

Даний винахід відноситься до області імунології і проліферативних захворювань, таких як злоякісна пухлина. Зокрема, він відноситься до композицій і способів їх використання, де вказані композиції включають суперантигени, модифіковані для зменшення серореактивності.

Суперантигени (SAg) являють собою групу бактерійних і вірусних білків, які надзвичайно ефективні для активації великої частини Т-клітинної популяції. Суперантигени безпосередньо зв'язуються з головним комплексом гістосумісності (MHC) без процесування. Фактично, суперантигени зв'язуються з непроцесованою зовнішньою антигензв'язувальною борозенкою молекул MHC класу II, уникаючи тим самим великої частини поліморфізму в звичайному пептидзв'язувальному сайті. Механізм зв'язування залежить від суперантигена, який зв'язується з Т-клітинним рецептором (TCR) в $\nu\beta$ -ланцюгу, замість зв'язування з гіперваріабельними петлями Т-клітинного рецептору (TCR).

Стафілококовий ентеротоксин (SE) являють собою гомологічну, за структурою і функцією, групу суперантигенів [Parageorgiou і співавт., 2000]. Відомо, що вони є основною причиною харчового отруєння і токсичного шоку у людей.

На основі SAg розроблений новий спосіб протипухлинної терапії для ад'ювантного лікування солідних пухлин. У ньому використовуються обидві основних ланки імунної системи, завдяки включенню Fab-ділянки пухлинноспецифічного моноклонального антитіла і SAg, що активує Т-клітини, в одному рекомбінантному злитому білку. Fab-SAg-білки, що зв'язалися з клітинами пухлини, можуть ініціювати знищення клітин даної пухлини цитотоксичними SAg-активованими Т-клітинами безпосередньо за допомогою суперантигенної антитілозалежної клітинопосередкованої цитотоксичності, SADCC. Крім того, активовані Т-клітини продукують знищувальні пухлинні клітини і прозапалювальні цитокіни, які дозволяють подолати проблеми, пов'язані, відповідно, з гетерогенністю злоякісної пухлини і високомолекулярним поглинанням.

Протипухлинні лікарські агенти, основані на суперантигені, надавали деяку сприятливу дію, однак, одна з клінічних проблем, яку потрібно розглянути, полягає в активації системної імунної системи. Злиття білків з SEA дикого типу вивчали при клінічних випробуваннях пацієнтів зі злоякісною пухлиною прямої кишки і підшлункової залози [Afraugh і співавт., 1998]. Хоча були одержані подальші результати, але відмічені і обмеження. По-перше, даний продукт виявився досить токсичним. По-друге, антитіла проти суперантигенів, що утворилися раніше у пацієнтів, роблять дозування складним. Крім того, даний продукт був імуногенним. Тому повторні цикли терапії можливі лише для обмеженого числа пацієнтів.

До появи даного винаходу лікування із застосуванням SAg було дозволімованим. Даний винахід є першим, в якому модифікація суперантигену приводить до зниження серореактивності при збереженні активності суперантигену; таким чином, даний винахід є новим і задовольняє вимозі неочевидності.

Вищевикладене досить широко змальовує особливості і технічні переваги даного винаходу, щоб краще зрозуміти нижченаведений докладний опис даного винаходу. Додаткові особливості і переваги даного винаходу описуються нижче, які складають предмет формули винаходу даного винаходу. Фахівцям в даній області техніки повинно бути зрозумілим, що концепцію і розкриття конкретного варіанту можна легко використати як основу для модифікації або створення інших конструкцій для досягнення тих же цілей даного винаходу. Фахівцям в даній області техніки повинно бути зрозумілим, що такі еквівалентні конструкції не вийдуть за рамки суті і об'єму даного винаходу, сформульованої в прикладеній формулі винаходу. Нові ознаки, які, як вважають, характерні для даного винаходу, що стосується його складання і способу використання, нарівні з цілями і перевагами, виявляться в більшій мірі очевидними, виходячи з нижченаведеного опису при розгляді його разом з прикладеними малюнками. Разом з тим, потрібно ясно розуміти, що кожний з малюнків, представлений виключно з ілюстративною і описовою метою, не треба розглядати як обмежувачі рамками даний винахід.

У даному винаході створений кон'югат, що включає бактерійний суперантиген і антитільний компонент, в якому суперантиген являє собою суперантиген з низьким титром, що включає ділянки А-Е, причому ділянка А являє собою TCR-зв'язуючий сайт, а ділянки В-Е визначають зв'язування з молекулами MHC класу II; і ДНК-послідовність, що кодує даний суперантиген, є зміненою таким чином, що в А-ділянці не більше 15 амінокислотних залишків є заміщеними на інші амінокислоти так, що змінений суперантиген володіє зниженою серореактивністю в порівнянні з суперантигеном, з якого він одержаний; і в якому вказаний антитільний компонент являє собою повнорозмірне антитіло або будь-який інший зв'язуючий молекулу активний фрагмент антитіла, які націлені проти структури на поверхні клітини, асоційованої зі злоякісною пухлиною. Приклади суперантигенів включають, але не обмежуються вказаним, стафілококовий ентеротоксин (SE), екзотоксин *Streptococcus pyogenes* (SPE), токсин *Staphylococcus aureus*, що викликає токсичний шоківий синдром (TSST-1), стрептококовий мітогенний екзотоксин (SME) і стрептококовий суперантиген (SSA). У конкретних варіантах здійснення даного винаходу стафілококовий ентеротоксин являє собою стафілококовий ентеротоксин А (SEA) або стафілококовий ентеротоксин Е (SEE).

У конкретних варіантах здійснення даного винаходу положення заміних амінокислотних залишків в ділянці А вибирають з групи, що складається з позицій 20, 21, 24, 27, 173 і 204. Передбачається також, що ділянка С може включати заміни не більше 15 амінокислотних залишків. Ці заміни можуть відбуватися в позиціях амінокислотних залишків 79, 81, 83 і 84. Крім того, ділянка Е може включати заміни не більше 15 амінокислотних залишків, в якій заміни можуть відбуватися по амінокислотному залишку в положенні 227.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу створений кон'югат, що включає бактерійний суперантиген і антитільний компонент, в якому вказаний суперантиген являє собою суперантиген з низьким титром, що включає ділянки А-Е, причому ділянка А являє собою TCR-зв'язуючий сайт, а ділянки В-Е визначають зв'язування з молекулами MHC класу II; і амінокислотна послідовність даного суперантигену є заміщеною таким чином, що в ділянці В не більше 15 амінокислотних залишків є заміщеними іншими амінокислотами так, що заміщений суперантиген володіє зниженою серореактивністю в порівнянні з суперантигеном, з якого він одержаний; і в якому антитільний компонент являє собою повнорозмірне антитіло або будь-який інший зв'язуючий молекулу активний фрагмент антитіла, які націлені проти структури на поверхні клітини, асоційованої зі злоякісною пухлиною. Зокрема, позиції амінокислотних залишків, що замінюються в ділянці В,

можна вибрати з групи, що складається з позицій 34, 35, 39, 40, 41, 42, 44, 45 і 49.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу створений кон'югат, що включає бактерійний суперантиген і антигільний компонент, в якому вказаний суперантиген являє собою суперантиген з низьким титром, що включає ділянки А-Е, причому ділянка А являє собою TCR-зв'язуючий сайт, а ділянки В-Е визначають зв'язування з молекулами МНС класу II; і амінокислотна послідовність суперантигену є заміщеною таким чином, що в ділянці С не більше 15 амінокислотних залишків є заміщеними іншими амінокислотами так, що одержаний заміщений суперантиген володіє зниженою серореактивністю в порівнянні з суперантигеном, з якого він одержаний; і в якому вказаний антигільний компонент являє собою повнорозмірне антитіло або будь-який інший зв'язуючий молекулу активний фрагмент антитіла, яке націлене проти структури на поверхні клітини, асоційованої зі злоякісною пухлиною. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу дана злоякісна пухлина вибрана з групи, що складається із злоякісної пухлини легена, молочної залози, прямої кишки, нирки, підшлункової залози, яєчника, шлунка, шийки матки і передміхурової залози. Позиції амінокислотних залишків, що замінюються в ділянці С вибирають з групи, що складається з позицій 74, 75, 78, 79, 81, 83 і 84.

Приклади суперантигенів включають, але не обмежуються вказаним, стафілококовий ентеротоксин (SE), екзотоксин *Streptococcus pyogenes* (SPE), токсин *Staphylococcus aureus*, який викликає токсичний шок синдром (TSST-1), стрептококовий мітогенний екзотоксин (SME) і стрептококовий суперантиген (SSA). У конкретних варіантах здійснення даного винаходу стафілококовий ентеротоксин являє собою стафілококовий ентеротоксин А (SEA) або стафілококовий ентеротоксин Е (SEE).

У конкретних варіантах здійснення даного винаходу даний кон'югат може додатково включати в ділянці А заміни не більш ніж 15 амінокислотних залишків. Заміни в ділянці А можуть відбуватися в позиціях амінокислотних залишків 20, 21, 24, 27, 173 або 204. Крім того, даний кон'югат може включати в ділянці Е заміни не більш ніж 15 амінокислотних залишків. Зокрема, така заміна може відбуватися в ділянці Е в положенні амінокислотного залишку 227.

У додатковому конкретному варіанті здійснення даного винаходу даний кон'югат може включати амінокислотну послідовність SEE, що включає заміни R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K83S, K84S і D227S або амінокислотну послідовність SEE, що включає заміни R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K83S, K84S і D227A. Крім того, даний кон'югат може включати амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2.

У додаткових варіантах здійснення даного винаходу даний кон'югат може включати антигільний компонент, наприклад, але не обмежуючись вказаним, Fab-фрагмент. Специфічні Fab-фрагменти можуть включати C215Fab або 5T4Fab.

Далі, даний кон'югат може також включати цитокін, такий як інтерлейкін. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу інтерлейкін являє собою IL2 або його похідне, що володіє, по суті, такою ж біологічною активністю, що і нативний IL2.

Інший варіант здійснення даного винаходу включає кон'югат, що включає бактерійний суперантиген і антигільний компонент, в якому вказаний суперантиген являє собою суперантиген з низьким титром, що включає ділянки А-Е, причому ділянка А являє собою TCR-зв'язуючий сайт, а ділянки В-Е визначають зв'язування з молекулами МНС класу II; і амінокислотна послідовність даного суперантигену є заміщеною таким чином, що в ділянці D не більше 15 амінокислотних залишків є заміщеними іншими амінокислотами так, що даний заміщений суперантиген, в порівнянні з суперантигеном з якого він одержаний, володіє зниженою серореактивністю; і в якому даний антигільний компонент являє собою повнорозмірне антитіло або будь-який інший зв'язуючий молекулу активний фрагмент антитіла, які націлені проти структури на поверхні клітини, асоційованої зі злоякісною пухлиною. Позиції амінокислотних залишків, що замінюються в ділянці D вибрані з групи, що складається з позицій 187, 188, 189 і 190.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу створений кон'югат, що включає бактерійний суперантиген і антигільний компонент, в якому вказаний суперантиген являє собою суперантиген з низьким титром, що включає ділянки А-Е, причому ділянка А являє собою TCR-зв'язуючий сайт, а ділянки В-Е визначають зв'язування з молекулами МНС класу II; і амінокислотна послідовність даного суперантигену є заміщеною таким чином, що в ділянці Е не більше 15 амінокислот є заміщеними іншими амінокислотами так, що вказаний заміщений суперантиген володіє зниженою серореактивністю в порівнянні з суперантигеном з якого він одержаний; і в якому антигільний компонент являє собою повнорозмірне антитіло або будь-який інший зв'язуючий молекулу активний фрагмент антитіла, які націлені проти структури на поверхні клітини, асоційованої зі злоякісною пухлиною. У конкретних варіантах здійснення даного винаходу стафілококовий ентеротоксин являє собою стафілококовий ентеротоксин А (SEA) або стафілококовий ентеротоксин Е (SEE). Крім того, позиції амінокислотних залишків, що замінюються в ділянці Е вибирають з групи, що складається з позицій 217, 220, 222, 223, 225 і 227.

У конкретному варіанті здійснення даного винаходу кон'югат додатково включає заміни в ділянці А не більш ніж для 15 амінокислотних залишків. Зокрема, заміни в ділянці А можуть відбуватися по амінокислотних залишках в позиціях 20, 21, 24, 27, 173 і 204.

В іншому конкретному варіанті здійснення даного винаходу кон'югат додатково включає заміни не більш ніж 15 амінокислотних залишків в ділянці В, в якій заміни можуть відбуватися по амінокислотних залишках в позиціях 34, 35, 39, 40, 41, 42, 44, 45 і 49.

Ще в одному конкретному варіанті здійснення даного винаходу даний кон'югат може включати заміни не більш ніж 15 амінокислотних залишків в ділянці С. Зокрема, в ділянці С заміни відбуваються по амінокислотних залишках в позиціях 74, 75, 78, 79, 81, 83 і 84. Крім того, даний кон'югат може додатково включати заміни не більш ніж 15 амінокислотних залишків в ділянці D, в якій заміни можуть відбуватися по амінокислотних залишках в позиціях 187, 188, 189 і 190.

В іншому конкретному варіанті здійснення даного винаходу створена фармацевтична композиція, що включає терапевтично ефективну кількість кон'югату, який включає бактерійний суперантиген і антигільний компонент, де вказаний суперантиген являє собою суперантиген з низьким титром, що включає ділянки А-Е,

причому ділянка А являє собою TCR-зв'язуючий сайт, а ділянки В-Е визначають зв'язування з молекулами МНС класу II; і амінокислотна послідовність даного суперантигену є заміщеною таким чином, що не більше 15 амінокислотних залишків в ділянці С є заміщеними іншими амінокислотами так, що даний заміщений суперантиген володіє зниженою серореактивністю в порівнянні з суперантигеном, з якого він одержаний; і де антитільний компонент являє собою повнорозмірне антитіло або будь-який інший зв'язуючий молекулу активний фрагмент антитіла, які націлені проти структури на поверхні клітини, асоційованої зі злоякісною пухлиною. Зокрема, позиції амінокислотних залишків, що замінюються в ділянці С вибирають з групи, що складається з позицій 74, 75, 78, 79, 81, 83 і 84.

У додаткових варіантах здійснення даного винаходу дана фармацевтична композиція може включати кон'югат, що містить заміни не більш ніж 15 амінокислотних залишків в ділянці А, в якій заміни відбуваються по амінокислотних залишках в позиціях 20, 21, 24, 27, 173 і 204. Ще в одному додатковому варіанті здійснення даного винаходу фармацевтична композиція може також включати заміни не більш ніж 15 амінокислотних залишків в ділянці Е. Зокрема, заміна в ділянці Е може відбуватися по амінокислотному залишку в положенні 227.

В конкретних варіантах здійснення даного винаходу фармацевтична композиція може містити кон'югат, що включає амінокислотну послідовність SEE (SEQ ID NO: ID NO:7), а також додаткові заміни R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K83S, K84S і D227S.

В іншому конкретному варіанті здійснення даного винаходу фармацевтична композиція може включати амінокислотну послідовність SEE (SEQ ID NO: ID NO:7), а також додаткові заміни R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K83S, K84S і D227A. Ще в одному варіанті здійснення даного винаходу фармацевтична композиція включає кон'югат, який володіє амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:1.

У додаткових конкретних варіантах здійснення даного винаходу фармацевтична композиція включає антитільний компонент, наприклад, Fab-фрагмент. Зокрема, Fab-фрагмент являє собою C215Fab або 5T4Fab. Фармацевтична композиція може також включати цитокін, такий як інтерлейкін. Інтерлейкін може являти собою IL2 або його похідне, що володіє по суті тією ж біологічною активністю, що і нативний IL2.

Інший варіант здійснення даного винаходу включає спосіб лікування ссавця зі злоякісною пухлиною шляхом активації імунної системи вказаного ссавця, який передбачає введення вказаному ссавцеві терапевтично ефективної кількості кон'югату, який включає бактерійний суперантиген і антитільний компонент, де вказаний суперантиген являє собою суперантиген з низьким титром, що включає ділянки А-Е, причому ділянка А являє собою TCR-зв'язуючий сайт, а ділянки В-Е визначають зв'язування з молекулами МНС класу II; і амінокислотна послідовність суперантигену є заміщеною таким чином, що не більш ніж 15 амінокислотних залишків в ділянці С є заміщеними іншими амінокислотами так, що заміщений суперантиген володіє зниженою серореактивністю в порівнянні з суперантигеном, з якого він одержаний; де антитільний компонент являє собою повнорозмірне антитіло або будь-який інший зв'язуючий молекулу активний фрагмент антитіла, які націлені проти структури на поверхні клітини, асоційованої зі злоякісною пухлиною. Приклади злоякісної пухлини включають, але не обмежуються вказаним, злоякісну пухлину легень, молочної залози, прямої кишки, нирки, підшлункової залози, яєчника, шлунка, шийки матки і передміхурової залози. Зокрема, позиції амінокислотних залишків, що замінюються в ділянці С вибирають з групи, що складається з позицій 74, 75, 78, 79, 81, 83 і 84.

У додаткових варіантах здійснення даного винаходу ділянка А може також включати заміни не більш ніж 15 амінокислотних залишків, де заміни відбуваються по амінокислотних залишках в позиціях 20, 21, 24, 27, 173 і 204. Крім того, ділянка Е може додатково включати заміни не більш ніж 15 амінокислотних залишків. Зокрема, заміна в ділянці Е може відбуватися по амінокислотному залишку в положенні 227. Вказаний кон'югат може включати амінокислотну послідовність SEE (SEQ ID NO: ID NO:7), а також додаткові заміни R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K83S, K84S і D227A або заміни R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K84S і D227A. Ще в одному додатковому варіанті здійснення даного винаходу кон'югат має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1.

Нижченаведені рисунки становлять частину опису даного винаходу і включені для додаткової демонстрації деяких аспектів даного винаходу. Даний винахід можна краще зрозуміти шляхом звернення до одного або декількох з цих рисунків в поєднанні з докладним описом представлених тут конкретних варіантів здійснення даного винаходу.

На Фіг.1 представлені пептидні фрагменти, розпізнавані антитіла людини проти SEA, які ідентифікували в обробленому пепсином SEA/E-18, елюйованого з анти-SEA-колонки. Дані фрагменти ідентифікували перед і після виділення очищенням з використанням BEPX в оберненій фазі, суміщеної з мас-спектрометрією (MS). Фрагменти, що виявляються в даному гідролізаті, при одному і тому ж часі утримання до і після виділення очищенням по спорідненості, розглядалися як позитивні.

На Фіг.2 представлені сім різних ідентифікованих пептидів, відтворених у вигляді ліній вище амінокислотної послідовності SEA/E-120. Символи, відмічені ясно-сірою лінією, вказують на залишки, які були змінені в SEA/E-120, в порівнянні з SEA/E-18.

На Фіг.3 представлені вирівняні структурні послідовності SEA, SED і SHE, використані як матриці для побудови порівняльної комп'ютерної моделі SEA/E-18. Структурні консервативні ділянки відмічені за допомогою чорних рамок.

На Фіг.4 показане множинне вирівнювання послідовностей SEA, SEE, SEA/E-18 і SEA/E-120. Ділянки, показані у вигляді ліній над вирівнюванням, відповідають п'яти різним ділянкам А-Е, всередині яких мають місце всі заміни в SEA/E-120.

На Фіг.5 представлена модель (виділена чорним) SEA/E-18, накладена на SEA (1SXT, виділена сірим).

На Фіг.6 представлені ділянки SEA/E-18, які відповідають ідентифікованим серореактивним пептидам.

На Фіг.7 представлений сцинтиляційний аналіз близької відстані (SPA), який використали для вимірювання специфічного зв'язування міченого ¹²⁵I людського антитіла проти SEA, пов'язаного з C215FabSEA, C215FabSEA/E-18, -65, -97, -109, -110, -113 або -120, з анти-мишачим F(ab)₂, кон'югованим з

біотипом, на стрептавідинових PVT-кульках.

На Фіг.8А і Фіг.8В ілюструється здатність до опосередкування направленої на пухлину цитотоксичності. На Фіг.8А ілюструється цитотоксичність, яку вимірюють у відношенні суперантигену при аналізі антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності SADCC. На Фіг.8В показано, що ефективність суперантигенів опосередковувати Т-клітинне знищення клітин, які експресують МНС клас II приводить до системної цитотоксичності, яка могла б обумовити побічні ефекти, що вимірюються в аналізі суперантигензалежної клітинної цитотоксичності SDCC. Всі нові химери знижували їх дію в SDCC, щонайменше, на 1log і максимум на 3log, що стосується C215FabSEA/E-120.

На Фіг.9 представлена стрічкова діаграма моделі SEA/E-120. Бічні ланцюги залишків G20, T21, G24 і K27 помічені темно-сірим кольором, бічні ланцюги залишків S34, S39, S40, E41, K42, A44, T49, T74, A75, S78, E79, E81, S83 і S84 помічені сірим кольором, бічні ланцюги залишків T217, S220, T222, S223, S225 помічені чорним кольором, а бічний ланцюг залишку S227 помічений ясно-сірим кольором.

На Фіг.10 представлена амінокислотна послідовність 5T4FabSEA/E-120 (SEQ ID NO:1) з варіабельними частинами мишачого антитіла 5T4 і константними частинами мишачого антитіла C242. Позиції 1-458 відповідають ланцюгу А, а позиції 459-672 відповідають ланцюгу В.

Фахівцям в даній області техніки повинно бути очевидно, що в даному винаході, розкритому в даній заявці, можуть бути здійснені різні варіанти і модифікації, що не виходять за рамки суті і об'єму даного винаходу.

Позначення "а" або "an", що використовується тут, може означати одне або декілька. Слова "а" або "an", що використовуються тут в формулі винаходу, в поєднанні зі словом "що включає (comprising)", можуть означати один або більше ніж один. Слово "інший (another)", що використовується тут, може означати, принаймні, другий або декілька інших.

Термін "антитіло", що використовується тут, відноситься до імуноглобулінової молекули, яка здатна специфічно зв'язуватися зі специфічним епітопом на антигені. Мається на увазі, що антитіло, яке використовується тут, в широкому значенні, відноситься до будь-якого імунологічного зв'язуючого агента, такого як IgG, IgM, IgA, IgD і IgE. Антитіла можуть являти собою інтактні імуноглобуліни, одержані з природних джерел або з рекомбінантних джерел, і можуть являти собою імуоактивні частини інтактних імуноглобулінів. Антитіла в даному винаході можуть існувати в різноманітних формах, включаючи, наприклад, поліклональні антитіла, моноклональні антитіла, Fv, Fab і F(ab)₂, а також однокланцеві антитіла і гуманізовані антитіла [Harlow і співавт., 1988; Bird і співавт., 1988].

Термін "антиген", що використовується тут, визначений як молекула, яка викликає імунну відповідь. Ця імунна відповідь може спричиняти за собою утворення антитіл, активацію специфічних імунологічно компетентних клітин або і те і інше. Антиген можна одержати з організмів, білкових/антигенних субодиноць, убитих або інактивованих цілих клітин або лізатів. Тому, кваліфіковані фахівці розуміють, що будь-яка макромолекула, включаючи практично всі білки, може служити як антигени. Крім того, антигени можна одержувати з рекомбінантної ДНК.

Термін "злоякісна пухлина", що використовується тут, визначений як проліферативне захворювання або злоякісне новоутворення (пухлини). Приклади включають, але не обмежуються вказаним, злоякісну пухлину молочної залози, злоякісну пухлину передміхурової залози, злоякісну пухлину яєчника, злоякісну пухлину шийки матки, злоякісну пухлину шкіри, злоякісну пухлину підшлункової залози, злоякісну пухлину прямої кишки і злоякісну пухлину легенів.

Термін "кон'югат", що використовується тут, визначений як злитий білок з суперантигену або варіанту суперантигену, злитого або кон'югованого з антитілом або з фрагментом антитіла.

Термін "імуногенний" або "імуногенність", що використовуються тут, визначені як речовина або молекула, які викликають імунну відповідь.

Термін "головний комплекс гістосумісності", що використовується тут, або "МНС", визначений як специфічний кластер генів, багато які з яких кодують еволюційно родинні білки клітинної поверхні, що беруть участь в антигенній презентації, серед яких найбільш істотними є детермінанти гістосумісності. МНС класу I, або МНС-I, функціонують, головним чином, в антигенній презентації Т-лімфоцитів CD8. МНС класу II, МНС-II, функціонують, головним чином, в антигенній презентації Т-лімфоцитів CD4.

Термін "серореактивний", "серореакція" або "серореактивність", що використовується тут, визначений як реакція або дія, зумовлена сироваткою або сироватками. Фахівцям в даній області техніки зрозуміло, що сироватка або сироватки пацієнта або тварини містять нейтралізуючі антитіла або заздалегідь створені антитіла або ендогенні антитіла до різних антигенів або молекул. Таким чином, серореактивність відноситься до реакції нейтралізуючих антитіл в сироватці.

Термін "суперантиген", що використовується тут, визначений як клас молекул, які стимулюють підгрупу Т-клітин шляхом зв'язування з молекулами МНС класу II і v β -доменами Т-клітинних рецепторів, стимулюючи активацію Т-клітин, які експресують специфічні v β -сегменти V-гена.

Термін "Т-клітинний рецептор", що використовується тут, визначений як рецептор, який складається із з'єднаного дисульфідним зв'язком гетеродимеру з високоваріабельними α - або β -ланцюгами, який експресується в клітинній мембрані у вигляді комплексу з інваріантними CD3-ланцюгами. Т-клітини, які несуть цей тип рецептору, часто називають α : β -Т-клітинами. Альтернативний рецептор, що створюється з варіабельних γ - і δ -ланцюгів, експресує CD3 в підгрупі Т-клітин.

Термін "терапевтично ефективний", що використовується тут, визначений як кількість фармацевтичної композиції, яка ефективна в лікуванні захворювання або стану.

Термін "варіант" або "варіанти", що використовується тут, відноситься до білків або пептидів, які відрізняються, відповідно, від початкового білка або пептиду. Варіанти в цьому значенні описуються нижче і більш детально в іншому місці даного винаходу. Наприклад, зміни в нуклеотидній послідовності даного варіанту можуть бути такими, що мовчать, тобто, вони можуть не змінювати амінокислоти, які кодуються даною нуклеотидною послідовністю. Якщо зміни обмежуються змінами, що мовчать, цього типу, то варіант буде кодувати пептид з тією ж амінокислотою послідовністю, що і початковий пептид. Зміни в нуклеотидній

послідовності варіанту можуть змінювати амінокислотну послідовність пептиду, який кодується початковою нуклеотидною послідовністю. Такі зміни нуклеїнової кислоти можуть приводити до амінокислотних замін, додавань, делецій, злиттів і скорочень в пептиді, який кодується початковою послідовністю, як зазначено нижче. Взагалі, відмінності в амінокислотних послідовностях обмежуються так, що початкова і варіантна послідовності виявляються в результаті дуже схожими і ідентичними по багатьох ділянках. Амінокислотні послідовності варіантного і початкового пептидів можуть відрізнятися однією або декількома замінами, додаваннями, делеціями, злиттями і скороченнями, які можуть бути представлені в будь-якому поєднанні. Варіант може також являти собою фрагмент пептиду даного винаходу, який відрізняється від початкової пептидної послідовності, будучи більш коротким, ніж початкова послідовність, наприклад, в результаті кінцевої або внутрішньої делеції. Інший варіант пептиду даного винаходу включає також пептид, який зберігає по суті ту ж функцію або активність, що і початковий пептид. Варіант може також являти собою (i) варіант, в якому один або декілька амінокислотних залишків замінені консервативними або неконсервативними залишками, і такий замінений амінокислотний залишок може або може не бути таким, що кодується за допомогою генетичного коду, або (ii) варіант, в якому один або декілька амінокислотних залишків включають заміняючу групу, або (iii) варіант, в якому зрілий пептид зливається з іншою сполукою, такою, наприклад, як сполукою, яка збільшує час напівжиття пептиду (наприклад, поліетиленгліколь) або (iv) варіант, в якому додаткові амінокислоти зливаються зі зрілим пептидом, такі, наприклад, як лідерна або секреторна послідовність або послідовність, яка використовується для виділення очищенням зрілого пептиду. Варіанти можуть бути створені методами мутагенезу, в тому числі методами, що застосовуються для нуклеїнових кислот, амінокислот, клітин або організмів, або можуть бути створені рекомбінантними способами. Передбачається, що всі вказані вище варіанти такого роду не виходять за рамки, які приймаються фахівцями в даній області техніки, від представлених тут відмітних особливостей і від даної області техніки.

Термін "біологічна активність", що використовується тут, відноситься до внутрішньої властивості конкретної молекули, наприклад, до активації деяких клітин або до зв'язування з деякими рецепторами. Визначення, що використовується тут, початково є швидше якісним, ніж кількісним.

Модифікація суперантигенів

Даний винахід відноситься до модифікації суперантигенів шляхом зменшення їх імуногенності внаслідок зниження їх серореактивності. Фахівці в даній області техніки знають, що серореактивність відноситься до взаємодії молекул або антигенів з нейтралізуючими антитілами в сироватці. Зокрема, даний винахід відноситься до кон'югату, що включає бактерійний суперантиген і антитільну складову, в якому вказаний суперантиген являє собою суперантиген з низьким титром, що включає ділянки А-Е, причому ділянка А являє собою TCR-зв'язуючий сайт, а ділянки В-Е визначають зв'язування з молекулами МНС класу II; і амінокислотна послідовність вказаного суперантигену є заміщеною таким чином, що не більше 15 амінокислотних залишків в ділянці Е є заміщеними відмінними амінокислотами так, що заміщений суперантиген володіє зниженою серореактивністю в порівнянні з суперантигеном, з якого він одержаний; і в якому антитільна складова являє собою повнорозмірне антитіло або будь-який інший зв'язуючий молекулу активний фрагмент антитіла, які націлені проти структури на поверхні клітини, асоційованої зі злоякісною пухлиною.

А. Суперантигени

Бактерійні суперантигени, які розглядаються для використання в даному винаході, включають, але не обмежуються вказаним, стафілококовий ентеротоксин (SE), екзотоксин *Staphylococcus aureus* (SPE), токсин *Staphylococcus aureus*, що викликає токсичний шок (TSST-1), стрептококовий мітогенний екзотоксин (SME) і стрептококовий суперантиген (SSA). Фахівці в даній області техніки знають, що дані про тривимірну структуру вищеперелічених суперантигенів можна одержати в Банку Даних Білків (PDB, www.rcsb.org). Крім того, фахівці в даній області техніки можуть одержати нуклеотидні послідовності і амінокислотні послідовності перелічених вище суперантигенів і інших суперантигенів з GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>].

В конкретних варіантах здійснення даного винаходу суперантиген являє собою суперантиген з низьким титром. Фахівцям в даній області техніки відомо і очевидно, що сироватка людини звичайно містить високі титри антитіл проти суперантигенів. Наприклад, для стафілококових суперантигенів співвідношення титрів дає ряд TSST-1>SEB>SEC-1>SEC-2>SEA>SED>SEE. Фахівці в даній області знають, що ці співвідношення титрів відображають труднощі, пов'язані з імуногенністю, і труднощі, пов'язані з серореактивністю або труднощі, пов'язані з нейтралізуючими антитілами. Тому, в даному винаході розглядається використання суперантигену з низьким титром, такого як SEA або SEE, щоб виключити серореактивність суперантигену, що вводиться парентерально.

Далі, добре відомо і очевидно, що білкові послідовності і імунологічна перехресна реактивність суперантигенів або стафілококових ентеротоксинів діляться на дві родинні групи. Одна група складається з SEA, SEE, SED і SHE. У другу групу входять SPEA, SEC, SEB і SSA. Тому, в даному винаході розглядається також використання суперантигенів з низьким титром для зменшення або виключення з даного винаходу перехресної реактивності антитіл з високим титром або ендогенних антитіл проти стафілококових ентеротоксинів.

В. Варіанти суперантигенів

Варіанти амінокислотної послідовності суперантигенних білків можуть являти собою заміщені, вбудовані або делеційні варіанти. Ці варіанти можна виділити очищенням відомими способами, такими як осадження (наприклад, сульфатом амонію), ВЕРХ (HPLC), іонообмінна хроматографія, афінна хроматографія (в тому числі, імуноафінна хроматографія) або різного виду розділення по розміру (седиментація, гель-електрофорез, гель-фільтрація).

Варіанти заміщення або заміщені варіанти містять, як правило, заміну однієї амінокислоти на іншу по одному або декільком сайтам в рамках даного білка. Заміни можуть бути консервативними, тобто, одна амінокислота замінюється іншою схожої форми і заряду. Консервативні заміни добре відомі в даній області

техніки і включають, наприклад, наступні заміни: аланін на серин; аргінін на лізин; аспарагін на глутамін або гістидин; аспартат на глутамат; цистеїн на серин; глутамін на аспарагін; глутамат на аспартат; гліцин на пролін; гістидин на аспарагін або глутамін; ізолейцин на лейцин або валін; лейцин на валін або ізолейцин; лізин на аргінін; метіонін на лейцин або ізолейцин; фенілаланін на тирозин, лейцин або метіонін; серин на треонін; треонін на серин; триптофан на тирозин; тирозин на триптофан або фенілаланін; і валін на ізолейцин або лейцин.

Тому заявники вважають, що в ДНК-послідовностях генів можна здійснити різні зміни без істотної втрати біологічної цінності або активності даних білків, що і розглядається нижче. Активність, яка індукує Т-клітинну відповідь, має наслідком цитотоксичність для клітин злоякісної пухлини. І ще, спорідненість суперантигену і молекул MHC класу II зменшують з мінімальними ефектами цитотоксичність суперантигену.

При створенні таких змін розглядають гідропатичний індекс амінокислот. Значущість гідропатичного амінокислотного індексу в наданні інтерактивної біологічної функції білку, загалом, в даній області техніки ясна [Kyte and Doolittle, 1982]. Прийнято вважати, що відносна гідропатична характеристика амінокислоти визначає вторинну структуру результуючого білка, яка, в свою чергу, визначає взаємодію білка з іншими молекулами, наприклад, з ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антитілами, антигенами і т.п.

Кожній амінокислоті приписаний гідропатичний індекс, виходячи з характеристик їх гідрофобності і заряду [Kyte and Doolittle, 1982]: ізолейцин (+4,5); валін (+4,2); лейцин (+3,8); фенілаланін (+2,8); цистеїн/цистин (+2,5); метіонін (+1,9); аланін (+1,8); гліцин (-0,4); треонін (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролін (-1,6); гістидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамін (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагін (-3,5); лізин (-3,9); і аргінін (-4,5).

У даній області техніки відомо, що певні амінокислоти можуть бути заміщені іншими амінокислотами, що володіють подібним гідропатичним індексом або показником, і, проте, одержати білок з аналогічною біологічною активністю, тобто, одержати все ж біологічно функціональний еквівалентний білок. Для створення таких змін, заміщення амінокислот, гідропатичні індекси яких знаходяться в межах ± 2 , є переважним, заміщення амінокислот, гідропатичні індекси яких знаходяться в межах ± 1 , є особливо переважними, а заміщення амінокислот, гідропатичні індекси яких знаходяться в межах $\pm 0,5$, є найбільш переважним.

Очевидно також, що заміщення подібних амінокислот можна ефективно здійснити, виходячи з їх гідрофільності. У патенті США №4554101, включеному тут шляхом посилання, вказується, що найбільша локальна середня гідрофільність білка, яка регулюється гідрофільністю його амінокислот, які йдуть одна за одною, корелює з біологічною характеристикою даного білка. У патенті США №4554101 детально викладені номінальні величини гідрофільності наступних амінокислотних залишків: аргінін (+3,0); лізин (3,0); аспартат (+3,0 \pm 1); глутамат (+3,0 \pm 1); серин (+0,3); аспарагін (+0,2); глутамін (+0,2); гліцин (0); треонін (-0,4); пролін (-0,5 \pm 1); аланін (-0,5); гістидин (-0,5); цистеїн (-1,0); метіонін (-1,3); валін (-1,5); лейцин (-1,8); ізолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенілаланін (-2,5); триптофан (-3,4).

Очевидно, що амінокислоту можна замінити іншою, яка володіє схожою величиною гідрофільності і все ж одержати біологічно еквівалентний і імунологічний еквівалентний білок. При таких змінах, заміна амінокислот, величини гідрофільності яких коливаються в межах ± 2 , є переважною, заміна амінокислот, величини гідрофільності яких коливаються в межах ± 1 , є особливо переважною, а в межах $\pm 0,5$ - є найбільш переважною.

C. Злиті білки

Спеціалізований вид інсерційного варіанту являє собою злитий білок. Його молекула є цілою нативною білковою молекулою або її істотною частиною, приєднаною по N- або C-кінцю до цілого другого поліпептиду або до його частини. Наприклад, злитий білок даного винаходу включає приєднання імунологічно активного домену, такого як фрагмент антитіла, для націлювання специфічних клітин пухлини.

Крім того, включення сайту розщеплення по місцю злиття, або поблизу нього, полегшує видалення стороннього поліпептиду після виділення очищенням. Інше корисне злиття включає приєднання функціональних доменів, таких як активні сайти ферментів, домени глікозилювання, інші клітинно-мішенуючі сигнали або трансмембранні ділянки.

D. Доменне перемикання

Шляхом заміщення гомологічних ділянок різних білків можна створити ряд цікавих варіантів. Для деяких випадків це відоме як "доменне перемикання".

Доменне перемикання спричиняє утворення химерних молекул з використанням різних, але, в цьому випадку, родинних поліпептидів. При порівнянні різноманітних SAg-білків можна передбачити, наскільки функціонально значущі ділянки цих молекул. Далі, уявляється можливим перемикати родинні домени в цих молекулах в спробі визначити критичність цих ділянок для SAg-функції. Дані молекули можуть володіти додатковою цінністю в тому, що ці "химери" можна відрізнити від молекул, які зустрічаються в природі, незважаючи на можливе придбання тієї ж функції.

E. Виділення білків очищенням

Уявляється бажаним виділити очищенням SAg або його варіанти. Методи виділення білків очищенням добре відомі фахівцям в даній області техніки. Ці методи включають, на першому рівні, грубе фракціонування клітинного вмісту на пептидні і непептидні фракції. Після відділення даного білка від інших білків, білок, який представляє інтерес, можна піддати подальшому виділенню очищенням з використанням хроматографічних і електрофоретичних методів для досягнення часткового або повного очищення (або очищення до гомогенності). Аналітичні способи, особливо придатні для одержання чистого пептиду, являють собою іонообмінну хроматографію, ексклюзійну хроматографію; електрофорез в поліакриламідному гелі; ізоелектрофокусування. Особливо ефективним способом виділення пептидів очищенням є швидка рідинна хроматографія білків або навіть ВЕРХ.

Деякі аспекти даного винаходу стосуються виділення очищенням і, в конкретних варіантах здійснення даного винаходу, суттєвого виділення очищенням білка, що кодується, або пептиду. Мається на увазі, що термін, який використовується тут, "виділений очищенням білок або пептид" відноситься до будь-якої композиції, відокремлюваної від інших компонентів, в якій даний білок або пептид виділений очищенням до

будь-якої міри, відносно його природно одержуваного стану. Тому, виділений очищенням білок або пептид відноситься також до білка або пептиду, вільного від навколишнього середовища, в якому він виникає природним чином.

Як правило, термін "виділений очищенням" відноситься до білкової або пептидної композиції, підданої фракціонуванню для видалення різних інших компонентів, і склад якої практично зберігає свою виражену біологічну активність. Якщо використовується термін "по суті очищений", то це позначення повинно відноситися до композиції, в якій даний білок або пептид утворює головний компонент даної композиції, складаючи, наприклад, близько 50%, близько 60%, близько 70%, близько 80%, близько 90%, близько 95%, або більше від білків даної композиції.

Фахівцям в даній області техніки, в світлі даного опису, повинні бути відомі різні способи кількісного визначення міри виділення очищенням білка або пептиду. Вони включають, наприклад, визначення специфічної активності активної фракції, або оцінку кількості поліпептидів у фракції за допомогою SDS/PAGE-аналізу. Переважний спосіб оцінки міри очищення фракції полягає в обчисленні специфічної активності фракції, для порівняння її зі специфічною активністю первинного екстракту, і в обчисленні, таким чином, міри очищення в ній за допомогою "показника кратності очищення". Зрозуміло, що реальні одиниці, що використовуються для відображення величини активності, повинні залежати від конкретного методу аналізу, вибраного для того, щоб іти за очищенням і від того, чи виявляє експресований білок або пептид детектовану активність.

Фахівцям в даній області техніки повинні бути добре відомі різні методики, придатні для використання їх в очищенні білка. Вони включають, наприклад, осадження за допомогою сульфату амонію, PEG, антитіл і т.п., або шляхом теплової денатурації з подальшим центрифугуванням; хроматографічні стадії, такі як іонообмінна хроматографія, хроматографія гелів-фільтрацією, хроматографія в оберненій фазі, хроматографія на гідроксилапатиті, і афінна хроматографія; ізоелектричне фокусування; гелевий електрофорез; і поєднання подібних і інших методів. У даній області техніки прийнято, що порядок здійснення різних стадій виділення очищення можна міняти, або, що деякі стадії можна відкинути, і все ж мати можливість відповідним способом одержати по суті очищений білок або пептид.

Відомо, що міграція поліпептиду в різних умовах SDS/PAGE може змінюватися, іноді значно [Capaldi і співавт., 1977]. Тому потрібно мати на увазі, що у відмінних умовах електрофорезу середня молекулярна маса очищених або частково очищених експресованих продуктів може мінятися.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) характеризується дуже швидким розділенням і надзвичайним розрізненням піків. Це досягається завдяки використанню наддрібноподрібнених часток і високому тиску для підтримки адекватної швидкості потоку. Розділення можна здійснити дуже швидко, за лічені хвилини, або якнайдовше за 1 годину. Крім того, необхідний лише малий об'єм зразка, оскільки вказані частки так малі і так щільно упаковані, що вільний об'єм становить дуже маленьку частину чистого об'єму речовини. Далі, потрібна не дуже велика концентрація зразка, що аналізується, тому що хроматографічні смуги настільки вузькі, що існує дуже невелике розведення даного зразка.

Гель-хроматографія або "молекулярно-ситова" хроматографія являє собою спеціальний вид розподільної хроматографії, яка оснований на розмірі молекул. Теорія, яка лежить в основі гель-хроматографії, полягає в тому, що колонка, яку заповнюють найдрібнішими частками інертної речовини, що містять маленькі пори, відділяє великі молекули від більш маленьких, оскільки вони проходять через або навколо пор, в залежності від їх розміру. Оскільки матеріал, з якого виготовлені частки, не адсорбує дані молекули, то єдиним фактором, що визначає швидкість потоку, є їх розмір. Тому, молекули елюються з даної колонки із зменшенням розміру, оскільки їх форма залишається відносно константною. Гель-хроматографія є неперевершеною для розділення молекул різного розміру тому, що розділення не залежить від всіх інших чинників, таких як рН, іонна сила, температура і т.д. Крім того, практично відсутня адсорбція, менше зональне розширення, а об'єм елювання прямо пов'язаний з молекулярною масою.

Афінна хроматографія являє собою хроматографічну процедуру, яка залежить від специфічної спорідненості між речовиною, яку виділяють, і молекулою, яка може специфічно зв'язуватися з нею. Це відповідає взаємодії типу рецептор-ліганд. Матеріал колонки синтезується внаслідок ковалентного зв'язування одного з партнерів, що зв'язуються з нерозчинною матрицею. Потім матеріал колонки здатний специфічно адсорбувати шукану речовину з даного розчину. Елюція відбувається шляхом зміни умов на умови, при яких не буде відбуватися зв'язування (зміна рН, іонної сили, температури і т.д.).

Г. Мутагенез варіантів

Даний винахід передбачає, що модифікація спорідненості суперантигену до молекул МНС класу II може зменшувати токсичність даного суперантигену. Отже, зменшена спорідненість до молекул МНС класу II приведе до зменшення серореактивності або зменшення взаємодії з нейтралізуючими антитілами або ендогенними, або заздалегідь сформованими антитілами.

У конкретних варіантах здійснення даного винаходу мутагенез потрібно використовувати для модифікації ділянки суперантигену, яка визначає зв'язування з молекулами МНС класу II. Мутагенез потрібно здійснювати за допомогою різноманітних стандартних мутагенних методик. Мутація являє собою процес, відповідно до якого в організмі відбуваються кількісні або структурні зміни. Мутація може включати модифікацію нуклеотидної послідовності єдиного гена, блока генів або цілої хромосоми. Зміни в одиночних генах можуть бути наслідком точкових мутацій, які включають видалення, додання або заміну основи єдиного нуклеотиду в ДНК-послідовності, або вони можуть бути наслідком змін, що включають вставку або делецію великого числа нуклеотидів.

Одним з самих успішних методів мутагенезу є аланіновий скануючий мутагенез, при якому ряд залишків індивідуально замінюється амінокислотою аланіном так, що можна визначити ефекти від втрати взаємодій, пов'язаних з бічним ланцюгом, при мінімізації ризику порушень в конформації білка [Cunningham і співавт., 1989].

За останні роки розроблені методи оцінки константи рівноваги лігандного зв'язування з використанням

дуже маленьких кількостей білка [Патенти США №5221605 і 5238808]. Здатність здійснювати функціональні аналізи з невеликою кількістю матеріалу можна використати для створення високоефективних *in vitro*-методів насичуючого мутагенезу антитіл. Заявники обходили стадії клонування, поєднуючи ПЛР-мутагенез з об'єднаною *in vitro* транскрипцією/трансляцією для високоефективного створення білкових мутантів. При цьому одержані ПЛР-продукти використовують безпосередньо у вигляді матриці для транскрипції/трансляції *in vitro* мутантних одоланцюгових антитіл. Через високу ефективність, з якою можна одержати і проаналізувати таким шляхом всі 19 амінокислотних замінів, уявляється можливим здійснити насичуючий мутагенез по численних представляючих інтерес залишках, процес який можна описати, або сканування *in vitro* насичуючого мутагенезу [Burks і співавт., 1997].

In vitro-сканування насичуючого мутагенезу створює швидкий спосіб одержання великої кількості структурно-функціональної інформації, що включає: (i) ідентифікацію залишків, які модулюють лігандзв'язуючу специфічність, (ii) краще осмислення лігандного зв'язування на основі ідентифікації тих амінокислот, які зберігають активність, і тих, які скасовують активність по даному місцеположенню, (iii) оцінку загальної пластичності активного сайту або білкового субдомену, (iv) ідентифікацію амінокислотних замінів, які підвищують зв'язування.

Структурно-направлений сайт-специфічний мутагенез являє собою потужний інструмент для аналізу і конструювання взаємодій білок-ліганд [Wells, 1996, Braisted і співавт., 1996]. Даний метод розроблений для одержання і тестування варіантів послідовностей шляхом введення однієї або декількох змін в нуклеотидну послідовність вибраної ДНК.

Сайт-специфічний мутагенез використовує специфічні олігонуклеотидні послідовності, які кодують задану мутацію в певній ДНК-послідовності, а також достатню кількість примикаючих, немодифікованих нуклеотидів. Таким шляхом створюється достатнього розміру і складності праймерна послідовність для утворення стабільного дуплекса по обох сторонах переміщуваного делеційного стику. Переважний праймер довжиною близько 17-25 нуклеотидів і, приблизно, 5-10 залишками по обох сторонах стику в даній змінній послідовності.

У даному методі використовують, як правило, бактеріофаговий вектор, який існує як в одоланцюговій, так і в дволанцюговій формі. Вектори, що використовуються в сайт-направленому мутагенезі, включають такі вектори як фаг M13. Ці фагові вектори комерційно доступні і їх використання, взагалі, добре відомо фахівцям в даній області техніки. Дволанцюгові плазміди також регулярно використовуються в сайт-направленому мутагенезі, що виключає стадію перенесення гена, який цікавить, з фагу в плазміді.

У загальних рисах, спочатку одержують одоланцюговий вектор, або плавлять два ланцюги дволанцюгового вектора, який включає, в рамках своєї послідовності, ДНК-послідовність, що кодує необхідний білок або генетичний елемент. Синтетично одержують олігонуклеотидний праймер, який несе необхідну мутантну послідовність, після чого випаляють його разом з одоланцюговим ДНК-препаратом, враховуючи міру невідповідності при виборі умов гібридизації. Для завершення синтезу ланцюга, несучого мутацію, одержаний гібридизаційний продукт піддають дії ДНК-полімеризуючих ферментів, таких як полімераза I *E.coli* (фрагмент Кленова). Таким чином, утворюється гетеродуплекс, в якому один ланцюг кодує початкову немутантну послідовність, а другий ланцюг несе необхідну мутацію. Потім цей гетеродуплексний вектор використовують для трансформації відповідних клітин-мішеней, таких як клітини *E.coli*, і відбирають клони, які включають рекомінантні вектори, які несуть конструкцію мутантної послідовності.

Вичерпну інформацію про функціональну значущість і зміст інформації даного залишку можна одержати найкращим чином з допомогою насичуючого мутагенезу, в якому аналізуються всі 19 амінокислотних замінів. Недолік даного підходу полягає в тому, що математична логіка аналізу по багатьох залишках при насичуючому мутагенезі відлякує [Warren і співавт., 1996, Brown і співавт., 1996; Zeng і співавт., 1996; Burton and Barbas, 1994; Yelton і співавт., 1995; Jackson і співавт., 1995; Short і співавт., 1995; Wong і співавт., 1996; Hilton і співавт., 1996]. Необхідно дослідити сотні, а можливо навіть тисячі сайт-специфічних мутантів. Проте, вдосконалені методи роблять одержання і швидкий скринінг мутантів набагато більш простими. Дивіться також патенти США №5798208 і 5830650, для опису "прогонного" ("walk-through") мутагенезу.

Інші методи сайт-направленого мутагенезу розкриті в патентах США №520007; 5284760; 5354670; 5366878; 5389514; 5635377 і 5789166.

Крім біологічних функціональних еквівалентів, які одержують з використанням вищезгаданих методів мутагенезу, автори даного винаходу вважають також, що можуть бути створені структурно схожі сполуки, які імітують ключові частини суперантигену або кон'югату даного винаходу. Такі сполуки, які можна назвати пептидоміметиками, можна використати таким же чином, що і кон'югати даного винаходу, і вони, отже, також є функціональними еквівалентами. Деякі міметики, які імітують елементи вторинної і третинної структури білка, описані у Johnson і співавт. (1993). Причина, яка лежить в основі використання пептидних міметиків, полягає в тому, що основний пептидний ланцюг білків існує, переважно, для орієнтування амінокислотних бічних ланцюгів таким чином, щоб сприяти молекулярній взаємодії, такій, наприклад, як взаємодія антитіла і/або антигену. Отже, пептидний міметик створюється для того, щоб зробити можливими молекулярні взаємодії, властиві природній молекулі.

Декілька успішних застосувань ідеї про пептидний міметик зосереджено на міметиках β -витків в білках, які, як відомо, високоантигенні. Вірогідну β -виткову структуру в поліпептиді можна передбачити за допомогою комп'ютерних алгоритмів, що і розглядається тут. Після того як визначені амінокислоти, що складають даний виток, можна створювати міметики, щоб досягти схожої просторової орієнтації істотних елементів бічних амінокислотних ланцюгів.

Інші підходи зосереджені на використанні невеликих білків з множиною дисульфідних зв'язків як привабливі структурні матриці для одержання біологічно активних конформацій, які імітують зв'язуючі сайти великих білків, Vita і співавт. (1998). Структурний мотив, який в деяких токсинах виглядає еволюційно консервативним, є невеликим (30-40 амінокислот), стабільним і дуже рекомендованим для мутації. Даний мотив складається з бета-складки і альфа-спіралі, з'єднаних містком у внутрішній корі за допомогою трьох

дисульфідів.

Бета-II-витки вдало імітували з використанням циклічних L-пентапептидів і циклічних пентапептидів з D-амінокислотами (Weisshoff і співавт., 1999). Крім того, Johanhesson і співавт. (1999) повідомляють про біциклічні трипептиди з властивостями, що індують зворотний виток.

У даній області техніки розкриті способи створення специфічних структур. Наприклад, міметики альфа-спіралі розкриті в патентах США №№5446128; 5710245; 5840833; і 5859184. Ці структури додають даному пептиду або білку більше термостабільності, а також збільшують резистентність до протеолітичної деградації. Описані шести-, семи-, одинадцяти-, дванадцяти-, тринадцяти- і чотирнадцятичленні кільцеві структури.

Способи створення конформаційно обмежених бета-витків і бета-горбів описані, наприклад, в патентах США №№5440013; 5618914 і 5670155. Бета-витки дозволяють змінюватися бічним замісникам, без змін у відповідній скелетній конформації і володіють відповідними кінцями для включення в пептиди за допомогою стандартних методів синтезу. Інші види витків міметиків включають зворотні і гамма-витки. Міметики із зворотними витками розкриті в патентах США №№5475085 і 5929237, а міметики з гамма-витками описані в патентах США №№5672681 і 5674976.

G. Експресія суперантигенів

Даний винахід включає також використання експресійних векторів і клітин-хазяїв. Ці експресійні вектори, які були створені генноінженерним способом, і містять нуклеотидну послідовність кон'югатів, вводять або трансформують в клітини-хазяї для одержання кон'югатів даного винаходу.

Клітини-хазяї можна створити біотехнологічно, щоб ввести в них нуклеотидні послідовності і експресувати пептиди даного винаходу. Введення нуклеотидних послідовностей в клітину-хазяїна можна здійснити з допомогою трансфекції кальцієм-фосфатом, трансфекції, опосередкованої DEAE-декстраном, трансфекції, мікроін'єкції, катіонної ліпід опосередкованої трансфекції, електропорації, трансдукції, зіскобу (scrape loading), бомбардування мікрочастинками, інфікуванням або іншими способами. Такі способи описані в багатьох типових лабораторних керівництвах, таких як Davis, і співавт., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY [Основні методи молекулярної біології], (1986) і Sambrook, і співавт., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Типові приклади відповідних клітин-хазяїв включають бактерійні клітини, такі як стрептококи, стафілококи, E.coli, стрептоміцети і клітини Bacillus subtilis; клітини грибів, такі як дріжджові клітини і клітини з роду Aspergillus, клітини комах, такі як клітини Drosophila 52 і Spodoptera Sf9; клітини тварин, такі як CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293 і клітини меланому Bowes.

Лікування злоякісних пухлин

У даному винаході суперантиген кон'югують з антитілом або з фрагментом антитіла для націлювання і руйнування клітин злоякісної пухлини. Приклади злоякісних пухлин включають, але не обмежуються вказаним, злоякісну пухлину легень, молочних залоз, прямої кишки, нирок, підшлункової залози, яєчника, шлунка, шийки матки і передміхурової залози.

В одному аспекті даного винаходу злоякісна клітина повинна нести деякий маркер, який піддається націлюванню, тобто, він не представлений в більшості інших клітин. Існує безліч пухлинних маркерів і будь-який з них може виявитися придатним для націлювання в контексті даного винаходу. Специфічні мішені даного винаходу включають антитіла. Антитіла, які розглядаються в даному винаході, включають, але не обмежуються вказаним, Fab-фрагмент. Приклади Fab-фрагмента включають C215Fab або 5T4Fab. Крім Fab, інші загальні пухлинні маркери включають карциномембріональний антиген, специфічний для передміхурової залози антиген, асоційований зі злоякісною пухлиною сечової системи антиген, фетальний антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, сіалілантисген Л'юїса, MucA, MucB, FLAP, рецептор естрогену, рецептор ламініну, erb B і p155.

Іншим аспектом даного винаходу є використання імуностимулюючої молекули як агента або, більш переважно, разом з іншим агентом, таким, наприклад, як цитокіни, такі, наприклад, як IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, фактор некрозу пухлини; інтерферони альфа, бета, і гамма; F42K і інші аналоги цитокінів; хемокін, такий, наприклад, як MIP-1, MIP-1бета, MCP-1, RANTES, IL-8; або фактор росту, такий, наприклад, як FLT3-ліганд. Дана стимулююча молекула може бути зв'язана з кон'югатом даного винаходу або введена у вигляді ад'юванту в поєднанні з кон'югатом даного винаходу.

Одним з цитокінів, що розглядаються для використання в даному винаході, є IL2 або похідне, що володіє по суті такою ж біологічною активністю, що і нативний IL2. Інтерлейкін-2 (IL-2), спочатку позначений як фактор Т-клітинного росту, є досить довершеним індуктором Т-клітинної проліферації і є фактором росту всіх субпопуляцій Т-лімфоцитів. IL-2 являє собою антигенонезалежний фактор проліферації, який стимулює проходження клітинного циклу клітинами, що покояться, і таким чином робить можливою клональну експансію активованих Т-лімфоцитів. Оскільки свіжовиділені лейкозні клітини також секретують IL2 і відповідають на нього, IL2 може функціонувати як аутокринний модулятор росту для цих клітин, здатний погіршувати ATL. IL2 сприяє також проліферації активованих В-клітин, хоча це вимагає присутності додаткових факторів, наприклад, IL4. In vitro IL2 також стимулює ріст олігодендрогліальних клітин. У зв'язку з його дією на Т-клітини і В-клітини, IL2 є центральним регулятором імунних відповідей. Він також грає роль в протизапалювальних реакціях в гемопоезі і в нагляді за злоякісною пухлиною. IL2 стимулює синтез γ -IFN в периферичних лейкоцитах і також індукуює секрецію IL-1, α -TNF і β -TNF. Індукція секреції знищуючих пухлинні клітини цитокінів, крім активності в експансії LAK-клітин (лімфокін-активовані кілерні клітини), є головним фактором, відповідальним за протипухлинну активність IL2.

Передбачається, що даний винахід може допомогти пацієнту, страждаючому від злоякісної пухлини або від проліферативного захворювання. Кількість прописаних даному пацієнту ліків являє собою терапевтично ефективну кількість або кількість, яка допоможе в лікуванні злоякісної пухлини або захворювання. Введення кон'югату може бути парентеральним або харчовим. Типові харчові способи введення включають, але не обмежуються вказаним, пероральний, ректальний, під'язичний або букальний. Типові парентеральні способи введення включають, але не обмежуються вказаним, внутрішньочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний,

внутрішньом'язовий, інтрадермальний, внутрішньопухлинний і внутрішньосудинний. III. Фармацевтичні композиції

Сполуки даного винаходу можна використовувати окремо або в поєднанні з іншими сполуками, такими як терапевтичні сполуки.

Фармацевтичні форми, придатні для ін'єктування, включають стерильні водні розчини і/або дисперсії; композиції, що включають кунжутну олію, арахісову олію і/або водний пропіл енгліколь; і/або стерильні порошки для негайного приготування ін'єкційних розчинів і/або дисперсій. У всіх випадках фармацевтична форма повинна бути стерильною і/або повинна бути рідкою до такої міри, щоб можна було легко заповнити шприц. Вона повинна бути стабільною в умовах виробництва і/або при зберіганні і/або повинна бути захищена від дії контамінуючих мікроорганізмів, таких як бактерії і/або гриби.

Розчини активних сполук у вигляді вільної основи і/або фармакологічно прийнятних солей можна приготувати у воді, змішавши належним чином з поверхнево-активною сполукою, такою як гідроксипропілцелюлоза. Дисперсії можна також приготувати в гліцерині, рідких поліетиленгліколях і/або в їх сумішах, і/або в оліях. Відповідно до звичайних умов зберігання і/або використання ці препарати містять консервант для запобігання росту мікроорганізмів.

Кон'югат даного винаходу можна скласти в композицію в нейтральній і/або сольовій формі. Фармацевтично прийнятні солі включають кислотнo-адитивні солі (що утворюються з вільними аміногрупами білка) і/або солі, що утворюються неорганічними кислотами, такими, наприклад, як хлористоводнева і/або фосфорна кислоти, і/або такими органічними кислотами як оцтова, щавлева, виннокaм'яна, мигдалева, і/або подібними до них. Солі, що утворюються вільними карбоксильними групами, можна також одержати з неорганічних основ, таких, наприклад, як натрієва, калієва, амонійна, кальцієва і/або залізна гідроокиси, а також/або з таких органічних основ як ізопропіламін, триметиламін, гістидин, прокаїн і/або подібними до них. З точки зору використання пептидних терапевтичних засобів як активних інгредієнтів можна застосувати технологію, викладену в патентах США №4608251; 4601903; 4599231; 4599230; 4596792 і/або 4578770, включених тут, кожний, шляхом посилання.

Носій може також являти собою розчинник і/або дисперсійне середовище, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і/або рідкий поліетиленгліколь, і/або подібні до них), відповідні їх суміші, і/або рослинні олії. Належну текучість можна підтримувати, наприклад, шляхом використання покривного матеріалу, такого як лецитин, шляхом підтримки необхідного розміру часток у випадку дисперсії і/або шляхом використання поверхнево-активних сполук. Запобігти дії мікроорганізмів можна за допомогою різних антибактерійних і протигрибкових агентів, наприклад, парабензоатів, хлорбутанолу, фенолу, сорбінової кислоти, тіомерсалу і/або подібних до них. У багатьох випадках переважно включати ізотонічні агенти, наприклад, цукор і/або хлорид натрію. Пролонговану абсорбцію ін'єктованих композицій можна здійснити шляхом використання в даних композиціях агентів, затримуючих поглинання, наприклад, алюмініймоностеарату і/або желатину.

Стерильні ін'єкційні розчини готують шляхом введення активних сполук в потрібну кількість відповідного розчинника з різними, якщо потрібно, іншими переліченими вище інгредієнтами, з подальшою стерилізацією фільтруванням. Звичайно, дисперсії готують шляхом введення різних стерилізованих активних інгредієнтів в стерильний носій, який містить основне дисперсійне середовище і/або інші необхідні інгредієнти з перелічених вище. Що стосується стерильних порошків, то для одержання стерильних ін'єкційних розчинів переважними способами їх приготування є методи вакуумного сушіння і/або сушіння сублімацією, за допомогою яких виготовляють порошок активного інгредієнта і будь-якого додаткового необхідного інгредієнта з їх розчину, раніше простерилізованого фільтрацією. Передбачається також для прямої ін'єкції приготування розчинів з великою або високою концентрацією, де, як вважають, використання як розчинника DMSO має своїм результатом надзвичайно швидке проникнення, що приводить до доставки високих концентрацій активних агентів в невелику ділянку.

Після приготування розчини вводять способом, сумісним з дозованою композицією і/або в такій кількості, яка є терапевтично ефективною. Дані композиції легко вводяться в різноманітних дозованих формах, таких як описані вище типи ін'єкційних розчинів, хоча можна також використати капсули і/або подібне до них для вивільнення лікарського засобу.

Для парентерального введення, наприклад, у водному розчині, розчин, якщо необхідно, повинен бути належно забуферений і/або рідкому розріджувачу спочатку додають ізотонічності за допомогою достатньої кількості солі і/або глюкози. Ці індивідуальні водні розчини особливо придатні для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного і/або внутрішньочеревинного введення. У зв'язку з цим, стерильне водне середовище, яке може бути використане, повинне бути добре відоме фахівцям в даній області техніки в світлі представленого опису. Наприклад, одну дозу можна було б розчинити в 1мл ізотонічного розчину NaCl, і/або або довести до 1000мл рідиною для введення в підшкірну клітковину, і/або ін'єктувати в передбачувану ділянку введення [дивіться, наприклад, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 і/або 1570-1580]. У залежності від стану пацієнта, якого лікують, неминуче відбувається деяка зміна дозування. Особа, відповідальна за введення, повинна в будь-якому випадку визначити належну дозу для окремого пацієнта.

Активний кон'югат і/або агенти можна скласти в терапевтичну суміш, яка включає близько 0,0001-1,0 міліграма і/або близько 0,001-0,1 міліграма, і/або близько 0,1-1,0, і/або навіть близько 10 міліграм на дозу, і/або і так далі. Можна також вводити багаторазові дози.

Крім сполук, складених для парентерального введення, такого як для внутрішньовенного, внутрішньосуглобного і/або внутрішньом'язового ін'єктування, інші фармацевтично прийнятні форми включають, наприклад, таблетки і/або інші тверді частки для перорального введення; ліпосомні композиції; капсули з уповільненим вивільненням даної композиції; і/або будь-яку іншу форму, що нині використовується, в тому числі і креми.

Можна також використати розчини в ніс і/або розчини, що розпилюються, аерозолі і/або інгальовані засоби

даного винаходу. Назальні розчини являють собою, як правило, водні розчини, створені для введення в носові ходи по краплях і/або у вигляді розчинів, що розпилюються. Назальні розчини готують таким чином, щоб вони, в багатьох відношеннях, були подібні до назальних секретів для підтримки нормальної циліарної дії. Тому, водні назальні розчини, як правило, є ізотонічними і/або злегка забуференими для підтримки рН 5,5-6,5. Крім того, в дану композицію можуть бути включені, якщо знадобиться, протимікробні антисептики, аналогічні тим, що використовуються в офтальмологічних препаратах, і/або відповідні стабілізатори лікарських засобів. Відомі різні комерційні назальні препарати і вони включають, наприклад, антибіотики, і/або антигістаміни і/або використовувати для профілактики астми.

Додаткові композиції, які придатні для інших способів введення, включають вагінальні супозиторії і/або пєсарії. Можна також використати ректальний пєсарій і/або супозиторій. Супозиторії являють собою тверді дозовані форми різної ваги і/або форми, звичайно лікарські свічки, для введення в пряму кишку, піхву і/або уретру. Після введення супозиторії розм'якшуються, плавляться і/або розчиняються в порожнинних рідинах. Загалом, супозиторії можуть включати традиційні зв'язуючі речовини і/або носії, наприклад, поліалкіленгліколи і/або тригліцериди; такі супозиторії можуть бути створені з сумішей, що містять активний інгредієнт в діапазоні від 0,5% до 10%, переважно 1%-2%.

Пероральні композиції включають такі наповнювачі, що використовуються в нормі як, наприклад, фармацевтично чисті маніт, лактозу, крохмаль, магнійстеарат, натрійсахарин, целюлозу, вуглекислий магній і/або тому подібне. Ці композиції приймають форму розчинів, суспензій, таблеток, пілюль, композитів з уповільненим вивільненням і/або порошків. У деяких певних варіантах здійснення даного винаходу пероральні фармацевтичні композиції включають інертний розріджувач і/або харчовий носій, що засвоюється, і/або вони можуть бути включені в твердий і/або м'який желатиновий корпус капсули, і/або вони можуть бути стиснуті в таблетки, і/або вони можуть бути включені безпосередньо в їжу. Для перорального терапевтичного введення активні сполуки можуть бути введені з наповнювачами і/або використовуватися в формі таблеток, що проковтуються, захисних таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, облаток і/або тому подібне. Такі композиції і/або препарати повинні містити, щонайменше, 0,1% активної сполуки. Зрозуміло, процентні частки даних композицій і/або препаратів можуть варіювати і/або можуть знаходитися в межах від близько 2 до близько 75% від ваги дозованої одиниці, і/або переважно між 25-60%. Кількість активних сполук в таких композиціях, що терапевтично використовуються, є такою, що можна одержати відповідну дозу.

Таблетки, пастилки, пілюлі, капсули і/або подібні до них можуть також містити: зв'язуючу речовину, у вигляді трагакантової камеді, камеді акації, кукурудзяного крохмалю і/або желатини; наповнювачі, такі як дикальційфосфат; розпушуючі агенти, такі як кукурудзяний крохмаль, картопляний крохмаль, альгінова кислота і/або подібні до них; змащувальну речовину, таку як магнійстеарат; і/або підсолоджуючий агент, такий як сахароза, лактоза і/або сахарин; може бути доданий і/або ароматизуючий агент, такий як м'ята перцева, олія грушанки і/або вишневий ароматизатор. Якщо форма дозованої одиниці являє собою капсулу, то вона може містити, крім матеріалів вищезгаданого типу, рідкий носій. Різні інші матеріали можуть бути представлені у вигляді покриттів і/або іншим чином модифікувати фізичну форму дозованої одиниці. Наприклад, таблетки, пілюлі і/або капсули можуть бути покриті шелаком, цукром і/або тим і іншим. Сироп еліксиру може містити активні сполуки, сахарозу як підсолоджуючий агент, метил і/або пропілапарабензоати як антисептики, барвник і/або ароматизатор, такий як вишневий і/або апельсиновий ароматизатор.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу ліпідні композиції, і/або нанокапсули передбачають використати для введення в клітини-хазяї кон'югату/або агентів, і/або для введення векторів генотерапії, включаючи вектори дикого типу і/або антисмислові вектори.

Як правило, нанокапсули можуть включати сполуки в стабільному стані і/або відтворюваному стані. Щоб виключити побічні ефекти, пов'язані з внутрішньоклітинним полімерним перевантаженням, такі ультратонкі частки (розміром близько 0,1мкм) повинні створюватися з використанням полімерів, здатних до деградації *in vivo*. Біодеградовані поліалкілціаноакрилатні наночастинки, які задовольняють цим вимогам, передбачається використати в даному винаході, і/або такі частки можна легко виготовити.

У будь-якому варіанті здійснення даного винаходу даний кон'югат може бути асоційований з ліпідом. Такі кон'югати, асоційовані з ліпідом, можна інкапсулювати у водне ядро будь-якої ліпосоми, розподілити в ліпідному бішарі ліпосоми, прикріпити до ліпосоми за допомогою лінкерної молекули, яка зв'язується і з ліпосомою і з олігонуклеотидом, укласти в ліпосому, зв'язати в комплекс з ліпосомою, диспергувати в розчині, що містить ліпід, змішати з ліпідом, об'єднати з ліпідом, вони також можуть містити у вигляді суспензії в ліпіді, міститися або утворювати комплекс з міцелою, або по-іншому асоціюватися з ліпідом. Ліпідна або ліпід/кон'югатасоційована композиції даного винаходу не обмежуються якою-небудь конкретною структурою в розчині. Наприклад, вони можуть бути представлені бішаровою структурою, у вигляді міцел, або згорненою структурою. Вони можуть бути також просто розсіяні в розчині, можливо утворюючи агрегати, які неоднорідні по розміру або формі.

Ліпіди являють собою жирові речовини, які можуть бути такими, що зустрічаються в природі або синтетичними ліпідами. Наприклад, ліпіди включають жирові краплинки, які природним чином знаходяться в цитоплазмі, а також клас сполук, добре відомих фахівцям в даній області техніки, які містять довголанцюгові аліфатичні вуглеводні і їх похідні, такі як жирні кислоти, спирти, аміни, аміноспирти і альдегіди.

Відповідно до даного винаходу для одержання ліпосом можна використати фосфоліпіди, і вони можуть нести сумарний позитивний, негативний або нейтральний заряд. Для придання ліпосомам негативного заряду можна використати діацетилфосфат, а стеариламін можна використати для придання ліпосомам позитивного заряду. Ліпосоми можна створити з одного або декількох фосфоліпідів.

Нейтрально заряджений ліпід може включати ліпід без заряду, майже незаряджений ліпід або ліпідну суміш з рівною кількістю позитивних і негативних зарядів. Відповідні фосфоліпіди включають фосфатидилхоліни і інші, які добре відомі фахівцям в даній області техніки.

Ліпіди, придатні для використання відповідно до даного винаходу, можуть бути одержані з комерційних джерел. Наприклад, димиристилфосфатидилхолін ("DMPC") можна одержати від Sigma Chemical Co.,

діацетилфосфат ("DCP") одержують від K&K Laboratories (Plainview, NY); холестерин ("Choi") одержують від Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилгліцерин ("DMPG") і інші ліпіди можна одержати від Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). Маточні розчини ліпідів в хлороформі або в хлороформ/метанолі можна зберігати при близько -20°C. Переважно, хлороформ використовується тільки як розчинник, оскільки він швидше випаровується, ніж метанол.

Фосфоліпіди природного походження, такі як фосфатидилхолін яйця або з соєвих бобів, фосфатидна кислота мозку, фосфатидилінозитол мозку або рослин, кардіоліпін серця і фосфатидилетаноламін рослин або бактерій переважно не використовуються як первинний фосфатид, тобто, такий, що складає 50% і більше від загального фосфатидного складу, через нестабільність і негерметичність одержаних ліпосом.

Фосфоліпіди при диспергуванні у воді можуть утворювати різні структури, відмінні від ліпосом, в залежності від молярного співвідношення ліпиду і води. При низькому співвідношенні переважною структурою є ліпосома. Фізичні характеристики ліпосом залежать від pH, іонної сили і/або присутності двовалентних катіонів. Ліпосоми можуть демонструвати низьку проникність для іонів і/або полярних речовин, але при підвищеній температурі зазнають фазового переходу, що явно змінює їх проникність. Такий фазовий перехід спричиняє за собою зміну щільно упакованої, впорядкованої структури, відомої як гелеподібний стан, в нещільно упаковану, менш впорядковану структуру, відому під ім'ям рідкий стан. Це відбувається при характерній для фазового переходу температурі і/або приводить до підвищення проникності для іонів, цукрів і/або лікарських засобів.

Ліпосоми взаємодіють з клітинами за допомогою чотирьох різних механізмів: ендоцитозу, здійснюваного фагоцитарними клітинами ретикулоендотеліальної системи, такими як макрофаги і/або нейтрофіли; адсорбції на клітинній поверхні, або за допомогою неспецифічних слабких гідрофобних і/або електростатичних сил, і/або за допомогою специфічних взаємодій з компонентами клітинної поверхні; злиття з плазматичною мембраною клітини, шляхом вбудовування ліпідного бішару ліпосоми в плазматичну мембрану, і одночасного вивільнення вмісту ліпосом в цитоплазму; і/або шляхом перенесення ліпосомних ліпідів в клітинну і/або субклітинну мембрану, або навпаки, без якої-небудь асоціації вмісту ліпосом. Змінюючи ліпосомний склад, можна видозмінювати діючий механізм, хоча і не більше ніж на одну дію в один і той же час.

Ліпосомопосередкована доставка олігонуклеотиду і експресія чужорідної ДНК *in vitro* виявлялася дуже успішною. Wong і співавт., (1980) продемонстрували здійсненність ліпосомопосередкованої доставки і експресії чужорідної ДНК в культивованих клітинах курячого ембріона, HeLa і гепатоми. Nicolau і співавт., (1987) здійснили успішне ліпосомопосередковане генне перенесення у щурів після внутрішньовенної ін'єкції.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу ліпід може бути асоційований з гемаглютинуючим вірусом (HVJ). Показано, що при цьому полегшується злиття з клітинною мембраною і активізується введення в клітини інкапсульованої в ліпосому ДНК [Kaneda і співавт., 1989]. В інших варіантах здійснення даного винаходу ліпід може бути пов'язаний в комплекс або бути використаний в поєднанні з ядерними негістоновими білками хромосом (HMG-1) [Kato і співавт., 1991]. Ще в одних варіантах здійснення даного винаходу ліпід може бути пов'язаний в комплекс або використаний в поєднанні з HVJ, і з HMG-1. Оскільки такі експресійні вектори успішно використовувалися для перенесення і експресії олігонуклеотиду *in vitro* і *in vivo*, вони застосовні для даного винаходу. Якщо в ДНК-конструкції використовують бактерійний промотор, також бажано включити в дану ліпосому відповідну бактерійну полімеразу.

Ліпосоми, що використовуються відповідно до даного винаходу, можна створити різними способами. Розмір ліпосом варіює в залежності від способу синтезу. Ліпосома, суспендована у водному розчині, як правило, приймає форму сферичної везикули, що володіє одним або декількома концентричними шарами молекул ліпідного бішару. Кожний шар складається з молекул в паралельному порядку, представлених формулою XY, де X являє собою гідрофільну складову, Y являє собою гідрофобну складову. У водній суспензії концентричні шари розташовуються таким чином, що гідрофільні компоненти намагаються залишитися в контакт з водною фазою, а гідрофобні ділянки намагаються самоасоціювати. Наприклад, якщо водні фази представлені і всередині ліпосоми і без неї, то ліпідна молекула може утворити бішар, відомий під ім'ям ламела, зі структурою XY-YX. Агрегати ліпідів можуть утворитися, якщо гідрофільна і гідрофобна частини більш ніж однієї ліпідної молекули стають асоційованими одна з одною. Розмір і форма цих агрегатів залежить від багатьох різних змінних, таких як природа розчинника і наявність інших сполук в даному розчині.

Ліпосоми в рамках даного винаходу можна одержати відповідно до відомих лабораторних методів. В одному з переважних варіантів здійснення даного винаходу ліпосоми одержують шляхом змішування ліпосомних ліпідів в розчиннику в контейнері, наприклад, скляній грушовидній колбі. Даний контейнер повинен володіти об'ємом, що в десять разів перевищує об'єм розрахованої суспензії ліпосом. Використовуючи роторний випарник розчинник видаляють при температурі, приблизно, 40°C під негативним тиском. Звичайно розчинник видаляють в межах близько 5хв. - 2 годин, в залежності від необхідного об'єму для даних ліпосом. Одержану композицію надалі можна збезводнити в ексикаторі при негативному тиску. Ці зневоднені ліпіди, як правило, відкидають приблизно через 1 тиждень через тенденцію деградувати згодом.

Зневоднені ліпіди можна гідратувати до концентрації, приблизно, 25-50мМ фосфоліпідів в стерильній апірогенній воді шляхом струшування доти, поки вся дана ліпідна плівка не ресуспендується. Одержані водні ліпосоми можна потім розділити на аліквоти, кожную аліквоту вмістити в ампулу, ліофілізувати і запаяти під негативним тиском.

Як альтернатива ліпосоми можна одержати відповідно до інших відомих лабораторних методів: методом Bangham і співавт., (1965), вміст якого включений тут шляхом посилання; методом Gregoriadis, як описано в DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE, G. Gregoriadis ed. (1979) pp.287-341, вміст якого включений тут шляхом посилання; і методом обернено-фазового випаровування, який описаний у Szoka and Papahadjopoulos (1978). Вищезгадані методи відрізняються, відповідно, за їх здатностями включати водорозчинний матеріал і, відповідно, за їх співвідношеннями водний простір-ліпід.

Одержані, як указано вище, зневоднені ліпіди або ліофілізовані ліпосоми можна дегідрувати і відтворити в розчині інгібуючого пептиду і розбавити до відповідної концентрації за допомогою відповідного розчинника,

наприклад, DPBS. Потім дану суміш енергійно перемішують у вихровому змішувачі. Неінкапсульовану нуклеїнову кислоту видаляють центрифугуванням при 29000×g і одержаний осад ліпосом промивають. Промиті ліпосоми ресуспендують до відповідної загальної фосфоліпідної концентрації, наприклад, близько 50-200mM. Кількість інкапсульованої нуклеїнової кислоти можна визначити за допомогою стандартних способів. Після визначення кількості нуклеїнової кислоти, інкапсульованої в ліпосомному препараті, ці ліпосоми можна розбавити до відповідної концентрації і зберігати при 4°C до використання.

Фармацевтичні композиції, що включають ліпосоми, будуть, як правило, включати стерильний, фармацевтично прийнятний носій або розріджувач, такий як вода або фізіологічний розчин.

Нижченаведені приклади включені для демонстрації переважних варіантів здійснення даного винаходу. Фахівцям в даній області техніки потрібно мати на увазі, що методи, розкриті в даних прикладах, описуються автором даного винаходу як такі, що добре зарекомендували себе при здійсненні даного винаходу і тому можуть розглядатися як переважні практичні методи. Проте, фахівці в даній області техніки повинні, в світлі даного опису, розуміти, що в конкретних варіантах здійснення даного винаходу, які розкриті, можуть бути внесені численні зміни, що не виходять за рамки і суть даного винаходу, і все ж одержати близький або аналогічний результат.

Приклад 1

Мутагенез *in vitro*

З використанням методу, оснований на полімеразній ланцюговій реакції (PCR) створені різні варіанти суперантигену.

Коротко, ПЛР-продукти, містили два унікальних сайти ферменту рестрикції, один з яких кінцевий. Для субклонування використали pUC19 (GIBCO BRL Life Technologies, Middlesex, Об'єднане Королівство), приготувану відповідно до протоколу QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Німеччина). Для полегшення подальшого аналізу були включені точкові мутації, що не впливають на амінокислотну послідовність. ПЛР-реакцію здійснювали на Perkin Elmer Gene Amp PCR system 2400 з Taq-ДНК-полімеразою і відповідним ПЛР-буфером, що містив 15mM MgCl₂ (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Швейцарія). ПЛР-продукти і вектори обробляли протягом ночі за допомогою відповідних ферментів рестрикції. Їх виділяли очищенням за допомогою електрофорезу в 1%-ому агарозному гелі (GIBCO BRL Life Technologies), що містить 0,5мкг/мл етидйброміду (Sigma-Aldrich, Steinheim, Німеччина) в TAE-буфері (Sigma-Aldrich). Фрагмент, що містить ДНК, вирізали з гелю і екстрагували з використанням системи CONCERT™ Rapid Gel Extraction System (GIBCO BRL Life Technologies). Вектор і вставку лігували (T4-ДНК-лігаза, Roche Molecular Biochemicals) при кімнатній температурі протягом 3-4 годин. Суміш, піддану лігуванню, трансформували в клітини *Escherichia coli*, штам *DH5α* (GIBCO BRL Life Technologies) відповідно до інструкцій, прикладених до даного штам клітин. Позитивні клони підтверджували з використанням ДНК-секвенування. Правильні послідовності обробляли за допомогою RsrII/HindIII при 37°C протягом ночі і лігували в експресійний вектор [Dohlstein і співавт., 1994]. Варіабельні ділянки Fab міняли на C215, щоб відповідати моделям домашніх тварин. Нарешті, дану конструкцію електропорували в клітини штам *K12 UL635 Escherichia coli* (xyl-7, ara-14, T4R, Dompf).

Приклад 2

Ідентифікація ділянок, що зв'язують людські антитіла проти SEA

Ділянки, що розпізнаються людськими антитілом проти SEA, ідентифікували в обробленому пепсином SEA або химерному варіанті SEA і SEE, SEA/E-18, раніше описаного як SEE/A-A (Antonsson і співавт., 1997), із заміною D227A.

Кожний суперантиген інкубували з 0,5% пепсину, 10mM HCl, 150mM NaCl (w/w) протягом 60 хвилин при 37°C. Одержану пептидну суміш нейтралізували за допомогою 2M Трис-HCl, pH 8,0, і навантажували на HiTrap-колонку розміром 1 мл (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Швеція) з іммобілізованими людськими антитілами до SEA. Як промивальний буфер використовують PBS, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, pH 7,3, а зв'язуючі антитіла фрагменти елювали з використанням 0,1M оцтової кислоти, pH 3,0. Фрагменти ідентифікували до і після виділення очищенням з використанням ВЕРХ, суміщеної з мас-спектрометрією (MS) (Фіг.1). Хроматографію здійснювали на колонці C18 (2×250mm) (VYDAC™, Hesperia, California, США) з використанням лінійного градієнта від 10 до 60% ацетонітрилу в 0,1% трифтороцтової кислоті протягом 30хв. при 40°C. Визначення маси здійснювали з використанням MS з електророзпилювальною іонізацією [Finnigan LCQ, Thermoquest, San Jose, California, США]. Фрагменти, що виявляються в гідролізаті з одним і тим же часом утримання до і після афінного очищення, розглядалися як позитивні (Фіг.2).

Приклад 3

Молекулярне моделювання

Химерний суперантиген SEA/E-18 ґрунтувався на послідовності SEE, за винятком чотирьох амінокислотних залишків поблизу N-кінця, які походили з SEA, і одного заміщення на C-кінцевій ділянці D227A (Фіг.3 і Фіг.4) [Antonsson і співавт., 1997].

Коротко, тривимірні структури суперантигенів, з найбільшою ідентичністю з SEE, які доступні з PBD, використали як матриці для створення гомологічної моделі SEAE-18, тобто, SEA [1ESF, Shard і співавт., 1SXT, Sundstrom і співавт., 1996 A], SED [Sundstrom і співавт., 1996 B] і SHE (1ENF) [Hakansson і співавт., 2000]. Послідовність SEA була найбільш близькою до SEE і ідентична їй на 80%. Послідовність SED була ідентична SEE на 60%, а SEN була ідентична SEE на 50%. Створення моделі здійснювали з використанням модуля HOMOLOGU в програмі INSIGHTII (MSI, San Diego). Структури трьох суперантигенів SEA, SED і SHE вирівнювали і визначали структурні консервативні ділянки (SCR) (Фіг.3). Ці ділянки звичайно картували в даних молекулах як регулярні [періодичні] вторинні структури. Необроблену послідовність SEA/E-18 навантажували і скріплювали з SCR SEA-структури (Фіг.5). Використали гомологічну модель 1SXT для SEA, за винятком перших дев'яти залишків на N-кінці, де використали 1ESF. Ділянки між SCR в більшості випадків являли собою гнучкі випетлюючі ділянки, і були побудовані з SEA і SED. Більшість цих петель були побудовані з SEA за винятком залишків Gln19, Ile140, Asp141, Lys142, Ser189, Gly191, Asp200, Pro206, Asp207 і Leu224, які

були побудовані з SED. Деякі ділянки в SCR продемонстрували більшу схожість послідовності з SED і були, тому, побудовані з використанням SED як структурної матриці (Ile37, Glu49, Asn50, Thr51, Leu52, Ser195, і Thr218) (Фіг.3).

Внаслідок того факту, що SEA використали як структурну матрицю для більшості залишків в SEA/E-18 труднощі не виникали у випадку виникаючого перекриття бічних ланцюгів. Точки сплайсингу перед і після SCR були репаровані. Спочатку були послаблені заміщені бічні ланцюги, і потім моделювання енергетичної мінімізації і молекулярної динаміки, з використанням стандартних протоколів в HOMOLOGY, послабило всі бічні ланцюги в SCR. Випетлюючі ділянки послабляли по одній під час використання перших 1000 стадій енергетичної мінімізації з подальшими 1000 стадіями молекулярної динаміки. Цей протокол удосконалення був застосований спочатку до випетлюючих бічних ланцюгів, а потім - до всіх атомів в даній петлі. У всіх моделях використали силове поле CVFF з силовою постійною 100ккал/Å² із застосуванням часового кроку в 2 fs.

Кінцеву модель тестували на наявність непридатних ділянок з використанням модуля PROSTAT в INSIGHTII. Встановлювали відсутність непридатних ділянок. При порівнянні з SEA внутрішній пристрій упакованого білка істотно не відрізнявся. Всі залишки залишалися в дозволених ділянках на ramachandran-графіку. Поєднання 1SXT з даною моделлю дає RMSD в 0,4Å, якщо порівнювали Ca-атоми. Головна відмінність між даними двома структурами проглядається для петлі β9-β10 (залишки His187-Thr193) (Фіг.5).

Використовуючи як матрицю модель SEA/E-18 створили нові моделі нових суперантигенних варіантів. Специфічні амінокислотні залишки замінювали безпосередньо в даній моделі. Найбільш відповідну конформацію бічного ланцюга вибирали з використанням простого пошуку просторових ускладнень з подальшою короткою енергетичною мінімізацією.

Приклад 4

Культивування і виділення очищенням

Химери C215FabSEA/E експресували у вигляді злитих білків в клітинах E.соді штамму K12 UL635 з використанням плазмиди з промотором Lac UV-5, що індукується IPTG, і геном стійкості до канаміцину.

Коротко, бактерії із замороженого (-70°) стокового розчину в 20%-ому гліцерині інкубували при 25°C протягом 22-24 год. у колбах, що струшуються, які містять (на 1 літр) 2,5г (NH₄)₂SO₄, 3г KH₂PO₄, 2г K₂HPO₄, 0,5г натрійцитрату, 1г MgSO₄·H₂O, 0,05г канаміцину, 12г моногідрату глюкози і 1мл розчину рідкісних елементів, але без Na₂MoC₄·2H₂O. Клітини вирощували до ОП₆₂₀ 2-3, і для інокуляції 1-літрового ферментера (Belach Bioteknik, Швеція) зі стартовим об'ємом 800мл використали 10мл прокультивованого середовища. Середовище в ферментері містило (на 1 літр) 2,5г (NH₄)₂SO₄, 9г KH₂PO₄, 6г K₂HPO₄, 0,5г натрійцитрату, 1г MgSO₄·7H₂O, 0,05г канаміцину, 23,1г моногідрату глюкози і 1мл розчину рідкісних елементів, як вказано вище. У період ферментації pH підтримували на постійному рівні 7,0 шляхом титрування 25%-м NH₃, аерація становила 1літр/хвилину, а температура дорівнювала 25°C. На стадії періодичного культивування насичення O₂ підтримували на рівні 30%, регулюючи перемішування від 400об./хв. до 2000об./хв., а під час періодичного культивування з підживленням - регулюючи подачу глюкози (60% w/v). Утворення продукту індукували при ОП₆₂₀ nm=45 шляхом додавання 0,1мМ ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозиду (IPTG). Після закінчення ферментації клітини видаляли центрифугуванням при -20°C перед виділенням очищенням.

Процедура виділення очищенням була розділена на три стадії. Спочатку з культурального супернатанту видаляли ДНК за допомогою 0,19% поліетиленіміну (w/v) в 0,2М NaCl, pH 7,4, застосовуючи для цього перистальтичний насос з швидкістю потоку 12 мл/хв. Після центрифугування при 7500×g протягом 30хв., збирали супернатант.

Його завантажували в 60мл-ову швидкопроточну колонку з білок-G-сефарозою 4 (Amersham Pharmacia Biotech) з швидкістю потоку 14мл/хв. Завантажену колонку промивали з використанням PBS, і елюювання здійснювали за допомогою 100мМ оцтової кислоти, 0,25% Твіна 20, pH 3,0. Збирали елюований продукт, і доводили pH, що складає на 1,5 одиниць нижче до передбачуваної ізоелектричної точки, за допомогою 1М NaOH, фільтрували (0,2мкм) і розбавляли в чотири рази 0,25%-м Твіном 20. Видаляли деградовані варіанти з використанням іонообмінної хроматографії. Іонну силу в одержаному зразку доводили до 2мS/см, а застосована колонка являла собою SP-Sepharose-HP, Hiloal 16/10 (Amersham Pharmacia Biotech). Елюцію здійснювали з швидкістю потоку 4,0 мл/хв. протягом 50хв. з використанням лінійного градієнта 0-55% буфера В, 100мМ NaAc, 400мМ NaCl, 0,025% Твіна 20, pH 5,0 в буфері А, 10мМ NaAc, 0,25% Твіна 20, pH 5,0.

Приклад 5

Серореактивність

Реактивність між одержаними суперантигенними варіантами і людськими антитілами проти SEA вимірювали в сцинтиляційному аналізі близької відстані (SPA).

У планшеті для мікротитрування (OptiPlate, Packard Instruments) PVT-кульки, покриті стрептавідином, 150мкг кульок/ямка (Amersham Pharmacia Biotech), інкубували протягом 30хв. при кімнатній температурі з біотинкон'югованими F(ab)₂-фрагментами антимишачих IgG, 3мкг/мг кульок. Вказані кульки передінкубували з суперантигенами, кон'югованими з C215Fab, в ряду розведень 1:2, де найвища кінцева концентрація в ямці становила 40нМ. У кінцевому результаті їх інкубували з 1нМ ¹²⁵I-кон'югованих афінно очищених людських антитіл проти SEA, а рівень Q-сцинтиляції вимірювали в Тор-лічильнику (Packard Instruments).

Реактивність суперантигенних варіантів з людськими антитілами проти SEA вимірювали також в твердофазному імуоферментному аналізі, ELISA [Cavallin і співавт., 2000]. Одержані результати були аналогічні результатам, одержаним в SPA.

Приклад 6

Біологічна функція

Здатність індукувати суперантигенну антитілозалежну клітинну цитотоксичність, SADCC, і суперантигензалежну клітинну цитотоксичність, SDCC, порівнювали в стандартному 4 год. аналізі по ⁵¹Cr-вивільненню.

Коротко, мішені, які використали для SDCC, являли собою Raji-клітини В-клітинної лімфоми людини, а

мішені для SADCC являли собою Colo205-клітини колоректальної карциноми людини. Ці клітини мітили за допомогою ^{51}Cr і розбавляли до концентрації 50000клітин/мл у V-подібній ямці планшета для мікротитрування. Як ефекторні клітини використали реагуючу SEA лінію Т-клітин людини при співвідношенні ефектору і мішені 45:1 для SADCC і 30:1 - для SDCC. Sag-варіанти додавали в концентраціях 10^{-9} - 10^{-16} для SADCC і 10^{-7} - 10^{-14} для SDCC. Збирали супернатанти, і вимірювали вивільнення ^{51}Cr в Тор-лічильнику (Packard Instruments). Процент специфічної цитотоксичності обчислювали як $100 \times [(\text{срт при вивільненні в досліді} - \text{срт при фоновому вивільненні}) / (\text{срт при сумарному вивільненні} - \text{срт при фоновому вивільненні})]$.

Приклад 7

Ідентифікація епітопів для антитіл

У пацієнтів з вже існуючими антитілами проти суперантигенів клінічне їх застосування ускладнюється, вимагаючи коректування їх доз в лікуванні [Alraugh і співавт., 1998]. Інший підхід до обмеження впливу вже існуючих антитіл полягав в модифікації ділянки суперантигену, відповідальної за зв'язування з Т-клітинним рецептором [Antonsson, і інш., 1997]. Однак даний винахід додатково поліпшував терапевтичний потенціал суперантигенів шляхом використання генної інженерії для видалення епітопів даного суперантигену для антитіл.

Встановлено, що SEE, в порівнянні з SEA, виявляє значно знижену реактивність з антитілами [Antonsson і співавт., 1997]. На жаль, при цьому зниженні відбувається також явне зменшення здатності до знищення злоякісної пухлини, в тому випадку, якщо SEE злитий з реагуючим зі злоякісною пухлиною Fab [Antonsson і співавт., 1997]. Тому були досліджені химерні конструкції SEA і SEE. При введенні відповідних амінокислот з SEA по чотирьох позиціях TCR-зв'язуючої ділянки SEE, одержували необхідні властивості. Ці заміни: Arg20Gly, Asn21Thr, Ser24Gly і Arg27Lys (ділянка A) в SEE, приводили до химери SEA/E-18 (Фіг.4) [Antonsson і співавт., 1997]. Для даної химери виявляється більш ніж 50%-е зниження реактивності з антитілами, як і в SEE, незважаючи на збереження ефективного рівня цитотоксичності як і в SEA. Крім того, для зменшення спорідненості між даним суперантигеном і MHC класу II, яке знижує SDCC і тим самим поліпшує терапевтичне вікно, SEA/E-18 містить також заміну Asp227Ala [Abrahmsen і співавт., 1995].

Для подальшого зниження здатності людських антитіл проти SEA розпізнавати SEA/E-18, в суперантигенах визначали антитілозв'язувальні епітопи. Використовуючи іммобілізовані антитіла проти SEA, вловлювали пептид/фрагменти при частковій обробці пепсином SEAwt або SEA/E-18. Після виділення очищенням одержані пептидні послідовності ідентифікували з використанням LC-MS (Фіг.1). Таким чином, в амінокислотній послідовності локалізували потенційні ділянки, що беруть участь в розпізнаванні антитіл. Примітно, що більшість пептидів, які витягаються виявлялися локалізованими навколо ділянок, відомих по взаємодії з MHC клас II [Abrahmsen і співавт., 1995] (Фіг.2 і Фіг.6). Для місцезнаходження залишків в ідентифікованих пептидах, розташованих на поверхні, використали тривимірну структуру SEA [Schad і співавт., 1995; Sundstrom і співавт., 1996] і комп'ютерну модель SEA/E-18 (Фіг.5), оснований на кристалографічних характеристиках SEA [Schad і співавт., 1995; Sundstrom і співавт., 1996 A]. Були ідентифіковані наступні залишки, які є вірогідними кандидатами як такі, що створюють зв'язуючі антитіла епітопи: Glu34, Lys35, Glu39, Asn40, Lys41, Glu42, Asp44, Asp45, Glu49, Lys74, Asp75, Asn78, Lys79, Lys81, Lys83, Lys84, Asp 173, His187, Ser189, Glu190, Gln204, Lys217, Asn220, Glu222, Asn223, His225 і Asp227 (Таблиця 1).

Ці залишки були послідовно замінені для зменшення зв'язування з антитілами. Безперервно створювалися нові комп'ютерні моделі з поліпшеними надалі Sag-варіантами, щоб підтвердити і порівняти одержані останні результати. Зокрема, вивчався вплив бічних ланцюгів і ідентифікувалися зміни, що впливають на стабільність білка.

Приклад 8

Модифікація суперантигену для зменшення серореактивності Рівні антитілозв'язувальних залишків, що ідентифікуються, були спочатку охарактеризовані в SEA/E-18 по двох-шести одночасних замінах. Таким чином, одержували SAg-варіанти SEA/E-62 (Lys217Thr, Asn220Ala, Glu222Thr, Asn223Ala, His225Ala) (ділянка E), SEA/E-63 (Ser189Asp, Glu190Ala, ділянка D), SEA/E-64 (Glu34Lys, Lys35Glu, Glu39Lys, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys) (ділянка B), SEA/E-65 (Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Glu, Lys84Glu) (ділянка C), SEA/E-74 (Asp44Ala, Asp45Ala, Glu49Thr) (ділянка B) і SEA/E-75 (Lys74Thr, Asp75Ala, Asn78Ser) (ділянка C) (Таблиця 1, Фіг.4).

Для вивчення можливості розпізнавання антитілами проти SEA з пулу людських IgG, різних SAg-варіантів був розроблений сцинтиляційний аналіз близької відстані (SPA). У порівнянні з SEA/E-18 всі модифіковані варіанти виявилися розпізнаваними в меншій мірі (Таблиця 1). Найбільш істотне зменшення в зв'язуванні було викликане замінами, зробленими в SEA/E-65. У SPA-аналізі спостерігалось зниження більш ніж на 40% (Фіг.7). Однак багато які заміщення також спричиняли зниження в рівні продукції в E.coli і, крім того, меншала і біологічна активність. При ретельному вивченні замін автори даного винаходу змогли ідентифікувати відповідальні залишки в кожному варіанті і виключити або модифікувати їх для одержання кращих характеристик. Взагалі, рівень продукції підвищується при гідрофільних замінах в порівнянні з більш гідрофобними замінами.

Зменшення в зв'язуванні антитіл синергічно підвищувалося при об'єднанні варіантів, таких як SEA/E-91, складеного з SEA/E-63, SEA/E-65, і модифікованого SEA/E-74 (з Asp45 дикого типу) (Таблиця 1). Варіантом з результатом, що найбільш виділяється в SPA-аналізі і зниження майже на 70% зв'язуванням, в порівнянні з SEA/E-18, виявився SEA/E-110, поєднання SEA/E-63, SEA/E-75 і модифікованого SEA/E-62 (SEA/E-97), SEA/E-64 (SEA/E-108), SEA/E-65 (SEA/E-84), і SEA/E-74 (Asp45 дикого типу) (Фіг.7, таблиця 1). Модифікаціями, відповідальними за найбільше зниження зв'язування антитіл, виявилися в SEA/E-109 (Glu34Ser, Glu39Ser, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys, Asp44Ala, Glu49Thr, Lys74Thr, Asp75Ala, Asn78Ser, Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Ser, Lys84Ser), поєднання SEA/E-75 і модифікованого SEA/E-64 (SEA/E-108), SEA/E-65 (SEA/E-84) і SEA/E-74 (Asp45 дикого типу). Це зумовлене тим, що всі суперантигенні варіанти, які містять такі заміни, виявляли хороше зниження в SPA-аналізі.

Таким чином, залишки, що замінюються в SEA/E-62, SEA/E-64, SEA/E-65 і SEA/E-74, в порівнянні з SEA/E-

18, приводили до зниження реактивності з антитілами між 20 і 40% (Таблиця 1).

Таблиця 1

Химера	E34	K35	E39	N40	K41	E42	D44	D45	E49	K74	D75	N78	K79	K81	K83	K84	D173	H187	S188	S189	E190	Q204	K217	N220	E222	N223	H225	D227	Вміст (мг/л)	Серореактивність (Вmax)	SADCC	SDCC
SEA/E-21																		A	T									A	55,0	98%	0,5	1
SEA/E-62																		A	T				T	A	T	A	A	A	1,0	77%	1	0,5
SEA/E-97																		A	T				T	S	T	S	S	S	48,0	93%	3	1
SEA/E-63																		A	T	D	A							A	14,0	95%	1	0,5
SEA/E-64	K	E	K	S	E	K												A	T									A	23,0	68%	0,5	0,5
SEA/E-108	S		S	S	E	K												A	T									A	30,0	66%	0,7	0,9
SEA/E-65													E	E	E	E		A	T									A	1,5	57%	1	0,5
SEA/E-90													E	E	E	E		A	T			R					A	2,2	52%	1	1	
SEA/E-84													E	E	S	S		A	T									A	15,0	59%	1	1
SEA/E-68																	A	A	T									A	26,5	93%	0,5	1
SEA/E-74							A	A	T									A	T									A	42,0	80%	1	0,5
SEA/E-91							A		T				E	E	E	E		A	T	D	A							A	12,0	46%	1	0,1
SEA/E-75										T	A	S						A	T									A	53,0	86%	0,1	1
SEA/E-93				S	E	K	A	A	T				E	E	E	E		A	T	D	A							A	15,0	43%	1	Немає
SEA/E-107																	A	A	T	D	A	R	T	S	T	S	S	S	6,0	78%	1	0,1
SEA/E-113																	A	A	T	D	A	T	T	S	T	S	S	S	14,0	89%	3	0,5
SEA/E-106	S		S	S	E	K	A		T	T	A	S	E	E	S	S		A	T									A	24,0	48%	1	0,04
SEA/E-110	S		S	S	E	K	A		T	T	A	S	E	E	S	S	A	A	T	D	A	T	T	S	T	S	S	S	0,5	32%	0,07	0,005
SEA/E-115	S		S	S	E	K	A		T	T	A	S	E	E	S	S	A	A	T				T	S	T	S	S	S	2,0	48%	0,5	0,01
SEA/E-118	S		S	S	E	K	A		T	T	A	S	E	E	S	S	A	S	T				T	S	T	S	S	S	2,0	46%	0,5	0,005
SEA/E-119	S		S	S	E	K	A		T	T	A	S	E	E	S	S		A	T				T	S	T	S	S	S	10,0	52%	1	0,05
SEA/E-121	S		S	S	E	K	A		T	T	A	S	E	E	S	S							T	S	T	S	S	S	30,0	36%	3	0,04
SEA/E-121	S		S	S	E	K	A		T	T	A	S	E	E	S	S		A					T	S	T	S	S	S	7,0	44%	1	0,04
SEA/E-122	S		S	S	E	K	A		T	T	A	S	E	E	S	S		S					T	S	T	S	S	S	12,0	46%	1	0,006

Біологічна активність встановлена по 1 для C215Fab/SEA/E-18 і в SADCC і в SDCC. Величини оцінок серореактивності, тобто, Вmax, виражені в процентах до C215Fab/SEA/E-18. Значення, представлені шрифтом жирного зображення, основані на експериментах, здійснюваних з відмінними серіями антитіл в порівнянні з іншими.

Приклад 9

Заміни, що впливають на рівень продукції

Як указано вище, деякі із замін на поверхні суперантигену приводили до зниженого рівня продукції в E.coli. Багато які поєднання таких замін було навіть неможливо створити. Тому було вирішено дослідити альтернативні модифікації залишків, які мабуть викликають зниження продукції. Заміни, які впливали на продукцію без зменшення зв'язування з антитілами, далі не досліджувалися. Замість них використовувалися амінокислотні залишки дикого типу.

У початковій групі суперантигенних варіантів залишок Lys35 в SEA/E-64 впливав на рівень експресії негативно. При використанні залишку дикого типу в положенні 35, нарівні з сериновими замінами Glu34 і Glu39, що дають SAg-варіант SEA/E-108, відбувалося збільшення синтезу з 23мг/л до 30мг/л. Однак, знижена реактивність з антитілами зберігалася. Заміни на глутамінову кислоту залишків Lys79, Lys81, Lys83 і Lys84 в SEA/E-65 приводили до рівня синтезу лише 1,5мг/л. Через те, що ефект реактивності з антитілами знижувався на 43%, в порівнянні з SEA/E-18, була зроблена спроба виявити кращі заміни. Найкраще поєднання з точки зору продукції і зниженої реактивності з антитілами, виявлено для SEA/E-18 з сериновими залишками в положенні 83 і 84 і збереженою глутаміною кислотою в положеннях 79 і 81 (Таблиця 1). У порівнянні з SEA/E-18 рівень синтезу виявлявся вище в десять разів, а реактивність з антитілами знижувалася на 41% (Таблиця 1). Рівень синтезу виявляється також зниженим більш ніж в десять разів при замінах Lys217Thr, Asn220Ala, Glu222Thr, Asn223Ala, His225Ala і Asp227Ala в SEA/E-62 до 1,0мг/л. Разом з тим, замінивши аланінові заміни на серинові залишки, що приводило до SEA/E-97, одержували рівень синтезу в 48мг/мл (Таблиця 1).

Цікаво зазначити, що при об'єднанні SEA/E-65 з більшістю варіантів, такими як SEA/E-63 і модифікованим SEA/E-74, також як і SEA/E-91, повертався низький рівень продукції до 12мг/л (Таблиця 1). З іншого боку, рівень експресії суперантигенного варіанту SEA/E-110 складав, відповідно, лише 0,5мг/л і 14мг/л. Але рівень продукції SEA/E-110 зростає до 30мг/л при видаленні замін Asp 174Ala, His87Ala, Ser188Thr, Ser189Asp, Glu190Ala і Gln204Thr, що створюють SEA/E-120 (Таблиця 1).

Введення великого числа замін в суперантиген може створити проблеми для експресії E.coli. Для цього існує, щонайменше, три різних механізми: знижена термодинаміка, порушення структури природного укладання або протеолітичні сайти, що знову вводяться. Хоча метою даного дослідження було видалення антигенних епітопів з поверхні, які б з великою імовірністю не заважали яким-небудь структурним основним ланцюгам, завжди існує імовірність того, що для підтримки стабільності нові структури будуть залежати від інших залишків, а не від конструкції дикого типу. Тому, постійно створювалися нові комп'ютерні моделі для прогнозування або підтвердження місцезнаходження замінених залишків в даній новій структурі. Таким чином, автори даного винаходу могли ідентифікувати відповідальні залишки в ранніх суперантигенних варіантах, що обумовили труднощі, у відношенні, наприклад, експресійних рівнів, і створити поліпшені варіанти або із залишками дикого типу, або з кращими замінами (Таблиця 1).

На закінчення, для здійснення більш високого рівня синтезу необхідно залишки Lys83, Lys84, Asn220, Asn223, His225 і Asp227 замінити на серин, але не на аланін. Крім того, щоб виключити зниження експресійних рівнів, необхідно зберегти залишки Lys35, Asp173, His187, Ser188, Ser189, Glu190 і Gln204.

Приклад 10

Оцінка біологічної функції у різних Sac-варіантів

Оскільки суперантигени спочатку створювалися для протипухлинної терапії [Dohlsten і співавт., 1994],

було важливо виключити в нових суперантигенних варіантах заміни, що знижують протипухлинну цитотоксичність. Тому, у всіх нових суперантигенних варіантів в SADCC-аналізі вимірювали здатність, яка опосередковує цю протипухлинну цитотоксичність (Фіг.3). Крім того, в SDCC-аналізі вимірювали ефективність суперантигенів опосередковувати знищення Т-клітинами загибелі клітин, які експресують молекули МНС класу II, що має своїм результатом системну цитотоксичність, яка могла б викликати побічні ефекти (Фіг.3). Для клінічного використання SDCC потрібно, ймовірно, знизити, щоб збільшити терапевтичне вікно.

Сама перша група SAg-варіантів володіла тим же рівнем специфічної протипухлинної цитотоксичної потенції, що і SEA/E-18 (Таблиця 1). Виключенням були SEA/E-75 із замінами Lys74Thr, Asp75Ala і Asn78Ser, активність якого виявлялася десятиразово зниженою, і SEA/E-64, із замінами Glu34Lys, Lys35Glu, Glu39Lys, Asn40Ser, Lys41Glu і Glu42Lys, активність якого виявлялася п'ятикратно зниженою в порівнянні з SEA/E-18 (Таблиця 1). Цікаво, що знижена активність у SEA/E-75 спостерігалася лише в даному варіанті, але в поєднанні з подальшими замінами, наприклад, у SEA/E-109, виявлялася повна активність (Таблиця 1). Крім того, SDCC-активність незмінна у SEA/E-75 при порівнянні з SEA/E-18. Тому, ймовірно заміни Lys74Thr, Asp75Ala і Asn78Ser порушують взаємодії, істотні виключно для антитілозалежної цитотоксичності.

Більшість описаних тут суперантигенних варіантів демонстрували виразне зниження SDCC. У порівнянні з SEA/E-18 у початкових варіантів SEA/E-62, SEA/E-63, SEA/E-64, SEA/E-65 і SEA/E-74 спостерігалася неістотне зменшення SDCC-активності.

Всі суперантигенні варіанти містили заміщений залишок Asp227Ala або Ser. Відомо, що дане заміщення знижує спорідненість до молекул МНС класу II в 100 разів, а отже, і SDCC-активність [Abrahmsen і співавт., 1995]. Однак, оскільки SAg-варіант SEA/E-109 з N-кінцевими замінами демонстрував більше зменшення в порівнянні з SEA/E-18, ніж SEA/E 113 з C-кінцевими замінами, це свідчило про те, що в SEA/E-109 додаткові залишки були замінені, які істотні для SDCC, і, ймовірно, пов'язані з МНС класу II (Фіг.8).

Таким чином, залишки, які зумовлювали найбільше зниження, були Lys79Ser і Lys81Ser в SEA/E-83, і заміна Asp45Ala в SEA/E-74. Більшість цих заміन розташовується навколо залишків, які, як було показано раніше, взаємодіють з МНС класу II [Abrahmsen і співавт., 1995].

Приклад 11

Створення нового суперантигенного варіанту

З метою створення оптимального суперантигенного варіанту були об'єднані всі сприятливі заміни, що приводять до найкращого SEA/E-120 (Фіг.4 і Фіг.9).

По-перше, були зібрані все відповідні C-кінцеві модифікації, тобто, Asp173Ala, Ser189Thr, Glu190Ala, Lys217Thr, Asn220Ser, Glu222Thr, Asn223Ser, His225Ser і Asp227Ser, утворюючи разом з Gln204Thr SAg-варіант SEA/E-113. Даний варіант виявляв очікуване зниження реактивності з антитілами проти SEA і прийнятний рівень експресії, але з дещо зменшеною біологічною активністю (Таблиця 1, Фіг.7 і Фіг.8А і Фіг.8В). Все відповідні N-кінцеві заміни, тобто, Glu34Ser, Glu39Ser, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys, Asp44Ala, Glu49T, Lys74T, Asn78Ser, Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Ser і Lys84Ser були зібрані в SEA/E-109. У цьому суперантигенному варіанті спостерігалася явне зниження анти-SEA-реактивності, нарівні з високим рівнем експресії і навіть поліпшеним біологічним профілем (Таблиця 1, Фіг.7 і Фіг.8А і Фіг.8В). Однак, при створенні об'єднання цих двох варіантів SEA/E-113 і SEA/E-109 в SEA/E-110, відбувалася істотна втрата і продукції і біологічної функції (Таблиця 1). Біологічна ефективність повністю відновлювалася, якщо в SEA/E-115 знову використовували залишки дикого типу Ser189, Glu190 і Gln204 (Таблиця 1), але рівень продукції все ж залишався низьким. Молекулярне моделювання даного варіанту дає підставу вважати, що залишки Asp 173, His187 і Ser188 могли б бути істотними для стабілізації укладання, а згодом приводити і до більш високої продукції.

Для оцінки цих залишків, було створено декілька різних поєднань, що проводять до SEA/E-118, SEA/E-119, SEA/E-120, SEA/E-121 і SEA/E-122 (Таблиця 1). Найвищий синтез одержували для SEA/E-120 із залишками дикого типу у всіх трьох позиціях. Разом з раніше створеними SEA/E-21, SEA/E-74, SEA/E-97, SEA/E-108 і SEA/E-109, вони являють собою SAg-варіанти з рівнями експресії, що перевищують 20мг/л (Таблиця 1). Істотних відмінностей в біологічній активності або реактивності з антитілами між цими варіантами не відмічено.

Створення нового кон'югату

SEA/E-120 генетично зливали з Fab-компонентом антитіла, реагуючого з пухлиною, яке являє собою 5T4 (Dohlsten і співавт., 1994) (Фіг.10).

Антиген 5T4 експресується у множині різноманітних пухлин, таких як недрібноклітинна злоякісна пухлина легень, злоякісна пухлина молочної залози, гіпернефродна злоякісна пухлина, злоякісна пухлина підшлункової залози, злоякісна пухлина яєчника і злоякісна пухлина прямої кишки. Заміни в послідовності дикого типу 5T4 також здійснювали для одержання більш високого виходу. У важкому ланцюгу: His41Pro, Ser44Gly, Ile69Thr і Val113Gly; в легкому ланцюгу: Phe10Ser, Thr45Lys, Ile63Ser, Phe73Leu, Thr77Ser, Leu78Val і Leu83Ala.

Незважаючи на докладний опис даного винаходу, і його переваг, потрібно мати на увазі, що різні зміни, заміни і варіації можуть бути внесені в нього, не виходячи за рамки суті і об'єму даного винаходу, які визначені прикладеною формулою винаходу. Крім того, об'єм даної заявки не передбачається обмежити конкретними варіантами здійснення процесу, пристрою, виготовлення, композиції, засобів, методів і стадій, представлених в даному описі. Кожному фахівцеві в даній області техніки з представленого опису даного винаходу очевидно, що процеси, пристрої, виробництво, композиції, засоби, методи або стадії, нині існуючі або створені пізніше, які, в основному, виконують одне і те ж призначення або по суті досягають одного і того ж результату, як описані тут відповідні варіанти здійснення, можуть бути використані відповідно до даного винаходу. Отже, прикладену формулу винаходу мається намір включити в об'єм таких процесів, пристроїв, виробництва, композицій, засобів, методів або стадій.

Кожному фахівцеві в даній області ясно, що даний винахід добре адаптований для здійснення поставлених цілей і одержання вказаних, а також властивих йому, результатів і переваг. Композиції, способи,

операції і методики, описані тут, являють собою переважні варіанти здійснення даного винаходу і, як мається на увазі, є ілюстративними, а не такими, що обмежують об'єм винаходу. У цьому відношенні зміни і інші використання будуть мати місце у фахівців в даній області техніки, що і включені в суть даного винаходу або визначаються пунктами патентної формули.

Список літератури, що цитується:

Всі патенти і публікації, вказані в описі, свідчать про рівень фахівців в даній області техніки, які стосуються даного винаходу. Всі патенти і публікації, включені тут шляхом посилання, так само як і індивідуальні публікації, були в зв'язку з цим і індивідуально вказані для включення шляхом посилання.

U.S. Patent 4,554,101.

U.S. Patent 5,221,605.

U.S. Patent 5,238,808.

U.S. Patent 5,798,208.

U.S. Patent 5,830,650.

U.S. Patent 5,220,007.

U.S. Patent 5,284,760.

U.S. Patent 5,354,670.

U.S. Patent 5,366,878.

U.S. Patent 5,389,514.

U.S. Patent 5,635,377.

U.S. Patent 5,789,166.

U.S. Patent 5,446,128.

U.S. Patent 5,710,245.

U.S. Patent 5,840,833.

U.S. Patent 5,859,184.

U.S. Patent 5,440,013.

U.S. Patent 5,618,914.

U.S. Patent 5,670,155.

U.S. Patent 5,475,085.

U.S. Patent 5,929,237.

U.S. Patent 5,672,681.

U.S. Patent 5,674,976.

U.S. Patent 4,608,251.

U.S. Patent 4,601,903.

U.S. Patent 4,599,231.

U.S. Patent 4,599,230.

U.S. Patent 4,596,792.

U.S. Patent 4,578,770.

Abrahamsen L., et al. EMBO J. 14: 2978-86, 1995.

Alpaugh R. K., et al. Clin Cancer Res. 4: 1904-14, 1998.

Antonsson P., et al. J Immunol 158: 4245-51, 1997.

Bangham et al., J. Mol. Biol., 13: 238-252, 1965.

Bird et al., Science. 242: 423-6, 1988.

Braisted et al, Proc Natl Acad Sci USA. 93 (12): 5688-92, 1996.

Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA. 94(2): 412-7, 1997.

Capaldi et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 76:425, 1977.

Cavallin A., et al. J Biol Chem. 275: 1665-72, 2000.

Cunningham et al. Science. 244 (4908): 1081-5, 1989.

Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, 1986.

Dohlsten M., et al. Proc Natl Acad Sci USA. 91: 8945-9, 1994.

DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE, G. Gregoriadis ed. (1979) pp.287-341.

Hakansson, M. et al. J Mol Biol. 302: 527-37, 2000.

Harlow, et al. Antibodies: A Laboratory Manual, 1988.

Johannesson et al., J. Med. Chem. 42: 601-608, 1999.

Kaneda et al., J Biol Chem., 264 (21): 12126-12129, 1989.

Kato et al., J Biol Chem., 266(6): 3361-3364, 1991.

Nicolau et al., Methods Enzymol., 149: 157-176, 1987.

Papageorgiou A. C. et al. Trends in Microbiology 8: 369-375, 2000.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, Chapter 61, pages 1035-1038 and 1570-1580.

Sambrook et. al., In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., 1989.

Schad E. M., et al. EMBO J. 14: 3292-3301, 1995.

Short et al., J Biol Chem. 270(48): 28541-50, 1995.

Sundstrom M, et al. EMBO J. 15: 6832-40, 1996 A.

Sundstrom M., et al. J Biol Chem 271: 32212-16, 1996 B.

Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 4194-4198, 1978.

Vita et al., Biopolymers 47: 93-100, 1998.

Warren et al., Biochemistry 35 (27): 8855-62, 1996.

Weisshoff et al., Eur. J. Biochem. 259: 776-788, 1999.

Wells et al., Methods. 10(1): 126-34, 1996.

Wong et al., Gene, 10: 87-94, 1980.

Yelton et al., J Immunol. 155 (4): 1994-2004, 1995.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> FORSBERG, GORAN
ERLANDSSON, EVA
ANTONSSON, PER
WALSE, BJORN

<120> Новий біотехнологічно створений суперантиген для лікування людини

<130> P02188US0;10104199

<140> TBA

<141> 2001-06-20

<160> 7

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 672

<212> PRT

<213> синтетична послідовність

<220>

<221> пептид

<222> (1)..(672)

<223> білок-кон'югат

<400> 1

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20     25     30
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35     40     45
Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe
50     55     60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65     70     75     80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85     90     95

```

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
~~Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val~~
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Ser Gly Gly
 210 215 220
 Pro Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys
 225 230 235 240
 Ser Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr
 245 250 255
 Tyr Asn Ser Lys Ala Ile Thr Ser Ser Glu Lys Ser Ala Asp Gln Phe
 260 265 270
 Leu Thr Asn Thr Leu Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Gly His Pro Trp
 275 280 285
 Tyr Asn Asp Leu Leu Val Asp Leu Gly Ser Thr Ala Ala Thr Ser Glu
 290 295 300
 Tyr Glu Gly Ser Ser Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln
 305 310 315 320
 Cys Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val
 325 330 335
 Thr Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile
 340 345 350
 Asn Leu Trp Ile Asp Gly Lys Gln Thr Thr Val Pro Ile Asp Lys Val
 355 360 365
 Lys Thr Ser Lys Lys Glu Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala
 370 375 380
 Arg His Tyr Leu His Gly Lys Phe Gly Leu Tyr Asn Ser Asp Ser Phe
 385 390 395 400
 Gly Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Ser Ser Glu Gly
 405 410 415
 Ser Thr Val Ser Tyr Asp Leu Phe Asp Ala Gln Gly Gln Tyr Pro Asp
 420 425 430
 Thr Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Thr Thr Ile Ser Ser Thr Ser
 435 440 445
 Leu Ser Ile Ser Leu Tyr Leu Tyr Thr Thr Ser Ile Val Met Thr Gln
 450 455 460

Thr Pro Thr Ser Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 465 470 475 480
 Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln
 485 490 495
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Ser Arg
 500 505 510
 Tyr Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp
 515 520 525
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr
 530 535 540
 Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 545 550 555 560
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe
 565 570 575
 Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys
 580 585 590
 Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile
 595 600 605
 Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln
 610 615 620
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr
 625 630 635 640
 Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His
 645 650 655
 Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Ser
 660 665 670

<210> 2

<211> 233

<212> PRT

<213> синтетична послідовність

<220>

<221> пептид

<222> (1)..(233)<223> химерний білок

<400> 2

Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Ser Lys Ala Ile Thr Ser Ser Glu Lys Ser Ala Asp Gln Phe Leu
 35 40 45

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

<210> 3

<211> 233

<212> PRT

<213> синтетична послідовність

<220>

<221> пептид

<222> (1) . . (233)

<223> химерний білок

<400> 3

Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Glu Lys Ala Ile Thr Glu Asn Lys Glu Ser Asp Asp Gln Phe Leu
 35 40 45

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

<210> 4

<211> 233

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 4

Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Glu Lys Ala Lys Thr Glu Asn Lys Glu Ser His Asp Gln Phe Leu
 35 40 45
 Gln His Thr Ile Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Asp His Ser Trp Tyr
 50 55 60
 Asn Asp Leu Leu Val Asp Phe Asp Ser Lys Asp Ile Val Asp Lys Tyr
 65 70 75 80
 Lys Gly Lys Lys Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr
 100 105 110
~~Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn~~
~~115 120 125~~
 Leu Trp Leu Asp Gly Lys Gln Asn Thr Val Pro Leu Glu Thr Val Lys
 130 135 140
 Thr Asn Lys Lys Asn Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg
 145 150 155 160
 Arg Tyr Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Ser Asp Val Phe Asp
 165 170 175
 Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Thr Ser Thr Glu Pro
 180 185 190
 Ser Val Asn Tyr Asp Leu Phe Gly Ala Gln Gly Gln Tyr Ser Asn Thr
 195 200 205
 Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn Met
 210 215 220
 His Ile Asp Ile Tyr Leu Tyr Thr Ser
 225 230

<210> 5

<211> 203

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 5

Ala Leu His Lys Lys Ser Glu Leu Ser Ser Thr Ala Leu Asn Asn Met
 1 5 10 15
 Lys His Ser Tyr Ala Asp Ala Asn Pro Ile Ile Gly Ala Asn Lys Ser
 20 25 30
 Thr Gly Asp Gln Phe Leu Glu Asn Thr Leu Leu Tyr Lys Ala Phe Phe
 35 40 45
 Leu Leu Ile Asn Phe Asn Ser Ala Glu Met Ala Gln His Phe Lys Ser
 50 55 60
 Lys Asn Val Asp Val Tyr Ala Ile Arg Tyr Ala Ala Ala Cys Arg Thr
 65 70 75 80
 Ala Cys Thr Tyr Gly Gly Val Thr Pro His Ala Gly Asn Ala Leu Lys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Lys Ile Pro Ile Asn Leu Trp Ile Ile Gly Val Gln Lys
 100 105 110
 Glu Val Ser Leu Asp Lys Val Gln Thr Asp Lys Lys Asn Val Thr Val
 115 120 125
 Gln Glu Leu Asp Ala Gln Ala Arg Arg Tyr Leu Gln Lys Asp Leu Lys
 130 135 140
 Leu Tyr Asn Ala Ile Gln Arg Gly Lys Leu Glu Phe Asp Ser Ala Ala
 145 150 155 160

Ala Ser Lys Val Ser Tyr Asp Leu Phe Asp Val Ala Gly Asp Phe Pro
165 170 175
Glu Lys Gln Leu Arg Ile Tyr Ser Asp Asn Lys Thr Leu Ser Thr Glu
180 185 190
His Leu His Ile Asp Ile Tyr Leu Tyr Glu Ala
195 200

<210> 6

<211> 217

<212> PRT

<213> staphylococcus sp.

<400> 6

Glu Asp Leu His Asp Lys Ser Glu Leu Thr Asp Leu Ala Leu Ala Asn
1 5 10 15
Ala Tyr Gly Gln Tyr Asn His Pro Phe Ile Lys Glu Asn Ile Lys Ser
20 25 30
Asp Glu Ile Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ile Phe Arg Asn Gln Gly Asp
35 40 45
Ser Gly Asn Asp Leu Arg Val Lys Phe Ala Thr Ala Asp Leu Ala Gln
50 55 60
Lys Phe Lys Asn Lys Asn Val Asp Ile Tyr Gly Ala Ser Phe Tyr Tyr
65 70 75 80
Lys Cys Glu Lys Ile Ser Glu Asn Ile Ser Glu Cys Leu Tyr Gly Gly
85 90 95
Thr Thr Leu Asn Ser Glu Lys Leu Ala Gln Glu Arg Val Ile Gly Ala
100 105 110
Asn Val Trp Val Asp Gly Ile Gln Lys Glu Thr Glu Leu Ile Arg Thr
115 120 125
Asn Lys Lys Asn Val Thr Leu Gln Glu Leu Asp Ile Lys Ile Arg Lys
130 135 140
Ile Leu Ser Asp Lys Tyr Lys Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Glu Ile Ser
145 150 155 160
Lys Gly Leu Ile Glu Phe Asp Met Lys Thr Pro Arg Asp Tyr Ser Phe
165 170 175
Asp Ile Tyr Asp Leu Lys Gly Glu Asn Asp Tyr Glu Ile Asp Lys Ile
180 185 190
Tyr Glu Asp Asn Lys Thr Leu Lys Ser Asp Asp Ile Ser His Ile Asp
195 200 205
Val Asn Leu Tyr Thr Lys Lys Lys Val
210 215

<210> 7

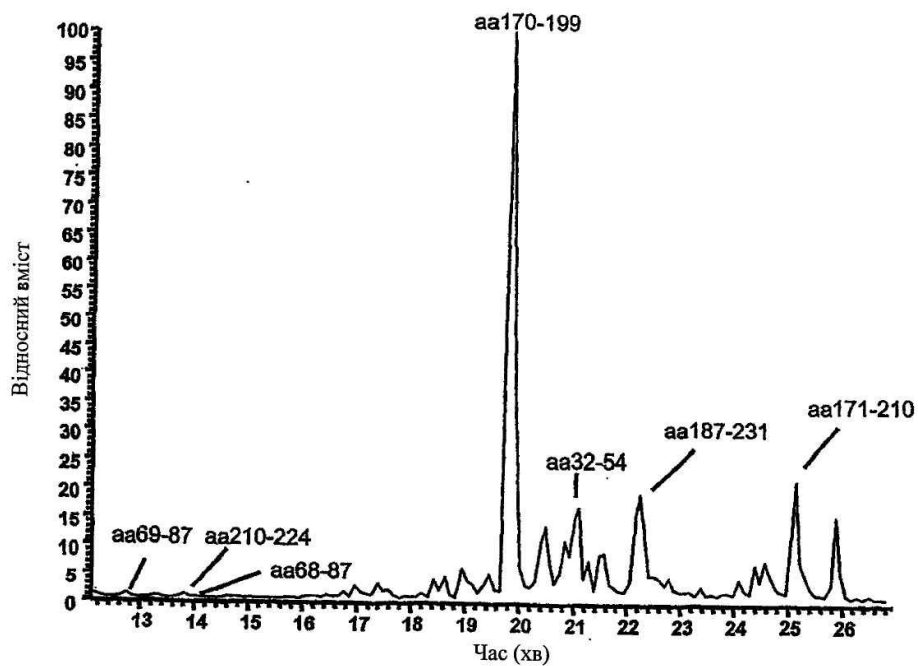
<211> 233

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 7

Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser
1 5 10 15
Glu Leu Gln Arg Asn Ala Leu Ser Asn Leu Arg Gln Ile Tyr Tyr Tyr
20 25 30
Asn Glu Lys Ala Ile Thr Glu Asn Lys Glu Ser Asp Asp Gln Phe Leu
35 40 45
Glu Asn Thr Leu Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Gly His Pro Trp Tyr
50 55 60
Asn Asp Leu Leu Val Asp Leu Gly Ser Lys Asp Ala Thr Asn Lys Tyr
65 70 75 80
Lys Gly Lys Lys Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys
85 90 95
Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr
100 105 110
Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn
115 120 125
Leu Trp Ile Asp Gly Lys Gln Thr Thr Val Pro Ile Asp Lys Val Lys
130 135 140
Thr Ser Lys Lys Glu Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg
145 150 155 160
His Tyr Leu His Gly Lys Phe Gly Leu Tyr Asn Ser Asp Ser Phe Gly
165 170 175
Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Ser Ser Glu Gly Ser
180 185 190
Thr Val Ser Tyr Asp Leu Phe Asp Ala Gln Gly Gln Tyr Pro Asp Thr
195 200 205
Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn Leu
210 215 220
His Ile Asp Leu Tyr Leu Tyr Thr Thr
225 230



Фиг. 1

1 6 11 16 21 26 31 36 41 46

SEQ ID NO: 2 1-50 SEKSEFINEKDLRKKSELQGTALGNLKQIYYNSKAITSSSEKSADQFLTN

51-100 TLLFKGFFTGHWPYNDLLVDLGSTAATSEYEGSSVDLYGAYYGYQCAGGT

101-150 PNKTACMYGGVTLEDNNRLTEKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEV

151-200 TVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQRGLIVFHSSEGSTVSYDLFD

201-233 AQQQYPDTLLRIYRDNTTISSTLSISLYLYTT

Фиг. 2

SEQ ID NO: 3 SEAE18: SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN---EKAITENKESDDQF
 SEQ ID NO: 4 SEA : SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN---EKAITENKESDDQF
 SEQ ID NO: 5 SED : ALHKKSELSSTALNNMKHSYADA---NPIIGANKSTGDQF
 SEQ ID NO: 6 SEH : EDLHDKSELTDLALANAYGOYNHFFIKENIKSDEISGEKDL

SEAE18: LENTLLFKGFFTGHPWINDLLVLDLGSKDATNKYKGGKVDLYGAYGYQCA
 SEA : LQHTILFKGFFTDHWSYNDLLVDFDSKDIVDKYKGGKVDLYGAYGYQCA
 SED : LENTLLYKAF-----LLINFNSAEMAQHFKSKNVVYAIRYAAAC
 SEH : IFRNOGDSG-----NDLRVKFATADLAQKFKKNVVDIYGASFYKCE

SEAE18: GGTFNKTACMYGGVTLEHNNRLTEKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSK
 SEA : GGTFNKTACMYGGVTLEHNNRLTEKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSK
 SED : ---RTACTYGGVTPHAGNALKARKKIPINLWIIIGVQKEVSLDKVQTDK
 SEH : KISENISECLYGTTLN---SEKLAQERVIGANVWVDGIQKETE---LIRTNK

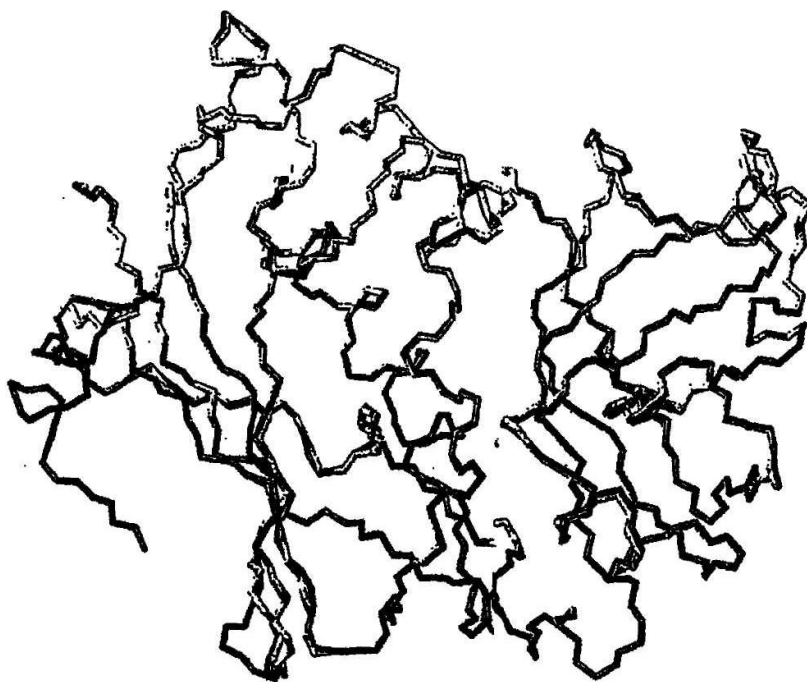
SEAE18: KEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQGLIVFHSSEGSTVSYD
 SEA : KNVTVQELDLQARRYLOERYNLNSDVFQDKVQGLIVFHTSTEPSVNYD
 SED : KNVTVQELDLQARRYLOKDKLYN-----AIQRGKLEFDSAAASKVSYD
 SEH : KNVTLQELDIKIRKILSDKYKIYY---KQSEISKGLIEFDMKTPRDYSFD

SEAE18: LFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN-LHIALYLYTT
 SEA : LFDAQGGYSNTLLRIYRDNKTINSEN---HIDIYLYTS
 SED : LFDVAGDFPEKQLRIYSDNKTLSH---HIDIYLYEA
 SEH : TYDLKGENDYEIDKIYEDNKTLSDDISHIDVNLTYKKKV

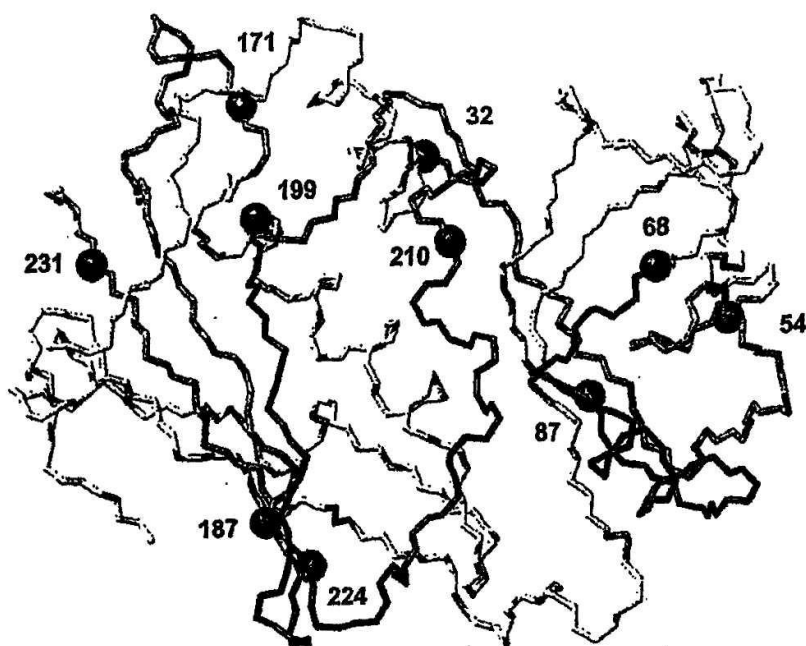
Fig. 3

SEQ ID NO: 2	SEA/E-120	SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN	A	SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN	B	SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN	60
SEQ ID NO: 3	SEA/E-18	SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN		SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN		SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN	60
SEQ ID NO: 7	SEE	SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN		SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN		SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN	60
SEQ ID NO: 4	SEA	SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN		SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN		SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQIYYYN	60
		*****		*****		*****	
	SEA/E-120	HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT	C	HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT		HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT	120
	SEA/E-18	HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT		HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT		HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT	120
	SEE	HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT		HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT		HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT	120
	SEA	HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT		HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT		HPWYNLLVLDLGSSTAATSEYEGSSVDLYGAYGYQCAGGTPNKTACMYGGVTLEHNNRLT	120
		*****		*****		*****	
	SEA/E-120	EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ		EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ		EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ	180
	SEA/E-18	EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ		EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ		EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ	180
	SEE	EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ		EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ		EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ	180
	SEA	EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ		EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ		EKKKVPINLWIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ	180
		*****		*****		*****	
	SEA/E-120	RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN	D	RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN	E	RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN	233
	SEA/E-18	RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN		RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN		RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN	233
	SEE	RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN		RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN		RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN	233
	SEA	RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN		RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN		RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAQGGYPTLLRIYRDNKTINSEN	233
		*****		*****		*****	

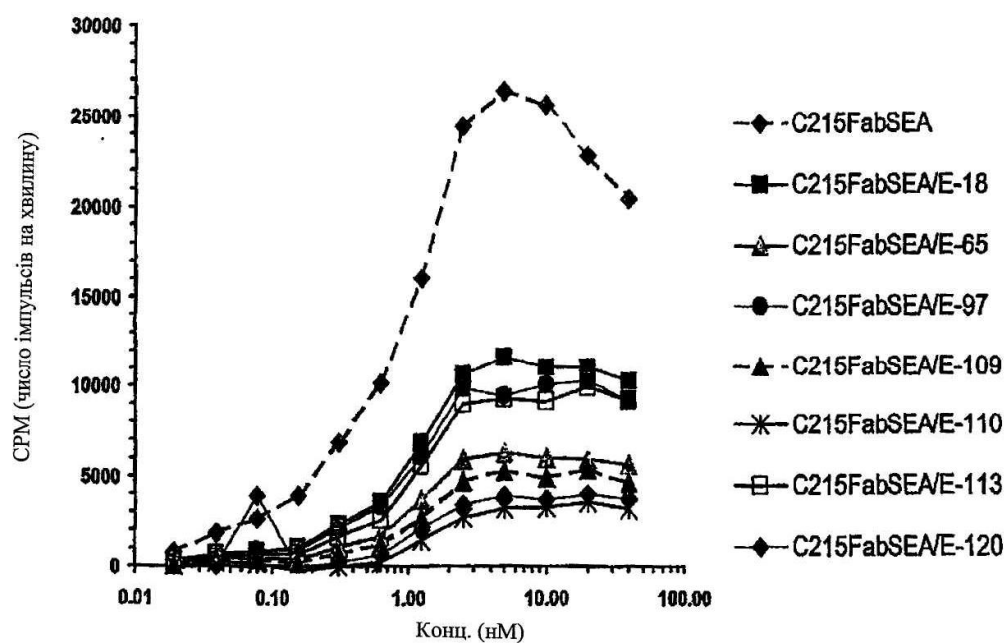
Fig. 4



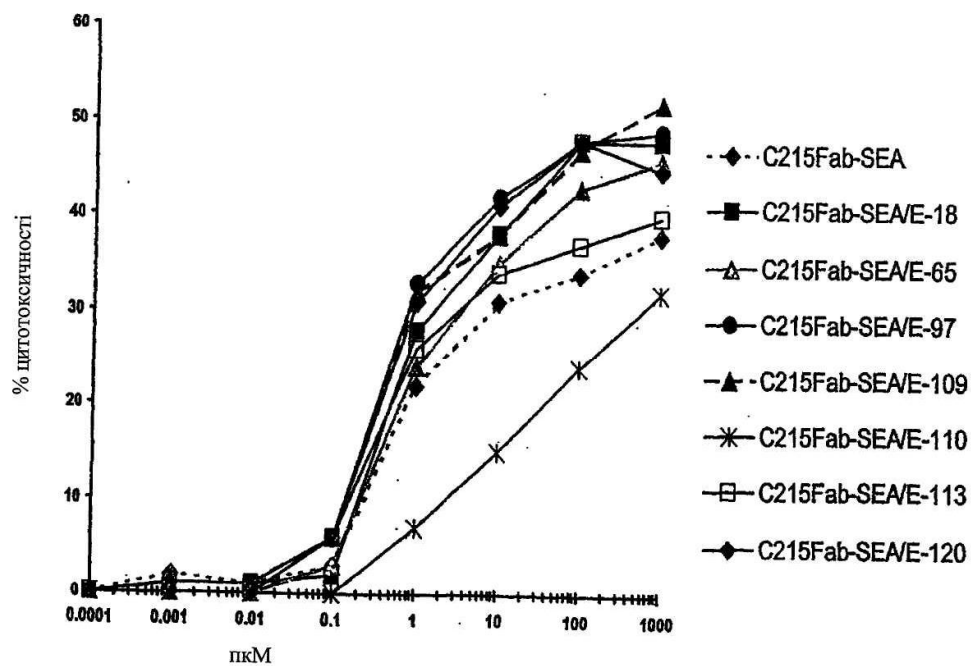
Фиг. 5



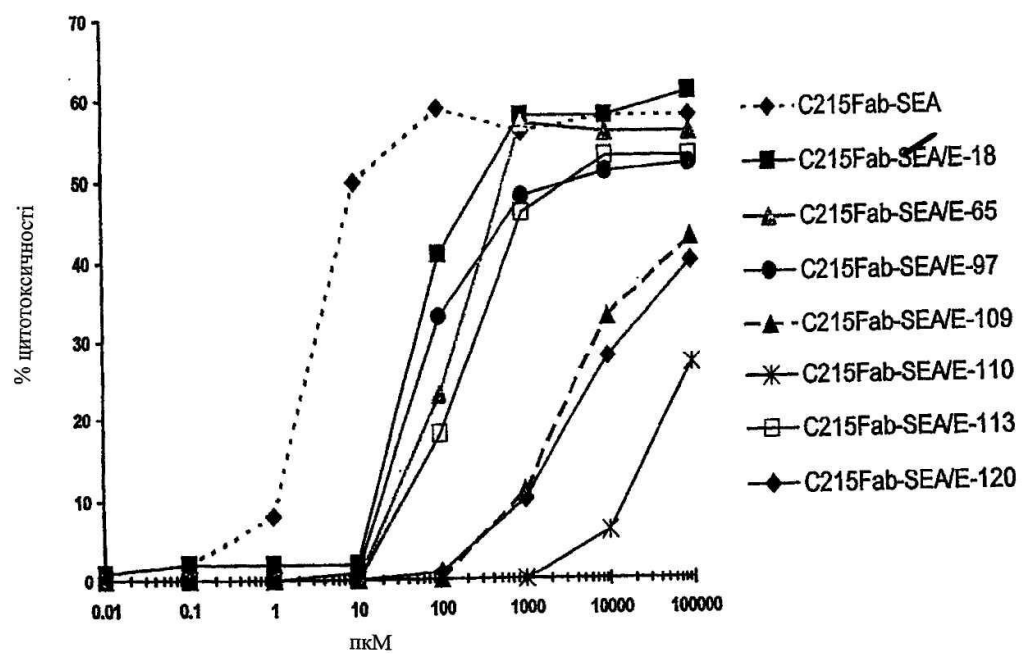
Фиг. 6



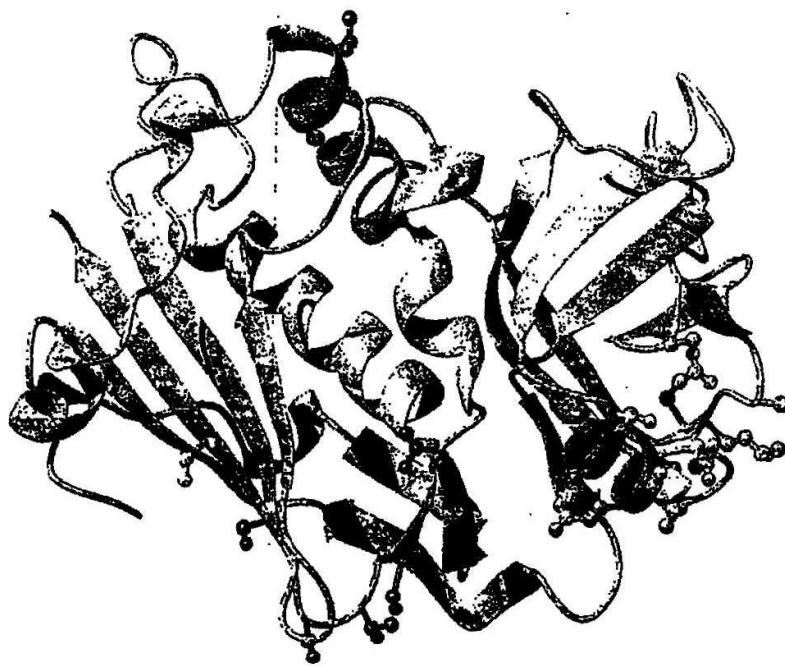
Фіг. 7



Фіг. 8A



Фиг. 8В



Фиг. 9

Варіабельна ділянка важкого ланцюга

SEQ ID NO: 1 1-50

51-100

101-150

151-200

201-250

251-300

301-350

351-400

401-450

451-500

501-550

551-600

601-650

651-672

EVQLQ QSGPD LVKPG ASVKI SCKAS GYSFT GYUWH WVKQS PGKGL EWIGR
 INPNN GVTLY NQKPK DKATL TVDKS STTAY MELRS LTSED SAVYY CARST
 MITNY VMDYW GQGTG VIVSS AKITP PSVYP LAPGS AAQTN SMVTL GCLVK
 GYFPE FVTVT WNSGS LSSGV HTFPA VLQSD LYTLS SSVTV PSSTW PSETV
 TCNVA HPASS TKVDK KIVER DSGGP SEKSE RINEK DLKKK SELQG TALGN
 LKQIY YNSK AITSS EKSAD QFLTN TLLPK GFPTG HPWYN DLLVD LGSTA
 ATSEY EGSSV DLYGA YYGYQ CAGGT PNKTA CMYGG VTLHD NNRLT EEKKV
 PINLW IDGKQ TTVPI DKVKT SKKEV TVQEL DLQAR HYLHG KFGLY NSDSF
 GGVQV RGLIV FHSSE GSTVS YDLFD AQGOY FDTLL RIYRD NITIS STSLG
 ISLYL YTTSI VMTQT PLSLL VSAGD RVTIT CKASQ SVSND VAWYQ QKPGQ
 SPKLL ISYTS SRYAG VPDRF SGSGY GTDFT LTISS VQAEV AAVYF CQQDY
 NSPPT FGGGT KLBK RADAA PTVSI FPPSS EQLTS GGASV VCFIN NFYPK
 DINVK WKIDG SRQON GVINS WTDQD SKDST YSMSS TLTLT KORYE RHNSY
 TCEAT HKTST SPIVK SFNRN ES