекулі NGR-TNF

не запобігає укладанню, олігомеризації та скріпленню з TNF-рецепторами.

У попередній стадії, авторами було виявлено, що клітини RMA-T можуть бути лізовані TNF у присутності 30нг/мл актиноміцину D, тоді як у відсутності інгібіторів транскрипції, ці клітини є резистентними до TNF навіть після інкубування протягом декількох днів. In vitro цитотоксичність NGT-TNF на клітинах RMA-T у присутності актиноміцину D складала  $(1,4 \pm 0,8) \times 10^8$  одиниць/мг, як було виміряно з використанням TNF  $((1,2 \pm 0,14) \times 10^8$  одиниць/мг) як стандарт. Таким чином, цитотоксичні активності NGT-TNF і TNF були аналогічні як на клітинах L-M, так і на клітинах RMA-T.

#### Приклад III

Характеризація терапевтичної і токсичної активності мишачих TNF і NGT-TNF

Індуковану вірусом Раушера лімфому RMA, що походить від C57BL/6, витримували in vitro у середовищі RPMI 1640, яке містить 5% фетальну бичачу сироватку (FBS), 100од/мл пеніциліну, 100мкг/мл стрептаміцину, 0,25мкг/мл амфотерицину В, 2мМ глутаміну та 50мкМ 2-меркаптоетанолу. RMA-T одержували з клітинної лінії RMA шляхом трансфекції конструкцією, що кодує алель Thy 1.1, та культивували, як описано у роботі [14].

Клітини меланоми B16F1 культивували у середовищі RPMI 1640, що містить 5% FBS, 100од/мл пеніциліну, 100мкг/мл стрептаміцину, 0,25мкг/мл амфотерицину В, 2мМ глутаміну, 1% MEM із замінною амінокислотою (BioWhittaker Europe, Venders, Belgium).

Дослідження in vivo на моделях тварин були схвалені Комітетом з етики при Науково-дослідному інституті у Рафаелі (Ethical Committee of the San Raffaele H Scientific Institute) і проводилися відповідно до інструкцій. Мишам C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Italy) (16-18г) у лівій бік підшкіри (s.c.) ін'єктували  $5 \times 10^4$  живих клітин RMA-T або B16F1, відповідно. Через десять-дванадцять днів після імплантації пухлини, мишей обробляли, i.p., 250мкл розчинами TNF або NGT-TNF, розведеними 0,9% хлоридом натрію, що не містить ендотоксин.

Попередні експерименти показали, що протипухлинна активність не змінювалася при доданні

альбуміну бичачої сироватки, як носія, до розчинів TNF або NGT-TNF. Кожний експеримент проводили з використанням 5 мишей на групу. За ростом пухлини щодня спостерігали шляхом вимірювання розміру пухлини за допомогою штангенциркуля. Площу пухлини оцінювали шляхом обчислення  $r_1 \times r_2$ , а об'єм пухлини оцінювали шляхом обчислення  $r_1 \times r_2 \times r_3 \times 4/3$ , де  $r_1$  і  $r_2$  означають подовжній і поперечний радіуси, а  $r_3$  означає товщину пухлини, яка виступає над поверхнею нормальної шкіри. При досягненні пухлиною діаметра 1,0-1,3см, тварин умертвляли. Розміри пухлин виражали як середню величину  $\pm$  сер.кв.пох. (5-10 тварин на групу, як вказано в описі графічного матеріалу) і порівнювали із застосуванням т-критерію.

Протипухлинну активність і токсичність NGT-TNF порівнювали з відповідною активністю і токсичністю TNF з використанням моделей лімфоми RMA-T і меланоми B16F1 на мишах C57BL/6. Оскільки модель RMA-T була раніше охарактеризована і використана для дослідження протипухлинної активності TNF у різних схемах його направленої доставки [26], то автори даного винаходу вирішили використати цю модель також і у даному дослідженні.

Мишачий TNF, що вводиться тваринам, які несуть вже розвинені підшкірні пухлини RMA-T, спричиняв через 24 години зниження маси пухлини та геморагічного некрозу в центральній частині пухлини з подальшим значним сповільненням росту пухлини протягом декількох днів [26]. Разова TNF-обробка не індувала повну регресію цієї пухлини навіть при дозах, близьких до  $LD_{50}$ , і при цьому, живі клітини, які залишилися навколо некротичної зони починали знову рости через декілька днів після обробки.

У першій серії експериментів, авторами даного винаходу були проведені дослідження дії різних доз (i.p.) TNF або NGT-TNF на виживання тварин. Щоб не завдавати тваринам зайвих страждань, їх умертвляли, коли діаметр пухлини досягав більше 1-1,3см. Летальні ефекти TNF і NGT-TNF через 3 дні після обробки були аналогічні ( $LD_{50}$ , 60мкг і 45мкг, відповідно), тоді як їх протипухлинна активність помітно відрізнялася (таблиця 1).

Таблиця 1

Виживання мишей з лімфою RMA-T, оброблених мишачим TNF або NGT-TNF

Обробка	Тварини (n)	Доза (мкг)	Виживання (%) <sup>a</sup> після обробки							
			День 3	День 7	День 14	День 21	День 30	День 38 (2 <sup>a</sup> -стим.) <sup>b</sup>	День 62 (3 <sup>a</sup> -стим.) <sup>b</sup>	День 92
None	18	0	100	0						
TNF	4	1	100	20	0					
	9	3	100	55	0					
	9	9	100	55	22	11	0			
	14	27	100	57	14	7	0			
	9	54	55	55	0					
	9	108	0							

Продовження таблиці 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
NGR-TNF	10	1	100	70	10	10	10	0		
	10	3	100	80	20	20	20	0		
	9	9	100	88	55	22	11	11	11	
	13	27	100	85	30	23	15	15	15	11
	9	54	33	33	0					15
	9	108	0							

а) Тварин з пухлиною обробляли TNF або NGT-TNF (i.p.) через 10 днів після імплантації пухлини. Тварин умертвляли, коли діаметр пухлини перевищував 1-1,3см.

б) Тваринам, які вижили, повторно вводили 50000 клітин RMA-T (друга стимуляція) або 50000 RMA (третя стимуляція) у вказаний час. При цьому, кожний раз у вказаний час проводили моніторинг онкогенності ін'єктованих клітин з використанням для порівняння 5 нормальних тварин. У всіх контрольних тварин розвивалася пухлина протягом 10 днів (дані не наводяться).

Так, наприклад, введення 1 або 3мкг NGT-TNF приводило до сповільнення росту пухлини більш ефективно, ніж 27мкг TNF, що вказувало на те, що NGT-TNF, принаймні, на один порядок величини був більш активним. Цікаво зазначити, що деякі тварини виживалися дозами NGT-TNF, які були нижчими за LD<sub>50</sub>, в той час як жодна з тварин не виживалася TNF. У виживаних тварин спостерігалось відторгнення клітин RMA-T або клітин RMA дикого типу, введених при подальших ін'єкціях онкогенних доз, що дає підставу припускати, що обробка лише одним NGT-TNF здатна індукувати протективний імунітет. Заслуговує уваги той факт, що збільшення дози TNF або NGT-TNF вище за 9-27мкг приводить до помітного збільшення токсичності та до зниження терапевтичної активності або до її відсутності.

Втрата маси після TNF-обробки є добре відомою ознакою системної токсичності [26]. Так, наприклад, для подальшого порівняння співвідношення ефективності/токсичності TNF і NGT-TNF, авторами був проведений моніторинг росту пухлини та маси тварин після обробки. Дія 1мкг NGT-TNF на ріст пухлини була аналогічною або перевищувала дію 9мкг TNF (Фіг.1а), а втрата маси за один-два дні після обробки була порівнянною з втратою маси після обробки 1мкг TNF (Фіг.1с). Після інтерполяції даних по логарифмічній кривій на графіку «доза-відповідь», авторами було виявлено, що терапевтичний ефект, який одержується при введенні 9мкг TNF на 14-й день, може бути досягнутий, принаймні, при введенні 0,6мкг NGT-TNF (Фіг.1b). На противагу цьому, для індукування порівнянної токсичної дії необхідно 8,5мкг (Фіг.1d). Таким чином, обчислене співвідношення ефективності/токсичності NGT-TNF за цих умов у 14 разів вище, ніж це співвідношення для TNF.

Аналогічні результати були одержані на моделі меланоми B16F1. Обробка 1мкг NGT-TNF на день 11 і на день 17 індукувала протипухлинну відповідь на день 19, яка перевищувала відповідь, одержану з використанням 4мкг TNF та була аналогічною відповіді, одержаній з використанням 12мкг TNF (дані не наводяться). На противагу цьому, втрата маси, викликана введенням 1мкг NGT-TNF, була помітно нижчою, ніж втрата маси, викликана введенням 4 і 12мкг TNF. Обробка

12мкг NGT-TNF давала навіть більш сильний протипухлинний ефект, а токсична дія була аналогічною токсичній дії, що спостерігається з використанням 12мкг TNF.

При введенні третьої ін'єкції на день 19, деякі тварини гинули через 1-2 дні у всіх групах (2 з 5 у групі, обробленій фізіологічним розчином і 12мкг NGT-TNF, і 1 з 5 в інших групах). Слід зазначити, що у однієї тварини, обробленої 12мкг NGT-TNF, спостерігалось повне відторгнення пухлини. При введенні цій тварині другої онкогенної дози клітин B16F1, через 18 днів розвивалася пухлина, що пальпується, а у контрольних тварин пухлина розвивалася за 6-7 днів.

Загалом, ці результати дають підставу припускати, що ефективність NGT-TNF відносно інгібування росту пухлини у 10-15 раз вище, ніж ефективність TNF, тоді як їх токсичності є аналогічними. Крім того, NGT-TNF може індукувати протективні імунні відповіді більш ефективно, ніж TNF.

#### Приклад IV

##### Механізм дії NGT-TNF

mAb проти мишачих CD13, R3-63, виділяли з асцитичних рідин за допомогою хроматографії на комплексі «білок G - сефароза» (Pharmacia-Upjohn, Uppsala, Sweden), та діалізували проти 0,9% хлориду натрію.

Кролячу поліклональну сироватку одержували від Primm srl (Milan, Italy) та очищали за допомогою афінної хроматографії на комплексі «білок A - сефароза» (Pharmacia-Upjohn). Пептиди CNGRC і CARAC одержували, як описано раніше [28].

Для підтвердження того факту, що підвищена активність NGT-TNF залежить від його доставки в пухлину за допомогою частини NGR, авторами були проведені дослідження для того, щоб визначити, чи може in vivo-активність NGT-TNF частково конкурувати з CNGRC. Для цього, мишам з пухлиною RMA-T вводили NGT-TNF (1мкг) разом з молярним надлишком CNGRC або без нього. Паралельно, інших тварин обробляли TNF (3 або 9мкг), і знову разом з CNGRC або без нього. Як і очікувалося, введення CNGRC приводило до значного зменшення протипухлинної активності NGT-TNF (Фіг.2а), але не TNF (Фіг.2b). На відміну від CNGRC, контрольний пептид (CARAC) був нездатний спричиняти значне зниження NGT-TNF-



активності (Fig.2c). Ці результати дозволяють припустити, що CNGRС конкурує з NGT-TNF за скріплення з рецептором CNGRС, підтверджують гіпотезу про механізм доставки, який сприяє збільшенню активності. Слід зазначити, що CNGRС не здатний до зниження *in vitro* цитотоксичної активності NGT-TNF (дані не наводяться).

Оскільки нещодавно повідомлялося, що амінопептидаза N(CD13) є рецептором для пептидів CNGRС, то авторами було проведено дослідження для того, щоб визначити, який внесок вносить даний рецептор у механізм доставки NGT-TNF. З цією метою, автори досліджували дію анти-CD13 антитіла (mAb) (R3-63) на протипухлинну активність NGT-TNF і TNF. mAb R3-63 значно інгібувало протипухлинну активність NGT-TNF (Fig.2a), але не TNF (Fig.2b), що вказувало на те, що CD13 дійсно грає вирішальну роль у протипухлинній активності NGT-TNF. При проведенні FACS-аналізу культивованих клітин з використанням mAb R3-63, ніякої експресії CD13 на поверхні клітин RMA-T не спостерігалось (дані не наводяться), що дозволяє припустити, що *in vivo* це антитіло розпізнавало інші клітини.

Хоча ці дані вказують на те, що CD13 є важливим рецептором для NGT-TNF, автори даного винаходу не могли повністю виключити той факт, що певний внесок у механізм доставки також вносить, хоч і в меншій мірі, скріплення з іншими ще не ідентифікованими NGR-рецепторами.

Попередні експерименти за частковим протеолізом показали, що зв'язок Arg-Ser у N-кінцевому сегменті TNF (залишки 2-3) дуже чутливий до трипсину, тоді як інша частина молекули є значно більш резистентною. Таким чином, для одержання додаткового підтвердження того факту, що підвищена активність NGT-TNF асоційована з його частиною NGR, авторами даного винаходу були зроблені спроби відщепити домен NGR від N-кінцевої області мутеїну шляхом часткового гідролізу іммобілізованим трипсином. Ця обробка приводила до перетворення NGT-TNF і TNF у молекулу, яка відповідає фрагменту TNF3-156 (очікувана маса 16986,2Да; див. Fig.3a для вимірної маси і передбачуваних послідовностей).

Хоча гідроліз не приводив до зниження *in vitro* цитолітичної активності NGT-TNF на клітинах L-M ( $2,3 \pm 1,4 \times 10^8$  од/мл), однак, його протипухлинна активність *in vivo* знижувалася до рівня TNF (Fig.3b). Слід зазначити, що токсичність NGT-TNF і TNF була аналогічною як до, так і після гідролізу, як було оцінено за втратою маси тваринами через один день після обробки (Fig.3b, права панель), що дозволяє припустити, що механізм NCR-залежної доставки не впливає на токсичність.

#### Приклад V

Одержання і характеристика людського TNF і NGT-TNF

Людський рекомбінантний TNF і NGT-TNF (що складається з людського TNF1-157, приєднаного до C-кінця CNGRС) одержували методами рекомбінантних ДНК та очищали, в основному, як описано вище для мишачого TNF і NGT-TNF. кДНК, що кодує NGT-TNF людини, одержували за допомогою ПЛР на плазміді pET11b/hTNF, що містить

hTNF-кодуючу послідовність [33] з використанням наступних праймерів:

NGR-hTNF/1 (смысловий): 5' A TAT CAT ATG TGC AAC GGC GGT TGC GGC GTC AGA TCA TCdT TCT CG 3';

NGR-hTNF/2 (антисмысловий): 5' TCA GGA TCC TCA CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC 3'.

Ампліфікований фрагмент гідролізували та клонували у pET11b (NdeI/BamHI) і використовували для трансформації клітин *E.coli* BL21(DE3) (Novagen). Експресію NGT-hTNF індукували ізопропіл-β-D-тіогалактозидом відповідно до інструкцій виробників pET11b. Розчинний NGT-TNF виділяли з дволітрових культур шляхом обробки бактерій ультразвуком у 2М етилендіамінтетраоцтовій кислоті, 20М Трис-НСІ, рН 8,0, з подальшим центрифугуванням (15000×g, 20хв., 4°C).

Екстракт змішували з сульфатом амонію (35% насичення), залишали на 1 год. при 4°C, а потім центрифугували як описано вище. Сульфат амонію у супернатантах доводили до 65%-ного насичення, залишали на 24 год. при 4°C, а потім центрифугували. Кожний осад розчиняли в 1М сульфаті амонію, 50М Трис-НСІ, рН 8,0, і очищали гідрофобною хроматографією на фенілсефарозі 6 Fast Flow (Pharmacia-Upjohn) (градієнтне елюювання, буфер А: 100М фосфат натрію, рН 8,0, що містить 1М сульфат амонію; буфер В: 70% етиленгліколь, 5% метанол, 100М фосфат натрію, рН 8,0). Фракції, що містять hTNF-імунореактивний матеріал (як було визначено за допомогою ELISA), об'єднували, діалізували проти 20М Трис-НСІ, рН 8,0, а потім очищали іонообмінною хроматографією на DEAE-сефарозі Fast Flow (Pharmacia-Upjohn) (градієнтне елюювання, буфер А: 20М Трис-НСІ, рН 8,0; буфер В: 1М хлорид натрію, 20М Трис-НСІ, рН 8,0). Усі розчини, що використовуються у хроматографічних стадіях, одержували з використанням стерильної води, яка не містить ендотоксинів (Salf, Bergamo, Italy).

На цій стадії, з дволітрових культур виділяли 30мг TNF і 32мг NGT-TNF. Електрофорез у нередуковуючому ПААГ з ДСН виявив смуги, які відповідають мономерам, димерам і тримерам, що дало підставу припустити, що людський NGT-TNF також являє собою суміш тримерів з "правильними" дисульфідами всередині ланцюга і тримерів з одним або декількома дисульфідними містками між ланцюгами (Fig.4A, доріжка b), як це спостерігалось для мишачого NGT-TNF.

Тримери з «правильними» дисульфідними містками всередині ланцюга були виділені з цієї суміші чотирьохстадійним способом денатурації-повторного укладання, проведеним таким чином: очищений людський NGT-TNF денатурували 7М сечовиною і піддавали гел-фільтрації на колонці з сефакрилом S-300 HR (1025мл) (Pharmacia), заздалегідь урівноваженої 7М сечовиною, 100М Трис-НСІ, рН 8,0. Фракції, які відповідають мономерному TNF, об'єднували, піддавали ультрафільтрації через 10кДа-мембрану YM MWCO (Amicon) і піддавали повторному укладанню шляхом діалізу проти 33 об'ємів 2,33М сечовини, 100М Трис-НСІ, рН 8, при 4°C (140хв), а потім проти 1,55М сечови-

ни, 100мМ Трис-НСІ, рН 8 (140хв) і 1М сечовини, 100мМ Трис-НСІ, рН 8 (140хв). І нарешті, продукт діалізували проти 80 об'ємів 100мМ Трис-НСІ (16год.), центрифугували при 13000×g (30хв), фільтрували через 0,45мкм-мембрану SFCA (Nalgene) і піддавали гель-фільтрації на колонці з сефакрилом S-300 HR (1020мл), заздалегідь урівноваженої 0,15М хлориду натрію, 0,05М фосфату натрію (PBS). Було виділено приблизно 23мг продукту з повторним укладанням.

Після проведення електрофорезу у нередукуючому ПААГ з ДСН (Фіг.4а, доріжка с), кінцевий продукт був, в основному, мономерним, мав гідродинамічний об'єм, аналогічний об'єму тримерного людського TNF, як було визначено за допомогою аналітичної гель-ВЕРХ на колонці з супердексом 75 HR (дані не наводяться) і мав молекулярну масу 17937,8+1,8Да (очікувану для CNGRСG-TNF1-157, 17939,4Да), як було визначено за допомогою мас-спектрометрії шляхом електронапилення. Цитолітичні активності *in vitro* не підданого і підданого повторному укладанню NGT-TNF на мишачих клітинах L-M становили  $(6,11 \times 10^7) + 4,9$  і  $(5,09 \times 10^7) + 0,3$  одиниць/мг, відповідно, тоді як активність очищеного людського TNF становила  $(5,45 \times 10^7) + 3,1$  одиниць/мг. Ці результати дають підставу припустити, що процес денатурації-повторного укладання не впливає на взаємодію людського NGT-TNF з мишачим рецептором р55.

Протипухлинна *in vivo*-активність 1мкг людського NGT-TNF (без повторного укладання) була більшою, ніж активність 10мкг TNF (Фіг.4В), тоді як токсичність, оцінена за втратою маси тварини, була значно нижчою (Фіг.4С). Після повторного укладання, 0,3мкг NGT-TNF було досить для індукування більш сильного протипухлинного ефекту, ніж це досягалося з використанням 10мкг TNF (Фіг.4В, 4Е).

Ці результати показали, що протипухлинна активність людського NGT-TNF перевищує активність людського TNF.

Крім того, автори спостерігали, що повторно укладений людський і мишачий NGT-TNF можуть індукувати значні протипухлинні ефекти у мишей, які несуть RMA-T, навіть при дуже низьких дозах (1-10нг/миша) при відсутності токсичної дії, тоді як TNF не здатний індукувати значні ефекти при вказаних дозах (дані не наводяться).

#### Приклад VI

Одержання і характеристика мишей з NGT-IFN $\gamma$

Рекомбінантний мишачий інтерферон (IFN) $\gamma$ , злитий з CNGRСG (NGT-IFN $\gamma$ ), одержували методами рекомбінантних ДНК, в основному, як описано для NGT-TNF. Домен CNGRС був приєднаний до С-кінця IFN $\gamma$ . Крім того, цистеїн у положенні 134 був замінений серином, а метіонін був введений у положення -1 для експресії у клітинах E.coli. Для продукування кДНК NGT-IFN $\gamma$  використовували ПЛР-праймери: 5' А ТАТ СТА САТ АТГ САС GGC АСА GTC АТТ GAA FGC С (значеннєвий) і 5' TC GGA TCC TCA GCA ACG GCC GTT GCA GCC GGA GCG ACT CCT TTT CCG CTT CCT GAG GC. кДНК клонували у рЕТ-11b (NdeI/BamHI) і використовували для трансформації клітин E.coli

BL21(DE3) (Novagen). Експресію білка індукували ізопропіл- $\beta$ -D-тіогалактозидом відповідно до інструкцій виробників рЕТ11b. Продукт очищали з екстрактів E.coli імуноафінною хроматографією з використанням антитіла mAb проти мишачих IFN $\gamma$  (AN 18), іммобілізованого на агарозі у відповідності до стандартних процедур. Електрофорез кінцевого продукту у редукуючому та у нередукуючому ПААГ з ДСН виявив одну смугу 16кДа. Мас-спектрометрія шляхом електронапилення виявила молекулярну масу 16223+3,6Да (передбачувана маса 1625,5Да), що відповідає мишачому Met-IFN $\gamma$ 1-134(C134S)CNGRC(NGT-IFN $\gamma$ ).

Здатність NGT-IFN $\gamma$  і NGT-TNF конкурувати з антитілом проти CD13 за скріплення з пухлинно-асоційованими судинами досліджували імуногістохімічним методом.

Свіжі хірургічні зразки карциноми клітин нирок людини одержували з Відділення гістопатології Науково-дослідного інституту у Рафаелі. Одержували зрізи (товщиною 5-6мкм) фіксованих буїном (4-6год.) і залитих у парафін зразків та адсорбували на предметних скельцях, покритих полілізином. Антигенний CD13 детектували методом з використанням комплексу «авідин-біотин», як описано нижче: тканинні зрізи регідратували з використанням ксиліту і серії високосортних спиртів відповідно до стандартних процедур. Тканинні зрізи вміщували у посудину, яка містить 1мМ EDTA, і кип'ятили протягом 7 хвилин у мікрохвильовій печі (1000Ват). Потім посудину повторно заповнювали 1мМ EDTA і знову кип'ятили протягом п'яти хвилин. Тканинні зрізи залишали для охолодження та інкубували у PBS, що містить 0,3% пероксид водню протягом 15 хвилин для нейтралізації ендогенної пероксидази. Потім зразки промивали PBS та інкубували з 100-200мкл PBS-BSA (1год. при кімнатній температурі), а потім з mAb W15 (проти hCD13), взятим окремо або в суміші з різними конкуруючими агентами (див. таблицю 2) у PBS-BSA (протягом ночі при 4°C). Предметні скельця промивали три рази PBS (3 хвилини кожне) та інкубували з PBS-BSA, що містить 2% нормальну кінську сироватку (PBS-BSA-NHS) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) протягом 5 хвилин. Потім розчин замінювали 3мкг/мл біотинільованого кінського антитіла проти мишачих IgG (H+L) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) у PBS-BSA-NHS і знову інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Предметні скельця знову промивали та інкубували протягом 30 хвилин з реагентом Vectastatin Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA), розведеним 1:100 у PBS. Потім таблетку 3,3'-діаміно-бензидин-тетрагідрохлориду (Merck, Darmstadt, Germany) розчиняли у 10мл деіонізованої води, яка містить 0,03% пероксиду водню, фільтрували через 0,2мкм-мембрану, та наносили на тканинні зрізи протягом 5-10хв. Предметні скельця промивали як описано вище та піддавали контрастному фарбуванню гематоксиліном Харріса. Пухлинно-асоційовані судини були ідентифіковані за фарбуванням зрізів тканини анти-CD31 антитілом mAb (mab JC/70A, антитіло проти людських CD13, IgG1 від DAKO, Copenhagen, Denmark).

Результати систематизовані у Таблиці 2. Як показано у таблиці, скріплення WM15 з пухлинно-

асоційованими судинами інгібувалось надлишком NGT-TNF, NGT-IFN $\gamma$  і CNGRC, але не іншими контрольними реагентами, в яких був відсутній мотив NGR. Це дає підставу припускати, що сайт скріплення NGR на CD13 стерично перекривається з епітопом WM15. На противагу цьому, NGT-TNF був нездатний конкурувати з 13C03 за скріплення з епітеліальними клітинами.

Авторами даного винаходу був зроблений висновок, що NGR-частина NGT-IFN $\gamma$  і NGT-TNF може взаємодіяти з формою CD13, яка розпізнається mAb WM15 на пухлинноасоційованих судинах. Крім того, ці результати показали, що мотив CNGRC є функціональним при його приєднанні як до N-кінця, так і до C-кінця цитокіну.

Таблиця 2

Скріплення WM15 зі зрізами раку нирок у присутності різних конкурентів

Конкурент	Скріплення WM15 з пухлинноасоційованими судинами
відсутній	+
NGT-TNF (25мкг/мл)	-
NGT-IFN $\gamma$ (50мкг/мл)	-
CNGRC (100мкг/мл)	-
TNF (25мкг/мл)	+
Альбумін людської сироватки (25мкг/мл)	+
Синтетичний CgA (60-68) (100мкг/мл)	+

<sup>A</sup>Конкурент, у PBS, що містить 2% BSA, додавали на стадії блокування і змішували з «першим» антитілом.

<sup>B</sup>mAb WM15 (проти люд. CD13, IgG1) одержували від Pharmingen (San Diego, CA);

Синтетичний пептид CgA (60-68) відповідає фрагменту 60-68 хромограніну А.

#### Приклад VII

Направлена доставка біотинільованого NGT-TNF до пухлин з використанням антипухлинних антитіл та авідину (попередня доставка)

У нижченаведеному прикладі проілюстрована можливість «подвійної» доставки TNF, яка базується на комбінації антипухлинного антитіла, що самонацілюється, та пептиду CNGRC.

Кон'югат «біотин-NGR-TNF» одержували шляхом змішування NGT-TNP з N-гідроксисукцинімідоефіром D-біотиніл-6-амінокапронової кислоти (Societa Prodotti Antibiotici S.p.A, Milan, Italy) у 1М натрій-карбонатному буфері, рН 6,8 (3год. при кімнатній температурі) [21]. Реакцію блокували 1М Трис-HCl, рН 7,5.

Кон'югат характеризували за допомогою мас-спектрометрії і було виявлено, що він містив 1 біотин/тример (в середньому). Потім мишам C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Italy) у лівий бік підшкірно (s.c.) ін'єктували  $5 \times 10^4$  живих клітин RMA-T. Коли площа пухлини досягала 40мм<sup>2</sup>, мишам послідовно вводили ін'єкції біотинільованого антитіла, авідину та біотин-TNF відповідно до «триденного» протоколу, описаного раніше [26]. Було ін'єктовано: 40мкг біотин-mAb19E12 (i.p., стадія I); 60мкг авідину та 60мкг стрептавідину через 18 і 19год., відповідно (i.p., стадія II); і 3мкг біотин-NGT-TNF, через 24год. (i.p., стадія III). Кожну сполуку розводили стерильним 0,9%-ним розчином хлориду натрію. У контрольному експерименті, авідин та стрептавідин не використовували. Кожний експеримент здійснювали з використанням 5 мишей на групу. Моніторинг пухлини проводили щодня шляхом вимірювання розміру пухлини за допомогою штангенциркуля. У групі, обробленій mAb 19E12-біотин/авідин/стрептавідин/біотин-NGT-TNF (5 тварин, середнє+середнє кв.пох.), площі

пухлин за 10 днів до обробки і через 10 днів після обробки становили  $39 \pm 4$ мм<sup>2</sup> та  $8 \pm 5$ мм<sup>2</sup>, відповідно. У контрольній групі (обробленій mAb тільки 19E12-біотин/біотин-NGT-TNF), площі пухлин за 10 днів до обробки і через 10 днів після обробки становили  $40 \pm 4$ мм<sup>2</sup> та  $20 \pm 6$ мм<sup>2</sup>, відповідно, що вказувало на те, що попередня доставка з використанням антипухлинного антитіла, що самонацілюється, та авідину приводила до збільшення активності NGT-TNF.

#### Бібліографія

1. Carswell, E. A., et al., An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1975.72:3666-70.
2. Helson, L., et al., Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells. Nature 1975. 258:731-732.
3. Tracey, K. J., and A. Cerami. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. Ann. Rev. Cell Biol. 1993. 9:317-43.
4. Hoogenboom, H. R., et al., Construction and expression of antibodytumor necrosis factor fusion proteins. Mol. Immunol. 1991. 28:1027-37.
5. Loetscher, H., et al., Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75kDa TNF receptors. J. Biol. Chem. 1993. 268:26350-7.
6. Yang, J., et al., A genetically engineered single-chain FV/TNF molecule possesses the anti-tumor immunoreactivity of FV as well as the cytotoxic activity of tumor necrosis factor. Mol. Immunol. 1995. 32:873-81.
7. Van Ostade, X., et al., Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. Nature 1993. 361:266-9.
8. Paganelli, G., et al., Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigenpositive patients. Cancer Res. 1991. 51:5960-6.

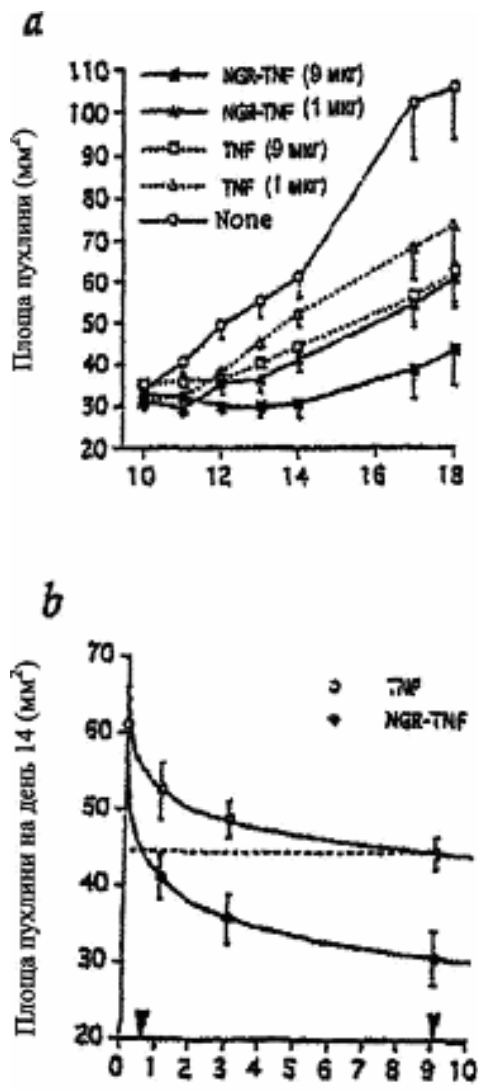
9. Paganelli, G., et al., Clinical application of the avidin-biotin system for tumor targeting. In D. Goldenberg (Ed. Cancer therapy with radiolabeled antibodies. CRC Press, Boca Raton, 1995. P. 239-253.
10. Modorati, G., et al., Immunoscintigraphy with three step monoclonal pretargeting technique in diagnosis of uveal melanoma: preliminary results. *Br. J. Ophthalmol.* 1994. 78:19-23.
11. Colombo, P., et al., Immunoscintigraphy with anti-chromogranin A antibodies in patients with endocrine/neuroendocrine tumors. *J. Endocr. Invest.* 1993. 16:841-3.
12. Debs, R. J., et al., Liposome-associated tumor necrosis factor retains bioactivity in the presence of neutralizing anti-tumor necrosis factor antibodies. *J. Immunol.* 1989. 143:1192-7.
13. Debs, R. J., et al., Immunomodulatory and toxic effects of free and liposome-encapsulated tumor necrosis factor alpha in rats. *Cancer Res.* 1990. 50:375-80.
14. Moro, M., et al., Tumor cell targeting with antibody-avidin complexes and biotinylated tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res.* 1997. 57:1922-8.
15. Schraffordt Koops, et al., Hyperthermic isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan as treatment of locally advanced or recurrent soft tissue sarcomas of the extremities. *Radiotherapy & Oncology* 1998.48:1-4.
16. Lienard, D., et al., In transit metastases of malignant melanoma treated by high dose rTNF alpha in combination with interferon-gamma and melphalan in isolation perfusion. *World Journal of Surgery* 1992.16:234-40.
17. Hill, S., et al., Low-dose tumor necrosis factor alpha and melphalan in hyperthermic isolated limb perfusion. *Br. J. Surg.* 1993. 80:995-7.
18. Eggemont, A. M., et al., Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. *Ann. Surg.* 1996. 224:756-65.
19. Mizuguchi, H., et al., Tumor necrosis factor alpha-mediated tumor regression by the in vivo transfer of genes into the artery that leads to tumor. *Cancer Res.* 1998. 58:5725-30.
20. Pennica, D., et al., Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1985.82:6060-4.
21. Corti, A., et al., Tumor targeting with biotinylated tumor necrosis factor alpha: Structure activity

- relationships and mechanism of action on avidin pretargeted tumor cells. *Cancer Res.* 1998. 58:3866-3872.
22. Corti, A., et al., Up-regulation of p75 Tumor Necrosis Factor alpha receptor in *Mycobacterium avium*-infected mice. *Infect. Immun.* 1999, 67:5762-5767.
23. Corti, A., et al., Tumor necrosis factor (TNF) alpha quantification by ELISA and bioassay: effects of TNF alpha-soluble TNF receptor (p55) complex dissociation during assay incubations. *J. Immunol. Meth.* 1994. 177:191-198.
24. Ljunggren, H. G., and K. Karre. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 1985. 162:1745-59.
25. Celik, C, et al., Demonstration of immunogenicity with the poorly immunogenic B16 melanoma. *Cancer Res.* 1983.43:3507-10.
26. Gasparri, A., et al., Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of biotinylated tumor necrosis factor alpha in mouse models. *Cancer Res.* 1999. 59:2917-23.
27. Palladino, M. A., Jr., et al., Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. *J. Immunol.* 1987. 138:4023-32.
28. Arap, W., et al., Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998. 279:377-80.
29. Fiers, W. Biologic therapy with TNF: preclinical studies. In V. De Vita, S. Hellman, and S. Rosenberg (Eds). *Biologic therapy of cancer: principles and practice.* J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1995. P. 295-327.
30. Rathjen, D. A., et al., 1992. Selective enhancement of the tumour necrotic activity of TNF alpha with monoclonal antibody. *Brit. J. Cancer* 65:852.
31. Robert, B., et al., 1996. Cytokine targeting in tumors using a bispecific antibody directed against carcinoembryonic antigen and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res.* 56:4758.
32. Fraker, D.L., Alexander, H.R. & Pass, H.I., 1995. Biologic therapy with TNF: systemic administration and isolation-perfusion. In *Biologic therapy of cancer: principles and practice*, De Vita, V., Hellman, S. & Rosenberg, S. (eds) pp. 329-345. J.B. Lippincott Company: Philadelphia.
33. Pennica, D., et al., 1984. Human tumor necrosis factor: precursor, structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 321, 724-729.

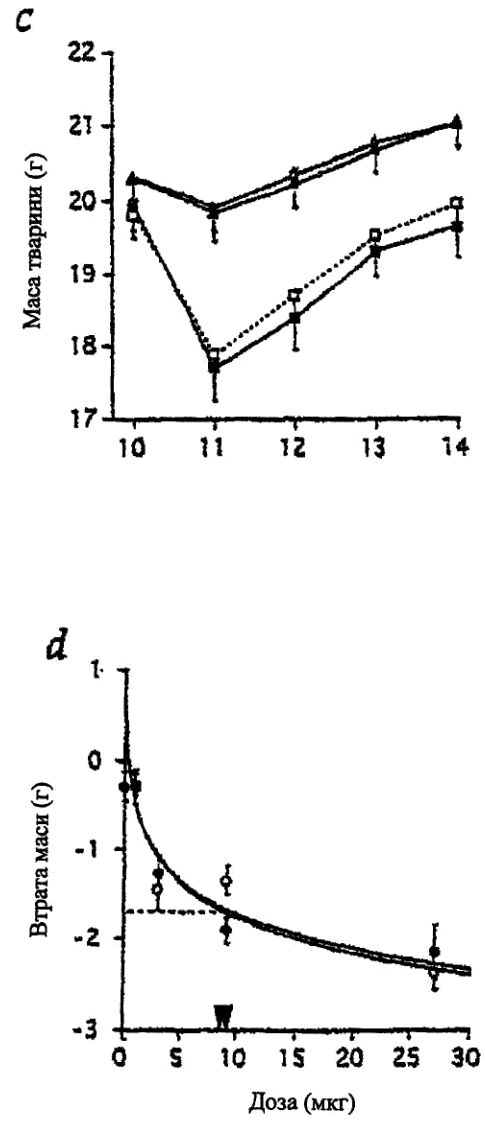
## Список последовательностей

<110> Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor  
 <120> Модифіковані цитокіни для використання у протираковій терапії  
 <130> modcyt  
 <140>  
 <141>  
 <160> 7  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: ПЛР-праймер  
 <400> 1  
 ctggatcctc acagagcaat gactcctaag 30  
 <210> 2  
 <211> 29  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: ПЛР-праймер  
 <400> 2  
 tgccctacat atgctcagat catcttctc 29  
 <210> 3  
 <211> 46  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: ПЛР-праймер  
 <400> 3  
 gcagatcata tgtgcaacgg ccgttgccgc ctcagatcat cttctc 46

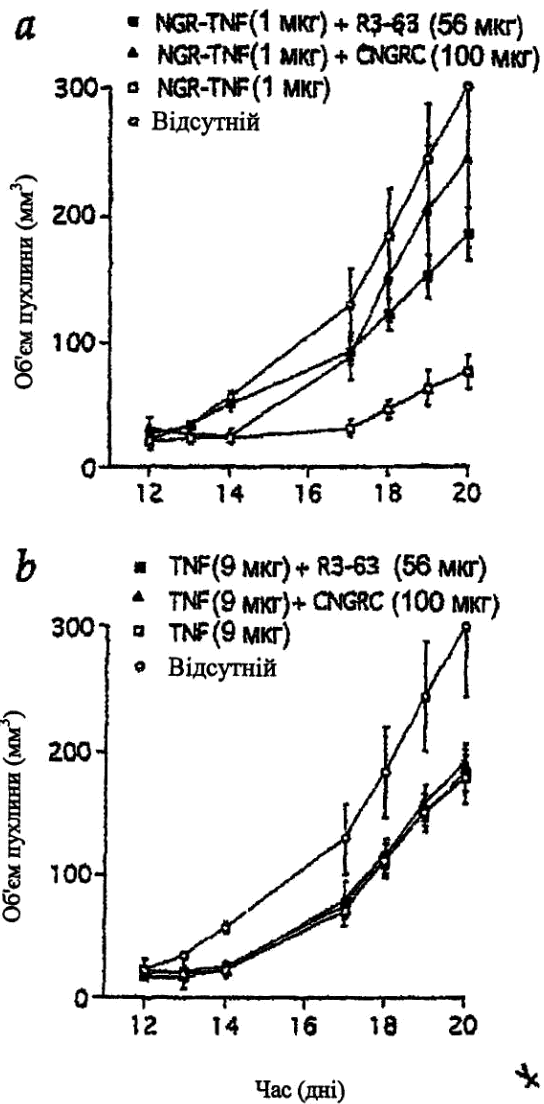
27	85365	28
<210> 4		
<211> 45		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Опис штучної послідовності: ПЛР-праймер		
<400> 4		
atatcatatg tgcaacggcc gttgcggcgt cagatcatct		45
<210> 5		
<211> 36		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Опис штучної послідовності: ПЛР-праймер		
<400> 5		
tcaggatcct cacaggga tgatccaaa gtagac		36
<210> 6		
<211> 35		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Опис штучної послідовності: ПЛР-праймер		
<400> 6		
atatctacat atgcacggca cagtcattga aagcc		
<210> 7		
<211> 58		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Опис штучної послідовності: ПЛР-праймер		
<400> 7		
tcggatctc agcaacggcc gttgcagccg gagegactcc tttccgctt cttgaggc		58



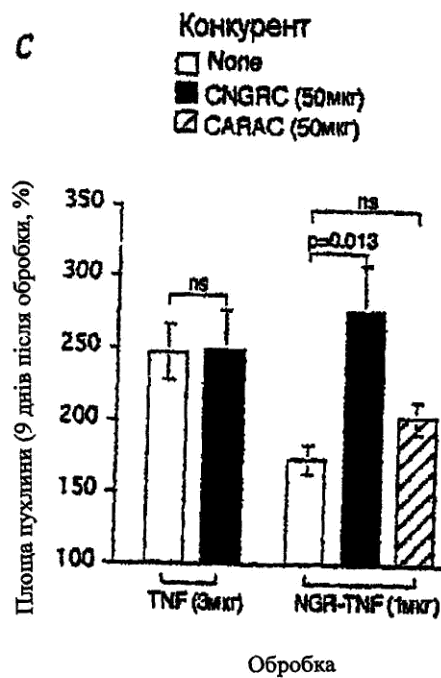
Фиг. 1



Фиг. 1



Фіг. 2



Фіг. 2



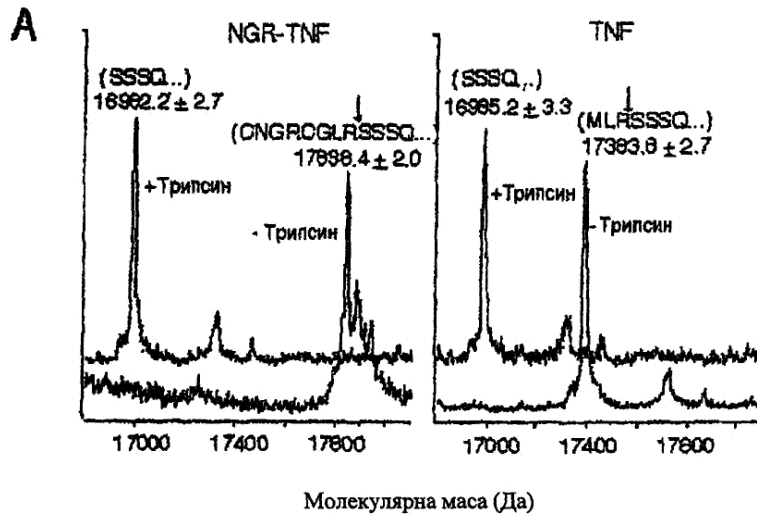


Fig. 3

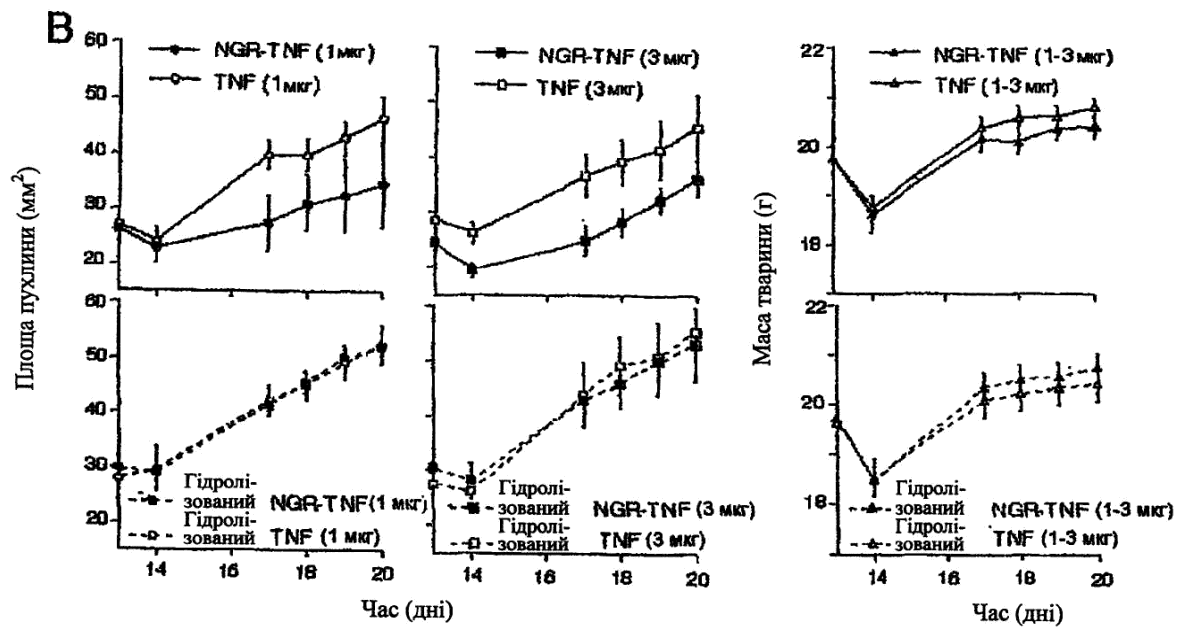
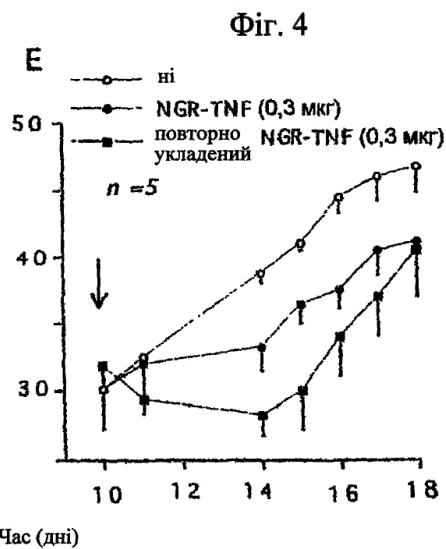
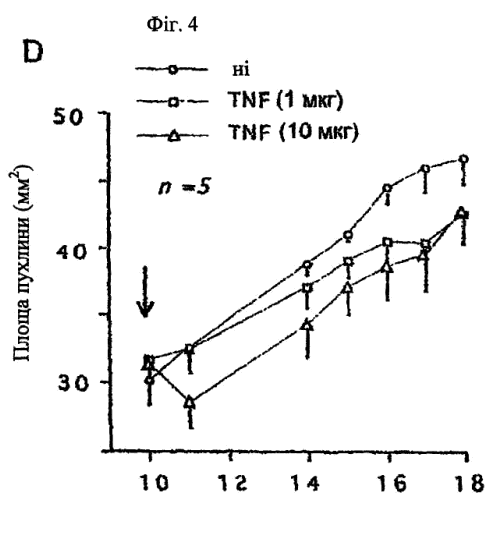
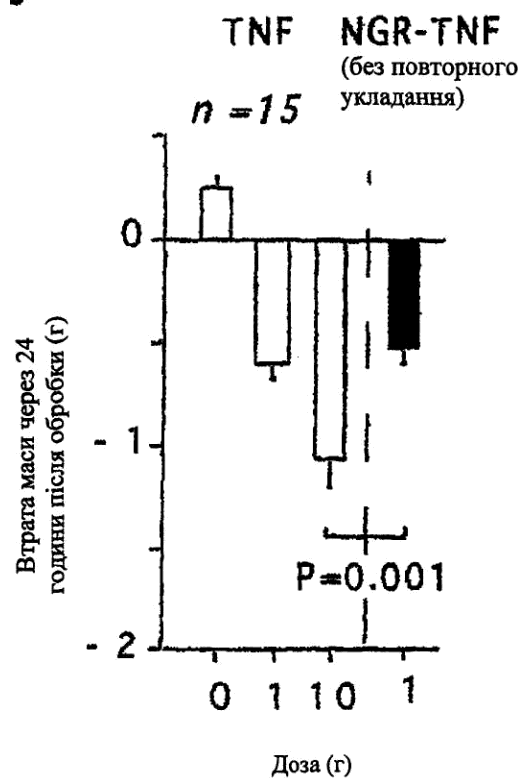
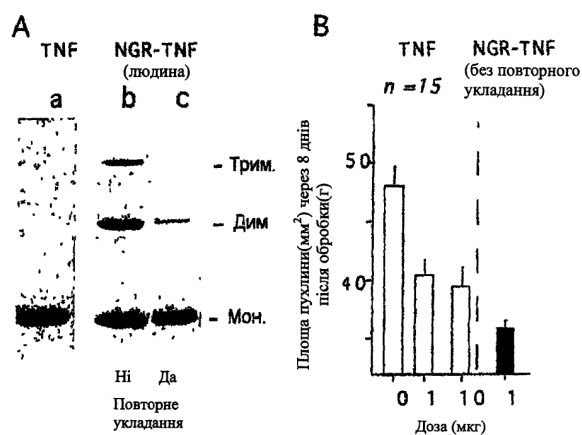


Fig. 3



Фіг. 4