

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

(11) **65066 B1**

(51) Int. Cl.

C 12 N 5/10 (2006.01)
C 12 N 15/62 (2006.01)
C 12 N 15/85 (2006.01)
C 07 K 16/46 (2006.01)
C 07 K 19/00 (2006.01)
A 61 K 39/395 (2006.01)
A 61 K 48/00 (2006.01)
G 01 N 33/577 (2006.01)
C 07 K 16/28 (2006.01)

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 104868
(22) Заявено на 17.10.2000
(24) Начало на действие
на патента от: 21.04.1999

Приоритетни данни

(31) 98107269.7 (32) 21.04.1998 (33) DE

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 9 на 28.09.2001
(45) Отпечатано на 31.01.2007
(46) Публикувано в бюлетин № 1
на 31.01.2007
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):
**MICROMET AG, 82152 MARTINSRIED,
FORSCHUNG. MBH,
AM KLOPFERSPITZ 19 (DE)**

(72) Изобретател(и):
**Bernd Dorken, Berlin
Gert Riethmuller, Munich
Peter Kufer, Moosburg
Ralf Lutterbuse, Munich
Ralf Bargou, Berlin
Anja Loffler, Finowfurt/Eichhorst (DE)**

(74) Представител по индустриална собственост:
**Фани Владимирова Божинова,
1000 София, п. к. 728**

(86) № и дата на РСТ заявка:
РСТ/EP1999/002693, 21.04.1999

(87) № и дата на РСТ публикация:
WO1999/054440, 28.10.1999

(54) CD19 X CD3 СПЕЦИФИЧНИ ПОЛИПЕПТИДИ И ТЯХНОТО ПРИЛОЖЕНИЕ

(57) Едноверижните мултифункционални полипептиди включват поне два сайта на свързване, съответно специфични за CD19 и CD3 антигена, и поне един допълнителен домен, за предпочитане с предтерминирани функции. Изобретението се отнася и до полинуклеотидите, кодиращи тези полипептиди, до вектори, които включват посочените полинуклеотиди, и клетки гостоприемници, трансформирани с посочените полинуклеотиди, и до тяхното използване при производството на посочените полипептиди. Създадени са също фармацевтични и диагностични състави, включващи който и да е от посочените полипептиди, полинуклеотиди и вектори, за изготвянето на фармацевтични състави за имунотерапия, по-специално срещу В-клетъчни злокачествени образувания, например не-Hodgkin лимфома.

28 претенции, 22 фигури

BG 65066 B1

(54) CD19 X CD3 СПЕЦИФИЧНИ ПОЛИПЕПТИДИ И ТЯХНОТО ИЗПОЛЗВАНЕ

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до нови едноверижни мултифункционални полипептиди, включващи поне два сайта на свързване, специфични за CD19 и CD3 антигена, съответно. Предоставят се освен това и полипептиди, като долуописаният полипептид включва поне един допълнителен домен, за предпочитане с предетерминирани функции. Освен това, изобретението се отнася, също така до полинуклеотидите, кодиращи тези полипептиди, както и вектори, които включват посочените полинуклеотиди и клетки гостоприемници, трансформирани с посочените полинуклеотиди, както и тяхното използване при производството на посочените полипептиди. В допълнение се предоставят също и състави, за предпочитане фармацевтични и диагностични състави, включващи кой да е от горе описаните полипептиди, полинуклеотиди и вектори за изготвянето на фармацевтични състави за имуноterapia, за предпочитане срещу В-клетъчни злокачествени образувания, като не-Hodgkin лимфома.

В текста на настоящото изобретение са цитирани известен брой документи. Всеки от тук цитираните документи (включително и описания от производителя, инструкции, и др.) са включени в настоящото за справка; въпреки това не се приема който и да е от цитираните документи като действително ниво на настоящото изобретение.

Предшестващо състояние на техниката

Въпреки важноста за медицината, изследванията върху медираните от В-клетки заболявания, като не-Hodgkin лимфома, са довели само до малък брой данни, използвани в клиниката, и конвенционалните подходи за лечение на такива заболявания остават досадни и неприятни и/или съществува голям риск от повтаряне на болестта. Например, въпреки че високата доза химиотерапия като първично лечение за тежка степен не-Hodgkin лимфома не може да подобри преживяемостта, приблизително 50% от пациентите все още умират от това заболяване

[2-4]. Освен това, лека степен на не-Hodgkin лимфома - подобна хронична лимфатична левкемия и клетъчна лимфома все още са нелечими. Това стимулира търсенето на алтернативни стратегии, като имуноterapia. Антитела насочени срещу молекулите от клетъчната повърхност, дефинирани от CD антиген представляват единствена възможност за развитието на терапевтични средства.

Експресията на някои CD антигени силно се ограничава до специфични линии лимфохематопоеични клетки и през изминалите няколко години, антителата насочени срещу лимфоид-специфични антигени са били използвани за да се развият лечения, които да бъдат ефективни било то *in vitro* или при животински модели [5-13]. С оглед на това, CD19 е доказал, че е изключително полезна мишена. CD19 се експресира в цялата В линия от про В клетката до зрялата В клетка, не се изменя, еднакво се експресира във всички лимфомни клетки и отсъства от стволовите клетки [8,14]. Интересна модификация е прилагането на биспецифично антитяло с една специфичност на CD19, а другата за CD3 антигена върху Т-клетките. Въпреки това, биспецифичните антитела предоставени по този начин страдат от ниска Т-клетъчна цитотоксичност и липса на костимулиращи средства, с цел да се представи задоволителна биологична активност.

Следователно, техническият проблем подчертаващ настоящото изобретение е да се предоставят средства и методи, полезни при третирането на В-клетъчно медираните заболявания като различни форми на не-Hodgkin лимфома. Решението на такъв технически проблем се постига чрез предоставяне на вариантите за изпълнение, охарактеризирани в патентните претенции.

В съответствие, настоящото изобретение се отнася до едноверижен мултифункционален полипептид включващ:

(а) един първи домен включващ сайт на свързване от имуноглобулинова верига или едно антитяло специфично разпознаващо CD19 антигена; и

(б) един втори домен включващ сайт на свързване от имуноглобулинова верига или едно антитяло специфично разпознаващо CD3 антигена.

Терминът "първи домен" и "втори домен", в съответствие с настоящото изобретение озна-

чават, че един сайт на свързване е насочен срещу рап В клетъчния маркер CD19, който еднакво се експресира при по-голямата част от злокачествените В клетки, а другият сайт на свързване е насочен срещу CD3 антигена на човешки Т клетки.

Терминът “сайт на свързване”, както се употребява в съответствие с настоящото изобретение посочва домен, който включва триизмерна структура, способна специфично да се свързва към епитоп като нативните антители, без scFv фрагменти или една от съответните им имуноглобулинови вериги, за предпочитане V_H веригата. По този начин посоченият домен може да включва V_H и/или V_L домен на антитяло или имуноглобулинова верига, за предпочитане поне V_H домена. От друга страна, посочените сайтове на свързване, съдържащи се в полипептида на изобретението, могат да включват поне една комплементарна детерминантна област (CDR) на антитяло или имуноглобулинова верига, разпознаваща съответно CD19 и CD3 антигените. С оглед на това, трябва да се отбележи, че домените на сайтовете на свързване, присъстващи в полипептида на изобретението могат да произлизат не единствено само от антитела, но също така и от други CD19 или CD3 свързващи протеини, като естествено срещаните в природата повърхностни рецептори или лиганди. Съгласно изобретението, посоченият сайт на свързване е включен в домен.

Терминът “мултифункционален полипептид”, както се използва тук, посочва полипептид, включващ поне две аминокиселинни последователности произлизащи от различни източници, т. е. от две различни молекули, по желание произлизащи от различни видове, при което поне два от тези източника охарактеризират сайта на свързване. В съответствие, посочените сайтове на свързване охарактеризират функциите или поне някои функции на посочения мултифункционален пептид. Такива полипептиди включват, например, биспецифични (bsc) едноверижни антители.

Терминът “едноверижен”, както се използва в съответствие с настоящото изобретение означава, че посочените първи и втори домени на полипептида са ковалентно свързани, за предпочитане под формата на ко-линейна аминокиселинна последователност кодирана от молеку-

ла на нуклеинова киселина. CD19 бележи антиген, който се експресира в В линия, както в про В клетки и в зрели В клетки, не се изменя, еднакво се експресира във всички лимфомни клетки и отсъства от стволите клетки [8,14].

CD3 посочва антиген, който се експресира върху Т клетки като част от мултимолекуларния Т-клетъчен рецепторен комплекс и който се състои от три различни вериги СДепсилон, CDделта и CDгама. Натрупването на CD3 върху Т клетки, например чрез имобилизирани анти-CD3-антитела води до Т-клетъчно активиране подобно на свързването на Т-клетъчния рецептор, но независимо от неговата характерна за кло-на специфичност. Всъщност, повечето анти-CD3-антитела разпознават СДепсилон-вериги.

Антитела, които специфично разпознават CD19 или CD3 антигена са описани в състоянието на техниката, например [24, 25 и 43], съответно и могат да се регенират чрез конвенционални методи, известни от състоянието на техниката.

Биспецифични CD19 x CD3 антители, които не са от едноверижен формат, насочващи повторно Т-клетъчната цитотоксичност към лимфомни клетки по МНС-независим начин вече са били посочени като ефективни *in vitro* [5, 6, 9-11, 13, 43] при животински модели [7, 28], така както и при някои пилотни клинични изпитания [12, 29, 30]. Досега тези антители са били конструирани чрез хибрид-хибридомни техники, чрез ковалентно свързване на моноклоналните антители [31] или чрез diabody подход [43]. Проведени са позадълбочени клинични изследвания благодарение на факта, че тези антители притежават ниска биологична активност, така че е необходимо да се прилагат по-високи дози и това прилагане единствено на антитела не предоставя благоприятен терапевтичен ефект. Освен това е ограничен достъпът до клиничен материал.

Без да се свързва към някоя определена теория се вярва, че чрез използването на биспецифичен антитяло-подобен формат, както е дефинирано по-горе, така генерираните полипептиди като биспецифични CD19 x CD3 антители обикновено са способни да разрушат CD19-позитивните клетки мишени чрез събиране на цитотоксичните Т-лимфоцити без никаква необходимост от Т-клетъчно пре- и/или ко-стимулиране. Това е в рязък контраст с всички известни

биспецифични CD19 x CD3 антители продуцирани съгласно други молекулярни формати и обикновено не зависи от конкретните особености на CD19- или CD3-антитяло, които се използват при конструирането, например на биспецифичното едноверижно антитяло. Независимостта от Т-клетъчно пре- и/или ко-стимулиране може значително да допринесе за изключително високата цитотоксичност, медирана чрез полипептида от изобретението, както се обяснява чрез специфичното биспецифично CD19 x CD3 антитяло, описано в примерите за конкретно изпълнение.

Друго полезно свойство на полипептида от изобретението е това, че поради неговата малка, сравнително компактна структура е лесно да се продуцира и да се пречисти, като по този начин се преодоляват проблемите с нисък добив, възникването на заболяване, дефинирано чрез продукти, или трудоемките процеси на пречистване [15-19] докладвани за CD19 x CD3 специфични антители продуцирани от хибрид-хибридома, чрез химическо свързване или чрез ренатуриране (възстановяване) от бактериални телца на включване. При следващото, полезността и неочакваните ефекти на полипептида от изобретението ще се разглеждат по неограничаващ начин в светлината на прилежащите претенции, включващи някои от предпочитаните варианти за изпълнение на изобретението, посочени по-долу, което илюстрира широкия обхват на настоящото изобретение.

В съответствие с настоящото изобретение се използва еукариотна експресионна система, която се развива за производството за рекомбинантни биспецифични едноверижни антители [1] с цел да се генерира рекомбинантно биспецифично CD19 x CD3 антитяло чрез експресията на СНО клетки. Напълно функционалното антитяло се пречиства по същество от културалната супернатанта чрез неговия С-краен хистидин tag върху Ni-NTA хроматографска колона. Специфичното свързване към CD19 и CD3 се демонстрира чрез FACS анализ. Получената bscCD19 X CD3 (биспецифични едноверижни CD19 x CD3) молекула на изобретението показва някои неочаквани свойства:

- индуцира висока лимфомна насочена Т-клетъчна цитотоксичност *in vitro* и *in vivo*. Даже при много ниски концентрации от 10-100 pg/ml

и ниски стойности на съотношението Е (ефектор):Т (мишена) от 5:1 и 2,5:1 се наблюдава значителен специфичен лизис на лимфомна клетъчна линия. Освен това, 3 micro g до 10 micro g bscCD19 X CD3 молекулата от изобретението при доброволно използване показват ясно и значително подобряване на медицинския статус. В сравнение с публикуваните досега CD19 X CD3 антители, продуцирани чрез хибрид-хибридомни техники или по diabody подход (които също представляват различен формат), които проявяват цитотоксична активност в рамките на няколко нанограма/ml или даже micro g/ml, bscCD19 X CD3 антитялото от изобретението изглежда да е много по-ефикасно [5-7, 27, 43] както например е документирано в прилежащите примери за изпълнение на изобретението 4, 5 и 7.

- Даже и ниските концентрации на bscCD19 X CD3 от изобретението са способни да индуцират бърза цитотоксичност насочена срещу лимфома (след 4 h) при ниски съотношения на Е:Т без необходимост от каквото и да било предварително Т-клетъчно стимулиране. В контраст, конвенционално CD19 X CD3 биспецифично антитяло [5-7, 27] не проявява цитотоксична активност при тези условия (а именно без предварително Т-клетъчно стимулиране, ниско съотношение на Е:Т) даже и при високи концентрации до 3 000 ng/ml. Въпреки че се докладва също индуциране на цитотоксичната активност без предварително стимулиране, при случай на друго конвенционално CD19 X CD3 антитяло, този ефект се постига единствено при високи концентрации и високо съотношение на Е:Т (100 ng/ml, 27:1) [9] в сравнение с bscCD19 X CD3 на изобретението (100 pg/ml, 2,7:1). Цитотоксичният ефект от това антитяло се наблюдава, освен това, само след един ден предварително стимулиране със самото специфично антитяло, при което bscCD19 X CD3 на изобретението, индуцира лимфома-насочена цитотоксичност вече след четири h. До колкото е известно на изобретателите на изобретението такава бърза и специфична цитотоксична активност на Т клетки, при такива ниски концентрации и съотношение на Е:Т, не са били наблюдавани за други биспецифични антители, които са били използвани досега. Въпреки това, за анти-p185HER2/анти-CD3 биспецифично F(ab)₂ антитяло бе показано, че индуцира цитотоксична активност при подобни кон-

центрации, както bscCD19 X CD3 от изобретението, като това антитяло се нуждае от 24 h предварително стимулиране с IL-2 [32]. Следователно, bscCD19 X CD3 антитялото на изобретението проявява уникални цитотоксични свойства, които отличават тази молекула от други биспецифични антитела, които вече са били описани.

bscCD19 X CD3 от изобретението медира цитотоксични ефекти, които са антиген специфични, което се демонстрира от следните факти:

- това антитяло не проявява възможност да лизира плазмодитомни клетъчни линии NC1 и L363, които са клетъчни линии от В линиите, които не експресират CD19 антигена; и

- цитотоксичността срещу лимфомни клетки би могла да бъде блокирана от родителското анти-CD19 антитяло HD37 (HD37 антитялото се получава от HD37 хибридома [22]).

Блокирането на синтетичния път на перфорина, чрез лишаване от калций чрез EGTA, напълно блокира медираната от bscCD19 X CD3 цитотоксичност, което подсказва, че специфичният лизис е по-скоро Т-клетъчно медиран ефект, отколкото директен ефект от самото антитяло.

Като се вземе предвид всичко това, bscCD19XCD3 антитялото, конструирано съгласно общите изводи на изобретението, надвишава досега описаните CD19XCD3 биспецифични антитела, като се има предвид неговата значително по-висока биологична активност, така както и възможността за неговото бързо и лесно производство, като по този начин се добиват достатъчни количества висококачествени клинични продукти.

Поради това се очаква bscCD19XCD3 молекулите на изобретението да са подходящи кандидати за да докажат терапевтичното предимство от биспецифичните антитела при лечението на В-клетъчно медираните заболявания, като не-Hodgkin лимфома при клинични изпитания.

При един предпочитан вариант за изпълнение на полипептида от изобретението, посочените домени са свързани чрез полипептиден линкер. Посоченият линкер се разполага между посочения първи и посочения втори домен, при което посоченият полипептиден линкер за предпочитане включва множество хидрофилни аминокиселини с пептидни връзки, и свързва N-терминалния край на посочения първи домен и C-

терминалния край на посочения втори домен.

При друг предпочитан вариант за изпълнение на изобретението посоченият първи и/или втори домен от гореописания полипептид наподобява или съответства на V_H и V_L областта на естествено съществуващо в природата антитяло. Антитялото, което предоставя сайта за свързване за полипептида на изобретението може да е, например, моноклонално антитяло, поликлонално антитяло, химерно антитяло, хуманизирано антитяло, биспецифично антитяло, синтетично антитяло, фрагмент на антитяло като Fab, Fv или scFv фрагменти и др. или химически модифицирани производни на което и да е от тези вещества. Моноклоналните антитела могат да се изготвят, например, чрез техниките както първоначално са описани от Kohler and Milstein, *Nature* 256 (1975), 495, и Galfreq *Meth. Enzymol.* 73 (1981), 3, които включват сливането на миши миеломни клетки към клетки от далака на бозайници, имунизирани с модификации, развити в състоянието на техниката. Освен това, антитела или техни фрагменти за горе посочените антигени могат да се получат при използване на методи, които са описани в, например, Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CHS Press, Cold Sping Harbor, 1988. Антитела могат да се получат от различни видове, включително от човек. Когато се получат производни на посочените антитела чрез phage display техниката, повърхностен plasmon резонанс, както се използва в BIAcore системата може да се използва за увеличаване ефикасността на фаговите антитела, които се свързват към един епитоп на CD19 или CD3 антигена (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. *Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13), Произдаването на химерни антитела се описва, например, в WO 1989/009622. Методи за продуциране на хуманизирани антитела са описани например, в EP-A1 0 239 400 и WO 1990/007861. Друг източник на антитела за използване съгласно настоящото изобретение са така наречените ксеногенни антитела. Общият принцип за продуциране на ксеногенни антитела, като човешки антитела в мишки се описва в например, WO 1991/010741, WO 1994/002602, WO 1996/034096 и WO 1996/033735.

Антитела за използване, съгласно настоящото изобретение или техните съответстващи

имуноглобулинови вериги могат да бъдат допълнително модифицирани при използване на конвенционални техники добре известни от състоянието на техниката, например, чрез използване на аминокиселинни делеции, инсерции, замествания, прибавяния и/или рекомбинации и/или каквито и да било други модификации, известни от състоянието на техниката, било то единично, било то в комбинация. Методи за въвеждане на такива модификации в ДНК последователността подчертаващи аминокиселинната последователност на една имуноглобулинова верига са добре известни на специалистите в областта; виж например Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. Посочените модификации за предпочитане се осъществяват на нуклеотидно ниво.

При един друг предпочитан вариант за изпълнение на изобретението поне един от посочените домени в горе описаните полипептиди е еднороден фрагмент на вариабилната област на антитялото.

Както е добре известно, Fv, минималният фрагмент на антитялото, който съдържа пълнен сайт за разпознаване и свързване на антигена, се състои от димер на една тежка и една лека верига на вариабилен домен (V_H и V_L) в не-ковалентна асоциация. В тази конфигурация това съответства на откритите в нативните три комплементарни детерминантни области (CDRs) на всеки вариабилен домен взаимодействия за да дефинира един сайт за свързване на антиген на повърхността на V_H - V_L димера. Колективно шестте CDRs придават антиген-свързваща специфичност към антитялото. Рамката (FRs) ограничаваща CDRs има терциерна структура, която по същество се запазва в нативните имуноглобулини от видове, така различни, като човешките и мишите. Тези FRs служат да задържат CDRs в тяхната подходяща ориентация. Константните домени не са необходими за функциите на свързване, но могат да помогнат при стабилизирането на V_H - V_L взаимодействието. Даже единичен вариабилен домен (или половината от Fv включващ единствено три CDRs специфични за един антиген) имат способността да разпознават и да свързват антигена, въпреки че обикновено при по-нисък афинитет, отколкото един цял сайт на свързване (Painter, *Vochem.* 11 (1972), 1327-1337). Следо-

вателно, посоченият домен на сайта на свързване на полипептида от изобретението може да е двойка от V_H - V_L , V_H - V_H или V_L - V_L домени, било то от един или от различни имуноглобулини. Редът на V_H и V_L домени в полипептидната верига не е решителен за настоящото изобретение, редът на посочените по-горе домени може да се обърне, обикновено без да се загуби никаква функция. Въпреки това е важно, че V_H и V_L домени са подредени така, че сайтът за свързване на антигена да може правилно да се нагъне.

При един предпочитан вариант за получаване на полипептида на изобретението, посочените домени се подреждат в реда V_L CD19- V_H CD19- V_H CD3- V_L CD3, при което " V_L " и " V_H " означават леката и тежката верига на вариабилния домен на специфичните анти-CD19 и анти-CD3 антитела.

Както се дискутира по-горе, посочените сайтове за свързване за предпочитане се свързват чрез гъвкав линкер, за предпочитане чрез полипептиден линкер, разположен между посочените домени, като посоченият полипептиден линкер включва множествени, хидрофилни, пептид-свързани аминокиселини с дължина достатъчна да заеме разстоянието между C-терминалния край и един от посочените домени, включващ сайтове за свързване и N-терминалния край на другия от посочените домени, включващ посочените сайтове за свързване когато полипептидът от изобретението претърпява конформация подходяща за свързване, когато се намира във воден разтвор. За предпочитане посоченият полипептиден линкер включва множество глицинови, аланинови и/или серинови остатъци. Предпочита се освен това, посоченият полипептиден линкер да включва множество последователни копия на аминокиселинна последователност. Обикновено полипептидният линкер включва 10 до 15 аминокиселини, въпреки че полипептидни линкери над 15 аминокиселини могат да работят също така добре. В предпочитания вариант за изпълнение на изобретението посоченият полипептиден линкер включва 1 до 5 аминокиселинни остатъци.

При един изключително предпочитан вариант за изпълнение на настоящото изобретение посоченият полилинкер в полипептида от изобретението включва 5 аминокиселини. Както се вижда от прилежащите примери за изпълнение

на изобретението, посоченият полепептиден линкер има предимството да включва аминокиселинната последователност Gly Gly Gly Gly Ser.

При един друг предпочитан вариант за изпълнение на изобретението, посоченият първи домен на полипептида от изобретението включва поне един CDR от V_H и V_L областта включваща аминокиселинната последователност кодирана от ДНК последователността посочена на фигура 8 от нуклеотиди 82 до 414 (V_L) и от нуклеотиди 460 до 831 (V_H) и/или посоченият втори домен включва поне един CDR, за предпочитане два, по-предпочитано 3 CDR от V_H и V_L областта включваща аминокиселинната последователност кодирана от ДНК последователността посочена на фигура 8 от нуклеотиди 847 до 1203 (V_H) и от нуклеотиди 1258 до 1575 (V_L), евентуално в комбинация с рамкова област, която се появява заедно с посочените CDR в родителските антители. CDR съдържащи се във вариабилните области, посочени на фигура 8 могат да бъдат определени например по Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (U. S. Department of Health and Human Services, third edition, 1983; fourth edition, 1987; fifth edition, 1990). Специалистът в областта ще оцени, че сайтът на свързване или поне един CDR, получен от него може да се използва при конструирането на полипептида от изобретението. За предпочитане, посоченият полипептид включва аминокиселинната последователност, кодирана от ДНК последователността посочена на фигура 8 от нуклеотиди 82 до 1575. Специалистът в областта ще оцени, че сайтовете на свързване на полипептида от изобретението може да бъде конструиран съгласно методи, известни от състоянието на техниката, например както се описва в EP-A1 0 451 216 и EP-A1 0549581.

Домените на сайтовете за свързване на полипептида от изобретението за предпочитане имат специфичност поне идентична по същество на свързващата специфичност на, например анти тяло или имуноглобулинова верига, от които произлизат. Такива домени на сайтове за свързване могат да имат афинитет на свързване от $10^5 M^{-1}$, за предпочитане не по-висок от $10^7 M^{-1}$, за CD3 антигена и предимно до $10^{10} M^{-1}$ или повече за CD19 антигена.

При един предпочитан вариант на изпълнение на полипептида от изобретението

(а) посоченият сайт за свързване на първия домен има афинитет от поне приблизително $10^{-7} M$, за предпочитане поне приблизително $10^{-9} M$ и още по-предпочитано $10^{-11} M$;

и/или

(б) посоченият сайт за свързване на втория домен има афинитет от поне приблизително $10^{-7} M$, за предпочитане по-малко от приблизително $10^{-6} M$ и още по-предпочитано от порядъка на $10^{-5} M$.

Съгласно предпочитаните варианти за изпълнение, посочени по-горе е полезно, ако сайтът за свързване разпознаващ CD19 антигена има висок афинитет с цел да залавя клетките мишени, които трябва да бъдат разрушени с висока ефикасност. От друга страна, афинитетът на свързване на сайта на свързване, разпознаващ CD3 антигена, трябва да е от порядъка на тези на естествените CD3 рецептори или на този, който обикновено се открива при взаимодействието на T клетъчния рецептор с неговия лиганд, който е МНС-пептиден комплекс върху повърхността на клетката мишена. При друг предпочитан вариант за изпълнение на изобретението, описаният по-горе пептид е биспецифично едноверижно анти тяло.

Настоящото изобретение се отнася освен това и до полипептид включващ поне още един домен, като посочените домени са свързани чрез ковалентни или нековалентни връзки.

Свързването може да се основава на генетично сливане, съгласно методите, известни от състоянието на техниката и описани по-горе или може да се осъществи чрез, например, химическо омрежване, както е описано в WO 1994/004686. Допълнителният домен присъстващ в полипептида на изобретението може за предпочитане да е свързан чрез гъвкав линкер, по-полезно полипептиден линкер за един от домовете на сайта на свързване, като посоченият полипептиден линкер включва множествени, хидрофилни, пептид-свързани аминокиселини с дължина достатъчна да заемат разстоянието между C-терминалния край на един от посочените домени, и N-терминалния край на другия от посочените домени, когато посоченият полипептид претърпява конформация подходяща за свързване, когато се намира във воден разтвор. За предпочитане посоченият полепептиден линкер е полипептиден линкер, както е посочено в гореописаните ва-

риантите за изпълнение. Полипептидът на изобретението може освен това да включва разцепващ се линкер или сайт за разцепване за протеинази, като ентерокиназа; виж приложените примери.

Освен това, посоченият допълнителен домен може да е с предварително дефинирана специфичност или функция. Например, в литературата се посочва гостоприемник според концепцията за насочване на биоактивните вещества като лекарствени средства, токсини и ензими, към специфична точка на тялото, за да се унищожат или локализируют злокачествените клетки или за да се индуцира локализиран ефект на лекарственото средство или ензима. Предлагано е този ефект да се постигне чрез конюгиране на биоактивното вещество към моноклонални антитела (виж например N. Y. Oxford University Press; and Ghose, J. Natl. Cancer Inst. 61 (1978), 657-676).

В този контекст се разбира също, че полипептидите, съгласно изобретението могат да бъдат допълнително модифицирани чрез конвенционални методи, известни от състоянието на техниката. Това позволява конструирането на химични протеини, включващи полипептида от изобретението и други функционални аминокиселинни последователности, например сигнали за ядрена локализация, трансактивиращи домени, ДНК-свързващи домени, хормон-свързващи домени, tag протеини (GST, GFP, h-мус пептид, FLAG, HA пептид) които могат да произлизат от хетероложни протеини. Както се описва в прилежащите примери за изпълнение, полипептидът от изобретението за предпочитане включва FLAG-tag с дължина приблизително осем аминокиселини; виж фигура 8.

Полипептидите от изобретението могат да се използват терапевтично при пациенти, страдащи от В-клетъчни нарушения, като В-клетъчна лимфома, В-клетъчно производна хронична лимфатична левкемия (B-CLL) и/или имащи В-клетъчно свързано аутоимунно заболяване, като myasthenia gravis, Morbus Basedow, Hashimoto thyroiditis, или Goodpasture syndrome. Такава терапия може да се проведе чрез, например, прилагането на полипептиди от изобретението. Такова прилагане може да използва небелязани, както и белязани полипептиди.

Полипептидите от изобретението, например, могат да бъдат приложени белязани с терапевтично средство. Тези средства могат да бъдат

свързани или директно, или индиректно към антителата или антигените на изобретението. Пример за индиректно свързване е чрез използване на спейсърна част. Тези спейсърни части на свой ред могат да бъдат неразтворими или разтворими (Diener, Science 231 (1986), 148) и могат да се подберат така, че да направят възможно освобождаването на лекарственото средство от антигена на определеното място. Примери за терапевтични средства, които могат да се свържат към полипептидите на изобретението за имунотерапия са лекарствени средства, радиоизотопи, пектини и токсини. Лекарствените средства, които могат да бъдат конюгирани към полипептидите на изобретението, включват съединения, които класически се отнасят като лекарствени средства, като митомицин С, даунорубицин и винбластин.

При използване на радиоизотопно конюгирани полипептиди на изобретението, например, при имунотерапия, някои изотопи могат да бъдат по-предпочитани от други, според такива фактори, като разпределение на левкоцити, както и стабилност и емисия. Според аутоимунният отговор някои емитери могат да са по-предпочетени от други. Най-общо радиоизотопи, излъчващи алфа и бета частици се предпочитат в имунотерапията. Предпочитат се високоенергийни алфа емитери с малък обхват, като ^{212}Bi . Примери за радиоизотопи, които могат да се свържат към полипептидите на изобретението за терапевтични цели са ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{212}At , ^{211}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd и ^{188}Re .

Лектините са протеини, обикновено изолирани от растителен материал, които се свързват към специфични захарни части. Много лектини са способни, също така да аглутинират клетки и да стимулират лимфоцити. Въпреки това рицинът е токсичен лектин, който се използва в имунотерапията. Това се осъществява чрез свързване на алфа-пептидната верига на рицина, който е отговорен за токсичността, към полипептида за да се позволи сайт-специфичната доставка на токсичния ефект.

Токсините са отровни вещества, продуцирани от растения, животни или микроорганизми, които в достатъчна доза често са летални. Дифтерийният токсин е вещество, продуцирано от *Corynebacterium diphtheria*, който може да се използва терапевтично. Този токсин се състои

от алфа и бета субединици, които при подходящи условия могат да бъдат разделени. Токсичният А компонент може да се свърже към полипептида от изобретението и може да се използва за сайт-специфична доставка на взаимодействащите В-клетки и Т-клетки, които са доведени в близост чрез свързване към полипептида от изобретението.

Други терапевтични средства, като описаните по-горе, могат да се свържат към полипептида от изобретението, както и съответни *ex vivo* и *in vivo* терапевтични протоколи, са известни или могат лесно да бъдат установени от специалистите в областта. Когато е подходящо специалистът в областта може да използва полипептида от изобретението, описан по-горе, кодиращ който и да е от горе описаните полипептиди или съответните вектори, вместо самия протеинов материал.

Следователно специалистът в областта ще оцени това, че полипептидът от изобретението може да се използва за конструиране на други полипептиди с желана специфичност и биологична функция. Очаква се полипептидите от изобретението да играят важна терапевтична и научноизследователска роля, по-точно в областта на медицината, например при разработка на нови подходи за лечение за В-клетъчно свързаните нарушения, като някои форми на рак или автоимунни заболявания или като интересно средство за анализиране и модулиране на съответния биологичен път на трансдукция на клетъчния сигнал.

При един друг предпочитан вариант за изпълнение на изобретението, този поне един друг домен включва молекула, избрана от група, състояща се от ефекторни молекули, притежаващи конформация подходяща за биологична активност, аминокиселинни последователности, способни да отделят един йон, и аминокиселинни последователности, способни на селективно свързване към твърда подложка или към предварително избран антиген.

За предпочитане този друг домен включва ензим, токсин, рецептор, сайт за свързване, сайт за свързване на биосинтетично анти тяло, растежен фактор, фактор за клетъчна диференциация, лимфокин, цитокин, хормон, лесно установима частица, антиметаболит, радиоактивен атом или антиген. Посоченият антиген може да бъде, например туморен антиген, вирусен анти-

ген, микробиален антиген, алерген, автоантиген, вирус, микроорганизъм, полипептид, пептид или множество туморни клетки.

Освен това, посочената последователност, способна да отдели един йон, се избира за предпочитане измежду калмодулин, металотионеин, техни функционални фрагменти, или аминокиселинна последователност богата поне на една от глутаминова киселина, аспарат, лизин и аргинин.

Освен това посочената полипептидна последователност, способна селективно да се свързва към твърда подложка, може да е положително или отрицателно заредена аминокиселинна последователност, цистен-съдържаща аминокиселинна последователност, авидин, стрептавидин, функционален фрагмент от протеин А на *Staphylococcus*, GST, His-tag, FLAG-tag или Lex A. Както се описва в прилежащите примери за изпълнение, полипептидът от изобретението, обяснен с едноверижно анти тяло, се експресира с N-терминален FLAG-tag и/или C-терминален His-tag, което позволява по-лесното пречистване и откриване. FLAG-tag, който се използва в примера включва 8 аминокиселини (виж фигура 8) и така се използва за предпочитане, съгласно настоящото изобретение. Въпреки това, FLAG-tag включващи съкратени версии на FLAG се използват в прилежащите примери за изпълнение, като аминокиселинната последователност Asp-Tyr-Lys-Asp също е подходяща.

Ефекторните молекули и аминокиселинните последователности, описани по-горе могат да присъстват в проформа, която от своя страна е или активна или не, и които могат да се отстранят, когато например, навлязат в известно клетъчно обкръжение.

При един особено предпочитан вариант за изпълнение на изобретението, посоченият рецептор е костимулираща повърхностна молекула, важна за Т-клетъчното активиране или включваща сайт за свързване на епитоп или сайт за свързване на хормон.

При друг особено предпочитан вариант за изпълнение на изобретението, посочената костимулираща повърхностна молекула е CD80 (B7-1) или CD86 (B7-2).

При друг предпочитан вариант за изпълнение, настоящото изобретение се отнася до полинуклеотиди, които след експресия кодират го-

ре описаните полипептиди. Посочените полинуклеотиди могат да са слети към подходящи последователности за контрол на експресията, известни от нивото на техниката, че осигуряват правилна транскрипция и трансляция на полипептидите.

Посочените полинуклеотиди могат да бъдат например, ДНК, сДНК, РНК, или синтетично продуцирана ДНК или РНК или рекомбинантно продуцирана химерна молекула на нуклеинова киселина, включваща който и да е от тези полинуклеотиди, било то самостоятелно или в комбинация. За предпочитане, посоченият полинуклеотид е част от вектор. Такива вектори могат да включват други гени, като маркерни гени, които позволяват селектирането на този вектор в подходяща клетка гостоприемник и при подходящи условия. За предпочитане полинуклеотидът от изобретението е свързан към последователност контролираща експресията, позволяваща експресия в прокариотни или еукариотни клетки. Експресията на посочения полинуклеотид включва транскрипция на полинуклеотида в способна да бъде транслирана иРНК. Регулаторните елементи осигуряващи експресията в еукариотни клетки, за предпочитане клетки от бозайници, са известни на специалистите в областта. Те обикновено включват регулаторни последователности осигуряващи инициране на транскрипцията и при желание poly-A сигнали, осигуряващи крох на транскрипцията и стабилизиране на транскрипта. Допълнителни регулаторни елементи могат да включват енхансери на транскрипцията, както и енхансери на трансляцията, и/или естествено асоциирана или хетероложна промоторна област. Възможните регулаторни елементи позволяващи експресия в прокариотни клетки гостоприемници включват например, PL, lac, trp или tac промотор от *E. coli*, а примери за регулаторни елементи позволяващи експресията в еукариотни клетки са AOX1 или GAL1 промотор в дрожди или CMV-, SV40-, RSV-промотор (*Rous sarcoma virus*), CMV-енхансер, SV40-енхансер или глобулинов интрон в клетки от бозайници или от други организми. Освен елементите, отговорни за иницирането на транскрипцията, такива регулаторни елементи могат също така да включват сигнали за край на транскрипцията, като SV40-poly-A сайт или tk-poly-A сайт, в посока downstream от полинуклеотида. Освен

това, според използваната експресионна система могат да се прибавят към кодиращата последователност на полинуклеотида от изобретението лидерни последователности насочващи полипептида към клетъчното пространство или секретирани го в средата, добре известни от състоянието на техниката; виж също така например, примерите за изпълнение на изобретението. Лидерната последователност(и) се сглобява в подходяща фаза с транслационните, инициращите и последователностите за терминация, и за предпочитане лидерна последователност, способна да насочва трансляцията на секретирания протеин, или негова част, към периплазматичното пространство или извънклетъчната среда. По желание, хетероложната последователност може да кодира слят протеин, включващ N-терминален идентификационен пептид, придаващ желаните характеристики, например стабилизиране или опростено пречистване на експресирания рекомбинантен продукт; виж по-горе. В този контекст, подходящи експресионни вектори са добре известни от състоянието на техниката, Okayama-Berg cDNA expression vector pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), or pSPORT1 (GIBCO BRL).

За предпочитане, последователностите контролиращи експресията са еукариотни промоторни системи във вектори способни да трансформират или да трансфектират еукариотни клетки гостоприемници, но могат да се използват също така контролни последователности за прокариотни клетки. След като векторът е вече инкорпориран в подходящия гостоприемник, гостоприемникът се поддържа при условия, подходящи за високо ниво на експресия на нуклеотидните последователности, и при желание може да следва събиране и пречистване на полипептида от изобретението; виж например прилежащите примери за изпълнение.

Както се описва по-горе, полипептидът от изобретението може да се използва самостоятелно или като част от вектор за експресия на полипептида от изобретението в клетки, например при генна терапия или диагностициране на заболявания свързани с В-клетъчни нарушения. Полинуклеотидите или векторите съдържащи ДНК последователност(и), кодираща който и да е от горе описаните полипептиди, се въвежда в клетката, която на свой ред продуцира полипеп-

тида представляващ интерес. Генната терапия, която се основава върху въвеждането на терапевтични гени в клетки чрез *ex vivo* или *in vivo* техники е едно от най-важните приложения на трансфера на гени. Подходящи вектори, методи или системи за доставка на гени за *ex vivo* или *in vivo* генна терапия са описани в литературата и са добре известни на специалистите в областта; виж например Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Verma, *Nature* 389 (1994), 239; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Onodera, *Blood* 91 (1998), 30-36; Verma, *Gene Ther.* 5 (1998), 692-699; Nabel, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 811 (1997), 289-292; Verzeletti, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998), 2243-51; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 1994/029469; WO 1997/000957, US 5,580,859; US 5,589,466; or Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640; цитираната литературна справка. Полинуклеотидите и векторите от изобретението могат да се проектират за директно въвеждане в клетката чрез липозоми, или чрез вирусни вектори (например, аденовирусен, ретровирусен). За предпочитане, посочената клетка е клетка от микробна клетъчна линия, ембрионална клетка, или яйчна клетка, или техни производни, за предпочитане посочената клетка е стволова клетка. Пример за ембрионална стволова клетка може да бъде стволова клетка, както се описва в Nagy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993), 8424-8428.

Съгласно горе описаното, настоящото изобретение се отнася до вектори, определени плазмиди, козмиди, вируси и бактериофаги, използвани конвенционално в генното инженерство, които включват полинуклеотид кодиращ полипептида съгласно изобретението. За предпочитане посоченият вектор е експресионен вектор и/или вектор за трансфер на гени или вектор за насочване. Експресионните вектори, произлизащи от вируси, като ретровирусите, ваксиния вирусите, адено-асоциираните вируси, херпес вирус или говежди папилома вирус, могат да се използват за доставка на полинуклеотидите или векторите на изобретението в популации от клетки мишени. Могат да се използват методи, добре известни на специалиста в областта, за конструиране на рекомбинантни вектори; виж например,

техниките описани в Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. and Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1989). Алтернативно, полинуклеотидите и векторите съгласно изобретението могат да се реконструират в липозоми за доставка в клетките мишени. Векторите съдържащи полинуклеотидите на изобретението могат да се прехвърлят в клетка гостоприемник чрез добре известни методи, които варират според клетъчния вид на гостоприемника. Например, трансфекция с калциев хлорид широко се използва за прокариотни клетки, докато обработка с калциев фосфат или електропорация могат да се използват за други клетки гостоприемници; виж например Sambrook по-горе. След като се експресират, полипептидите от изобретението могат да се пречистят, съгласно стандартни процедури от състоянието на техниката, включително утаяване с амониев сулфат, афинитетна колонна хроматография, гел-електрофореза и други; виж Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N. Y. (1982). Съществено чисти полипептиди с приблизително 90 до 95% хомогенност са предпочитани, а 98 до 99% или повече хомогенност са най-предпочитаните за фармацевтично използване. След като са пречистени частично или до желаната хомогенност, полипептидите могат да се използват терапевтично (включително екстракорпорално) или за развитието и усъвършенстването на изследванията.

При един друг вариант за изпълнение, изобретението се отнася до клетка, съдържаща описания по-горе полипептид или вектор. За предпочитане посочената клетка е екариотна, по-предпочитано клетка от бозайник, ако се предвижда терапевтично използване на полипептида. Дрождите, както и по-малко предпочитаните прокариотни клетки, например бактериални клетки, също могат да служат, по-специално ако продуцираният полипептид се използва като диагностично средство.

Полинуклеотидът или векторът, съгласно изобретението, който присъства в клетката гостоприемник може или да е интегриран в генома на клетката гостоприемник или може да се поддържа извънхромозомно.

Терминът "прокариотен" се счита, че

включва всички бактерии, които могат да бъдат трансформирани с ДНК или РНК молекули за експресиране полипептида от изобретението. Прокариотните клетки гостоприемници могат да включват Грам негативни, както и Грам позитивни бактерии, като например, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* и *Bacillus subtilis*. Терминът "еукариотен" се счита, че включва клетки от дрожди, от висши растения, от насекоми и за предпочитане от бозайници. Според използваният гостоприемник в процедурата за рекомбинантно продуциране, полипептидите от настоящото изобретение могат да са гликозилирани или да не са гликозилирани. Полипептидите от изобретението могат също така да включват един първоначален метионинов аминокиселинен остатък. Полинуклеотид, кодиращ за полипептида от изобретението може да се използва за трансформиране или трансфектиране на гостоприемника, при използване на техники, добре известни на специалистите в областта. Особено предпочитано е използването на плазмид или вирус, съдържащ кодиращата последователност на полипептида от изобретението и генетично слят към него N-терминален FLAG-tag и/или C-терминален His-tag. За предпочитане дължината на този FLAG-tag е приблизително 4 до 8 аминокиселини, по-предпочитано 8 аминокиселини. Методи за приготвяне на слети, оперативно свързани гени и за тяхната експресия в, например клетки на бозайници и бактериални клетки са добре известни от състоянието на техниката (Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989). Описаните там генетични структури и методи могат да се използват за експресиране на полипептида от изобретението в еукариотни или прокариотни гостоприемници. Най-общо, експресионните вектори, съдържащи промоторни последователности, които улесняват ефикасността на транскрипцията на инсерирания полинуклеотид, се използват според гостоприемника. Характерно, експресионният вектор съдържа едно начало на репликация, промотор и терминатор, както и специфични гени, които са способни да предоставят фенотипна селекция на трансформираните клетки. Освен това, трансгенни животни, за предпочитане бозайници, съдържащи клетки от изобретението могат да се използват при широкомащаб-

ното производство на полипептида от изобретението.

При друг вариант за изпълнение, настоящото изобретение се отнася до метод за получаване на описания по-горе, включващ култивиране на клетки от изобретението при условия, подходящи за експресията на полипептида и изолиране на полипептида от клетките или от културалната среда.

Трансформираният гостоприемник може да се отглежда във ферментатор и да се култивира, съгласно техниките известни от състоянието на техниката, за да се постигне оптимален клетъчен растеж. Полипептидът от изобретението може след това да се изолира от културалната среда, клетъчен лизат или фракции на клетъчни мембрани. Изолирането и пречистването на например, микробиално експресирани полипептиди на изобретението може да е чрез което и да е конвенционално средство, като разделяне чрез препаративна хроматография и имунологично разделяне, като тези изискващи използването на моноклонални или поликлонални антители насочени срещу, например, tag на полипептида на изобретението или както е описано в примерите за изпълнение на изобретението.

Следователно, настоящото изобретение дава възможност за рекомбинантно продуциране на полипептиди, включващи сайт на свързване, притежаващ афинитет и специфичност за епитоп за CD19 и CD3 антигена, и по желание друг функционален домен. Както става ясно от горното, изобретението предоставя голяма фамилия полипептиди, съдържащи такива сайтове за свързване за използване при каквито и да са терапевтични или диагностични подходи. За специалиста в областта е ясно, че полипептидите от изобретението могат, освен това, да бъдат свързани към други частици, както е описано по-горе, например, лекарствени средства, насочващи и изобразяващи приложенията. Такова свързване може да се проведе химически след експресия на полипептидите към сайта за прикрепване или продуктът на свързване може да се конструира в полипептида на изобретението на ДНК ниво. След това ДНК-ите се експресират в подходяща гостоприемникова система и експресираните протеини се събират и се ренатурират (възстановяват) при необходимост. Както е описано по-горе, сайтовете на свързване за предпочитане

произлизат от вариабилната област на антителата. В това отношение хибридомната технология дава възможност да се продуцират клетъчни линии, секретирани антитяло за практически което и да е желано вещество, което дава имунен отговор. След това може да се получи от цитоплазмата на хибридомата РНК кодираща леките и тежките вериги на имуноглобулина. Участъкът от 5' края на иРНК може да се използва за получаване на сДНК, която да се използва при метода от настоящото изобретение. ДНК кодираща полипептидите на изобретението може след това да се експресира в клетки, за предпочитане клетки от бозайници.

Според клетката гостоприемник може да са необходими техники за ренатурация, за да се постигне правилна конформация. При необходимост в ДНК може да се направи точково заместване търсене за оптимизиране на свързването, при използване на конвенционален касетен мутагенез или други методологии за конструиране на протеини, като описаната в настоящото. Изготвянето на полипептидите на изобретението може също да зависи от известността на аминокиселинната последователност (или съответната ДНК или РНК последователност) на биоактивни протеини, като ензими, токсини, растежни фактори, фактори за клетъчна диференциация, рецептори, антиметаболити, хормони или различни цитокини или лимфокини. Такива последователности са известни от литературата и са на разположение посредством компютъризирани бази данни. Например, полипептидът на изобретението може да се конструира, така че да се състои от едноверижен Fv фрагмент и извънклетъчната част на човешкия ко-стимулиращ протеин CD80 (B7-1) свързан чрез (Gly4Ser1)1 линкер. Ко-стимулиращият протеин CD80 принадлежи на Ig суперфамилията. Той представлява силно гликозилиран протеин от 262 аминокиселини. По-подробно описание е публикувано от Freeman, J. Immunol. 143 (1989), 2714-2722. Стабилна експресия може да се осъществи в, например DHFR дефицитни CHO-клетки, както е описано от Kaufmann, Methods Enzymol. 185 (1990), 537-566. След това протеинът може да се пречисти чрез неговия His-tag, прикрепен към C-края при използване на Ni-NTA-column (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (1995), 7021-7025).

Освен това настоящото изобретение пре-

доставя състави, включващи горепосочения полипептид, полинуклеотид или вектор от настоящото изобретение.

За предпочитане, настоящото изобретение се отнася до състави, които са фармацевтични състави, включващи горепосочения полипептид(и), полинуклеотид(и) или вектор(и) от настоящото изобретение.

Фармацевтичният състав, съгласно настоящото изобретение, може освен това да включва фармацевтично приемлив носител. Примери за подходящи фармацевтични носители са добре известни от състоянието на техниката и включват буферирани с фосфат физиологични разтвори, вода, емулсии, като маслено-водни емулсии, различни видове омокрящи средства, стерилни разтвори, и др. Състави, включващи такива носители могат да се приведат във фармацевтична форма чрез добре известни конвенционални методи. Тези фармацевтични състави могат да се прилагат на субекта в подходяща доза. Прилагането на подходящи състави може да се осъществи по различни пътища, например интравенозно, интраперитонеално, подкожно, интрамускулно, локално или интрадермално. Режимът на дозата ще се определи от лекуващия лекар и клиничните фактори. Както е добре известно от медицинската литература, дозите за всеки един пациент, зависят от много фактори, включително ръста на пациента, площта на телесната повърхност, възрастта, определеното съединение, което ще бъде приложено, пола, времето и начина за прилагане, общото здравословно състояние и другите лекарствени средства, които се прилагат конкурентно. Най-общо, режимът за редовно прилагане на фармацевтичния състав трябва да е в границите от 1 micro g до 10 mg единици дневно. Ако режимът е непрекъснато вливане, трябва да бъде в границите от 1 micro g до 10 mg единици на килограм телесно тегло за минута, съответно. Въпреки това, по-предпочитана доза за непрекъснато вливане, трябва да бъде в границите от 0,01 micro g до 10 mg единици на килограм телесно тегло за час. Изключително предпочитани дози са посочените по-долу. Може да се следи прогресирането чрез периодично оценяване. Дозата ще варира, но предпочитаната доза за интравенозно прилагане на ДНК е от приблизително 10^6 до 10^{12} копия на ДНК молекулата. Съставът от изобретението може да се приложи

локално или систематично. Обикновено, прилагането е парентерално, например интравенозно; ДНК също може да се приложи директно в мястото мишена, например чрез биолистична доставка към вътрешен или външен сайт мишена или чрез катетър към сайт в артерия. Приготвянето за парентерално приложение включва стерилни водни или не-водни разтвори, суспензии и емулсии. Примери за неводни разтворители са пропилен гликол, полиетилен гликол, растителни масла, като маслиново масло, и инжектируеми органични естери, като етил олеат. Водните носители включват вода, алкохол/водни разтвори, емулсии или суспензии, включително физиологичен разтвор и буферирани среди. Парентералните вехикулуми включват разтвор на натриев хлорид, Ringer's декстроза, декстроза и натриев хлорид, лактиран Ringer или фиксирани масла. Интравенозните вехикулуми включват течност и хранителни добавки, електролитни добавки (като тези основаващи се на Ringer's декстрозата), и др. подобни. Могат да присъстват също и консерванти и други допълнения като например, антимикробни средства, антиоксиданти, хелатни средства и инертни газове и др. подобни. Освен това, фармацевтичният състав на настоящото изобретение може да включва протеинови носители като например, серумен албумин или имуноглобулин, за предпочитане с човешки произход. Освен това се предвижда фармацевтичният състав от изобретението да може да включва биологичноактивно средство, според желаното използване на фармацевтичния състав. Такива средства могат да бъдат лекарствени средства, действащи върху гастро-интестиналната система, лекарствени средства, действащи като цитостатици, лекарствени средства, предотвращаващи увеличената пикочна киселина в кръвта, и/или средства като Т-клетъчни ко-стимулиращи молекули или цитокини, известни от състоянието на техниката.

Настоящото изобретение предвижда, че различните полинуклеотиди и вектори от настоящото изобретение се прилагат било то самостоятелно или в каквато и да е комбинация, при използване на стандартни вектори и/или системи за доставка на гени, и при желание заедно с фармацевтично приемлив носител или пълнител. След прилагането посочените полинуклеотиди и вектори могат да бъдат стабилно интегрирани в

генома на субекта.

От друга страна могат да се използват вирусни вектори, които са специфични за някои клетки или тъкани и продължават да съществуват в посочените клетки. Подходящи фармацевтично приемливи носители или пълнители са известни от състоянието на техниката. Фармацевтичните състави, приготвени съгласно настоящото изобретение, могат да се използват за предотвратяване или лечение или отлагане във времето на различни видове заболявания, които са свързани с В-клетъчно свързаните имунонедостатъчности и злокачествени прояви.

Възможно е да се използва, освен това, фармацевтичният състав, съгласно изобретението, който включва полинуклеотид или вектор от изобретението за гена терапия. Подходящи системи за доставка на гени могат да включват липозоми, рецептор-медирана система за доставка, гола ДНК и вирусни вектори като херпес вирус, ретровируси, адено-асоциирани вируси, измежду другите. Доставянето на нуклеинови киселини в специфично място в тялото за гена терапия може също да се постигне при използване на система за биолистична доставка, като описаната от Williams (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 2726-2729). Други методи за доставка на нуклеинови киселини включват генен трансфер медиран от частици, като например, описания във Verma, Gene Ther. 15 (1998), 692-699. Трябва да се разбира, че въведените полинуклеотиди или вектори експресират генния продукт след въвеждане в посочената клетка и за предпочитане остават с този статус по време на полуживота на посочената клетка. Например, може да се проектира, съгласно методи, добре известни на специалистите в областта, клетъчна линия, която стабилно да експресира полинуклеотида под контрола на подходящи регулаторни последователности. Вместо да се използват вектори, които съдържат вирусно начало на репликация, клетките гостопиремници могат да се трансформират с полинуклеотида от изобретението и селекционен маркер, или от едни и същи или от различни плазмиди. След въвеждането на горе посочената ДНК, проектираните клетки могат да се оставят да прорастват 1-2 дни в обогатена среда, след което се включва селективна среда. Селекционният маркер в рекомбинантния плазмид придава устойчивост към се-

лекцията и позволява подбора на клетки, притежаващи стабилно интегриран плазмид в техните хромозоми и прорастат под формата на огнище, което на свой ред може да бъде клонирано и да се развие в клетъчна линия. Такива проектирани клетъчни линии също са изключително полезни при методите за скриниране за откриване на съединения включени, например във взаимодествията В-клетки/Т-клетки.

Могат да се използват голям брой селекционни системи, включително, но без да се ограничават до, тимидин киназа на херпес симплекс вирус (Wigler, Cell 11 (1977), 223), хипоксантин-гуанин фосфорибозил трансфераза (Szybalska, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1962), 2026), и аденин фосфорибозил трансфераза (Lowy, Cell 22 (1980), 817) в tk-, hgpRT или aprt клетки, съответно. Също, може да се използва устойчивост на антиметаболити, като основа за селекция на dhfr, който придава устойчивост на метотрекат (Wigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 3567; O'Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527), gpt, който придава устойчивост на микофенолна киселина (Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); neo, който придава устойчивост на аминокликозида G-418 (Colberre-Garapin, J. Mol. Biol. 150 (1981), 1); hygR, който придава устойчивост на хигромицин (Santerre, Gene 30 (1984), 147); или пурамицин (pat, пурамицин N-ацетил трансфераза). Описани са допълнителни селекционни гени, например trpB, който дава възможност на клетките да използват индол вместо триптофан, hisD, който дава възможност на клетките да използват хистинол вместо хистидин (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047); и ODC (орнитин декарбоксилаза) който придава устойчивост на орнитин декарбоксилазен инхибитор, 2-(дифлуорометил)-DL-орнитин, DFMO (McCologue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

При друг вариант за изпълнение настоящото изобретение се отнася до диагностични състави, включващи който и да е от гореописаните пептиди, полинуклеотиди или вектори от изобретението и по желание подходящи средства за определяне.

Полипептидите от изобретението също са подходящи за използване при имуноизследвания, при които те могат да бъдат използвани в

течна фаза или да бъдат свързани към твърдофазов носител. Примери за имуноизследвания, които могат да използват полипептиди от настоящото изобретение са компетитивни и некомпетитивни имуноизследвания в директен или индиректен формат. Примери за такива имуноизследвания са радиоимуноизследването (RIA), сандвич (имунометрично изследване) и Western blot изследването. Полипептидите от настоящото изобретение могат да бъдат свързани към много различни носители и да се използват, за да се изолират клетки специфично свързани към посочените полипептиди. Примери за добре известни носители включват стъкло, полистирен поливинил хлорид, полипропилен полиетилен поликарбонат, декстран, найлон, амилози, естествени и модифицирани целулози, колоидални метали, полиакриламида, агарози и магнетит. Същността на носителя може да е или разтворим или неразтворим за целите на изобретението.

Съществуват много различни маркери и методи за белязване, известни на специалистите в областта. Примери за такъв тип маркери, които могат да бъдат използвани в настоящото изобретение, включват ензими, радиоизотопи, колоидални метали, флуоресцентни съединения, хемилуминесцентни съединения и биолуминесцентни съединения; виж също вариантите за изпълнение, дискутирани по-горе.

Настоящото изобретение се отнася също така до използване на полипептидите, полинуклеотидите и векторите от настоящото изобретение, описани по-горе за получаване на фармацевтичен състав за лечение на В-клетъчни злокачествени образувания, В-клетъчно медирано автоимунни заболявания или изтощаване на В-клетки.

Наскоро проведени клинични изследвания за пренасочване на цитотоксичната активност на човешки Т клетки чрез биспецифични антители са показали обещаващи резултати при лечението на рефракторна болест на Hodgkin [33], рак на гърдата и яйчниците [34-37] и злокачествена глиома [38]. Като се вземат предвид фактите

- че bsc антителя, поради тяхната ниска молекулна маса улесняват навлизането в тумори (както бе показано за Fab или Fv фрагменти) [39]; и

- допуска се, че bsc антителя намаляват зависимата от дозата и ограничаваща дозата ток-

сичност, причинена от системното освобождаване на цитокини медирано от Fc части на конвенционално биспецифично антитяло; и

- това, че интактно моноклонално антитяло (насочено срещу CD20) води до туморна репресия при напредналите стадии на NHL [41,42], се очаква и действително е било показано, че полипептидите от изобретението са интересни молекули, които допринасят за допълнително терапевтично подобрение.

Следователно при един предпочитан вариант, фармацевтичният състав на изобретението, се използва за лечение на не-Hodgkin лимфома.

Границите на дозата за прилагане на полипептидите, полинуклеотидите и векторите от изобретението са достатъчно широки за да доведат до желанния ефект, при който симптомите на В-клетъчно медираните заболявания се подобряват. Дозата не трябва да е толкова голяма, че да причини основни обратни странични ефекти, като нежелани кръстосани реакции, анафилактични реакции и други подобни. Обикновено дозата варира според възрастта, състоянието, пола и разпространението на болестта в пациента и може да бъде определена от специалиста в областта. Дозата може да се определи от индивидуалния лекар по време на каквито и да са контраиндикации. Предвижда се границата на посочената доза да е при 0,01 micro g до 10 mg от полипептида на изобретението. Изключително предпочитана доза е 0,1 micro g до 1 mg, по-предпочитана е 1 до 100 micro g и още по-предпочитана е доза от 3 до 10 micro g (претенция 7).

Изобретението се отнася също така и до метод за идентифициране на съединения за активиране или ко-стимулиране на Т-клетки или за идентифициране на инхибитори на активирането и стимулирането на Т клетки, включващ

а) култивиране на CD19 позитивни клетки (за предпочитане В клетки) и Т клетки в присъствието на полипептида от изобретението и при желание в присъствието на съставка, способна да предостави сигнал, който може да бъде отчетен в отговор на Т клетъчното активиране със съединение, което ще бъде скринирано при условия, позволяващи взаимодействие на съединението с клетките; и

б) определяне присъствието или отсъствието на сигнал генериран от взаимодействието

на съединението с клетките.

Този вариант за изпълнение е изключително полезен за тестване на способността на съединенията като ко-стимулиращи молекули. При този метод CD19 позитивни клетки/В клетки предоставят първичен сигнал за активиране на Т клетки, като по този начин се избягва клонотипичния Т клетъчен рецептор. След това може да се определи съгласно изобретението, кое от съединенията за тестване е все още необходимо действително да активира Т клетките. При този метод от изобретението CD19 позитивни клетки/В клетки функционират, като стимулиране на клетки, свързващи биспецифични молекули, които се свързват към CD3 комплекси на повърхността на същите Т клетки. Биологичните методи за провеждане на култивирането, определяне и пожелание тестване са ясни за специалиста в областта.

Терминът "съединение" в метода от изобретението включва сигнално вещество или множество вещества, които могат да бъдат или не идентични. Посоченото съединение(я) може да е включено, например в проби, например, клетъчни екстракти от, например растения, животни или микроорганизми. Освен това посочените съединения могат да са известни от състоянието на техниката, но досега да не са били известни със способността си да инхибират Т-клетъчното активиране или да не са били известни с полезността си като Т-клетъчен ко-стимулиращ фактор. Множество съединения може например, да се добави към културалната среда или да се инжектира в клетката. Ако при метода на изобретението, се идентифицира проба съдържаща съединението, тогава е възможно или да се изолира съединението от първоначалната проба, идентифицирана като съдържаща въпросното съединение или впоследствие първоначалната проба може да се раздели, например, ако се състои от множество различни съединения, така че да се намали броят различни съединения за проба и да се повтори методът с подразделенията на първоначалната проба. След това може да се определи дали посочената проба или съединение проявява необходимите качества, чрез методи, известни от състоянието на техниката, като описаните в настоящото и в прилежащите претенции. В зависимост от сложността на пробите, гореописаните етапи могат да се проведат няколко

пъти, за предпочитане докато пробата, идентифицирана съгласно метода на изобретението, включва единствено ограничен брой от или само едно вещество. За предпочитане посочената проба включва вещества с подобни химични и/или физични свойства, а по-предпочитано е посочените вещества да са идентични. Методите на изобретението могат лесно да се проведат и да се проектират от специалист в областта, например, съгласно други опити, извършени на базата на клетки, описани в състоянието на техниката или при използване и модифициране на методи, както са описани в прилежащите примери за изпълнение. Освен това специалистът в областта лесно ще разпознае кои други съединения и/или клетки могат да се използват за осъществяване на методите на изобретението, например, интерлевкини или ензими, които при необходимост конвертират някое съединение в предшественика, който на свой ред стимулира или потиска Т клетъчното активиране. Такова адаптиране на метода на изобретението е в способностите на специалиста в областта и може да се осъществи без ненужно експериментиране.

Съединения, които могат да се използват съгласно метода на настоящото изобретение, включват пептиди, протеини, нуклеинови киселини, антитела, малки органични съединения, лиганди, пептидомиметици, PNAs и други подобни. Посочените съединения могат да бъдат също така функционални производни или аналози на известни Т-клетъчни активатори или инхибитори. Методи за получаване на химични производни и аналози са добре известни на специалистите в областта и са описани, например, в Beilstein, Handbook of Organic Chemistry, Springer edition New York Inc., 175 Fifth Avenue, New York, N. Y. 10010 U. S. A. and Organic Synthesis, Wiley, New York, USA. Освен това посочените производни и аналози могат да се тестват за техния ефект, съгласно методи известни от състоянието на техниката или както е описано, например, в прилежащите примери за изпълнение. Освен това могат да се използват пептидомиметици и/или проектирани с помощта на компютър активатори или инхибитори на Т-клетъчно активиране например, съгласно долуописаните методи. Приспособени компютърни програми могат да се използват за идентифициране на сайтовете на взаимодействие на предполагаем инхибитор и на антигена от

изобретението чрез компютърно търсене за комплементарни структурни мотиви (Fassina, Immunomethods 5 (1994), 114-120). Други приспособени компютърни програми за компютърно-подпомогнато проектиране на протеин и пептиди, се описва в предшестващото състояние на техниката, например в Berry, Biochem. Soc. Trans. 22 (1994), 1033-1036; Wodak, Ann. N. Y. Acad. Sci. 501 (1987), 1-13; Pabo, Biochemistry 25 (1986), 5987-5991. Получените резултати от горе описаните компютърни анализи могат да се използват в комбинация с метода на изобретението, например за оптимизиране на известните Т-клетъчни активатори или инхибитори. Подходящи пептидомиметици също могат да се идентифицират чрез синтеза на пептидомиметични комбинирани библиотеки чрез последователни химични модификации и тестване на получените съединения, например, съгласно описания в настоящото метод и прилежащите примери за изпълнение. Методи за генериране и използване на пептидомиметични комбинирани библиотеки са описани в предшестващото състояние на техниката, например, в Ostresh, Methods in Enzymology 267 (1996), 220-234 and Dorner, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 709-715. Освен това триизмерните и/или кристалографски структури на инхибиторите или активаторите на В-клетъчни/Т-клетъчни взаимодействия могат да се използват за проектиране на пептидомиметични инхибитори или активатори на Т-клетъчно активиране, което ще бъде тествано при метода от изобретението (Rose, Biochemistry 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 1545-1558).

Най-общо, изобретението предоставя методи за идентифициране на съединения, които са способни да модулират В-клетъчен/Т-клетъчен имунен отговор.

Съединения, за които е открито, че активират В-клетъчно/Т-клетъчно медиран отговор, могат да се използват за лечение на рак и сродните заболявания. Освен това може да е възможно специфично да се инхибират вирусни заболявания, като по този начин се предотвратява вирусна инфекция и нейното разпространение. Съединенията, които са идентифицирани като супресори на Т-клетъчното активиране или стимулиране, могат да се използват при трансплантирането на органи, за да се избегне отхвърлянето

на трансплантата; виж по-горе.

Съединенията идентифицирани или получени съгласно метода на настоящото изобретение се очаква да са много полезни при диагностиката, и по-специално за терапевтично приложение. След като при един друг вариант за изпълнение изобретението се отнася до метод за продуциране на фармацевтичен състав, включващ привеждане на идентифицираното съединение от етап (б) във фармацевтична форма, на горе описаните методи на изобретението, във фармацевтично приемлива форма. Освен това се има предвид, че посоченият компонент може да бъде модифициран от пептидомиметици. Методи за генериране и използване на пептидомиметични комбинаторни библиотеки са известни от състоянието на техниката, например, Ostresh, *Methods in Enzymology* 267 (1996), 210-234, Dorner, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 709-715, Beeley, *Trends Biotechnol.* 12 (1994), 213-216, or al-Obeidi, *Mol. Biotech.* 9 (1998), 205-223.

Терапевтично полезните съединения, идентифицирани съгласно метода на изобретението могат да се прилагат на пациент по който и да е подходящ метод за конкретното съединение, например, орално, интравенозно, парантерално, трансдермално, трансмукозно или хирургично или чрез имплантиране (например, като съединението е под формата на твърд или полутвърд биологично съвместим и резорбционен матрикс) в или близо до мястото, където се желае ефектът на съединението. Терапевтичните дози е подходящо да се определят от специалиста в областта, виж по-горе.

Допълнително, настоящото изобретение предоставя метод за лечение на В-клетъчни злокачествени заболявания, В-клетъчно медиранни автоимунни заболявания или изтощаване на В-клетките и/или метод за отлагане на патологично състояние, причинено от В-клетъчни нарушения, включващ въвеждане на полипептида, полинуклеотида или вектора на изобретението в клетка на бозайник, засегната от посочените злокачествени заболявания и/или патологично състояние. Предпочита се освен това, посоченият бозайник да е човек.

Тези и други варианти за изпълнение на изобретението са описани и включени в описанието и примерите за изпълнение на настоящото изобретение. Друга литература, отнасяща се до

което и да е от антителата, методите, използването и съединенията, използвани съгласно настоящото изобретение, могат да бъдат открити в обществените библиотеки и бази данни, при използване например, на електронни устройства. Например може да се използва обществената база данни "Medline", която е на разположение чрез интернет с адрес <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Други бази данни и адреси като <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobiogen.fr/>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html, <http://www.tigr.org/>, са известни на специалистите в областта и също могат да се получат при използване, например, на <http://www.lycos.com>. Преглед на патентната информация в биотехнологиите и оценка на релевантните източници, полезни за ретроспективно търсене и за текущо осведомяване са предоставени от Berks, *TIBTECH* 12(1994), 352-364.

Описание на приложените фигури

Фигура 1. SDS-PAGE: Coomassie оцветяване на пречистения bscCD19xCD3 фрагмент с различни количества протеин. Молекуларната маса (kDa) на маркера е посочена от лявата страна;

Фигура 2. FACS-анализ с bscCD19xCD3 (200 micro g/ml) върху различни CD19-позитивни В-клетъчни линии (BJAB, SK W6.4, Bln-1, Daudi, Raji), върху CD19-негативни В-клетъчна линия BL60 и върху CD3-позитивни Jurkat клетки и първични човешки PBMCs. Разрушените линии са индикация за негативни контроли;

Фигура 3. Цитотоксичност на bscCD19xCD3 при изследване за освобождаването на ^{51}Cr с нестимулирани човешки PBMCs и различни В-клетъчни линии. Ефектор: Съотношение на клетки мишени 10:1; време за инкубиране 4 h. Стандартно отклонение при всички проведени в три повторения опити 7%;

Фигура 4. Изследване за цитотоксичност при освобождаването на хром с нестимулирани на първични човешки PBLs срещу плазмацитомни клетъчни линии L363 и NC1 и лимфонна клетъчна линия Daudi E:T съотношение 20:1; време за инкубиране 8 h;

Фигура 5. Инхибиране на цитотоксичността на bscCD19xCD3 чрез родителското анти-CD19 антитяло HD37 изследване за освобожда-

ването на хром; време за инкубиране 8 h; Е:Т съотношение 20:1; концентрация на bscCD19xCD3 1ng/ml;

Фигура 6. Изследване за цитотоксичност с нестимулирани PBMCS срещу Daudi клетки, след прибавяне на нарастващи количества EGTA, Е:Т съотношение 10:1, време за инкубиране 4 h;

Фигура 7. Цитотоксичност на bscCD19xCD3 при изследване за освобождаването на ⁵¹Cr с нестимулирани човешки PBMCS и Bln-1 като клетки мишени при различни Е:Т съотношения; време за инкубиране 4 h; концентрация на конвенционално биспецифично антитяло 3 micro g/ml; концентрация на bsc 17-1AxCD3 100 ng/ml; Е:Т съотношения както са посочени;

Фигура 8. ДНК- и протеинова последователност на bscCD19xCD3 антитяло (вариант съдържащ FLAG-tag). Цифрите сочат нуклеотидните (nt) позиции, съответните аминокиселини са посочени след нуклеотидната последователност. Кодиращата ДНК последователност за биспецифичното антитяло започва в позиция 1 и завършва в позиция 1593. Първите шест nt (позиции -10 до -5) и последните шест nt (позиции 1596 до 1601) съдържат сайтовете за разцепване на рестрикционните ензими EcoRI и Sail, съответно. Нуклеотиди от 1 до 57 уточняват лидерната последователност; нуклеотиди 82 до 414 и 460 до 831 кодират V_LCD19 и V_HCD19, съответно; нуклеотиди 847 до 1203 и 1258 до 1575 кодират V_HCD3 и V_LCD3, съответно; и нуклеотиди 1576 до 1593 кодират His-tag.

Фигура 9. Изтощаване на първичните (злочакствени) CD19⁺ В-клетки чрез събиране на автоложни първични Т-лимфоцити посредством bscCD19xCD3.

А) Начало (t = 0): n = 3 x 10⁶ PBL/ямка се посяват в 24-ямкови блуда за тъкънно култивиране в обем от 1 ml RPMI 1640 среда всяка, с добавяне на 10% FCS към всяка. Първоначалното процентно съдържание на CD19⁺ В-клетки, както и това на CD4⁺- и CD8⁺ Т-клетки е посочено.

В-Г) Относително преброяване на В- и CD4⁺- и CD8⁺ Т-клетки след t = 5 дни инкубиране при 37°C/5% CO₂ в отсъствие на (В-С) или в присъствие (D-G) на bscCD19xCD3 (концентрации както са посочени) с или без 60 U/ml IL-2. Негативни контроли, съдържащи или биспецифично едноверижно антитяло (17-1AxCD3) с не-

ясна клетъчна специфичност на мишената, или без биспецифично антитяло въобще (С).

Фигура 10. Етапи на пречистване за bscCD19xCD3;

Фигура 11. Показан е SDS-PAGE анализ за чистотата на bscCD19xCD3. Оцветен с колоидален Coomassie-blue SDS 4-12% градиент на полиакриламиден гел. Ивици 1 и 6, маркери за размер на молекулата; ивица 2, супернатанта от клетъчна култура; ивица 3, активна фракция от катионообменна хроматография; ивица 4; активни фракции на афинитетна хроматография с кобалтов хелат; ивица 5, активна фракция от гел филтрация. Равни количества протеин (2 micro g) от супернатанта на клетъчната култура и различните колонни фракции се анализират. Размерът в kDa на стандартите за молекулно тегло е посочен от дясната страна. Стрелката показва позицията на bscCD19xCD3;

Фигура 12. Катионнообменна хроматография на bscCD19xCD3. Концентрацията на протеин се измерва чрез абсорбция на 280 nm (mAU, ляво). Профилът на елюиране на протеина е показан с непрекъсната линия. Профилът на етапа на градиент на NaCl е показан чрез непрекъсната права линия (%V, дясно) и събраните фракции са посочени чрез начупени линии. BscCD19xCD3 се определят във фракция F6;

Фигура 13. Афинитетна хроматография с кобалтов хелат на bscCD19xCD3. Концентрацията на протеин се измерва чрез абсорбция на 280 nm (mAU, ляво). Профилът на елюиране на протеина е показан с непрекъсната линия. Имидазоловия градиент е показан чрез непрекъсната права линия (%V, дясно) и събраните фракции са посочени чрез начупена непрекъсната линия. BscCD19xCD3 се открива във фракция F7;

Фигура 14. Гел филтрация на анти-CD19xанти-CD3. Концентрацията на протеин се измерва чрез абсорбция на 280 nm (mAU, ляво). Профилът на елюиране на протеина е показан с непрекъсната линия. Начупените линии сочат събраните фракции. BscCD19xCD3 се открива във фракции F7 съответстваща на молекулярен размер от приблизително 60 kDa;

Фигура 15. Кръвни нива на гама-глутамил трансфераза (GGT) в отговор на лечение с bscCD19xCD3. GGT нива се определят чрез стандартен клиничен биохимичен метод и се изразяват като единица/l. Оста за времето показва

дни (d) след започването на първото приложение на лекарственото средство като започва от нула, часове (h) следващи индивидуално добавяне на лекарствено средство. Стрелките сочат времето, в което се прилага лекарственото средство.

Фигура 16. Ултразвукови измервания от далак на пациент А-В.

А: Определяне на размера на далака на 12 април 1999, преди терапия с bscCD19хCD3. Фигурата показва уголемен далак (размер 146 mm x 69,2 mm), което се дължи на инфилтрация на злокачествени В клетки.

В: Определяне на размера на далака на 16 април, 1999 след третиране с 3 micro g на 14 април, следвано от 10 micro g на 15 април. Снимката показва свиване на далака до размер 132 mm x 58,9 mm, причинено от системно третиране с bscCD19хCD3. Несъответствията на единичните измерения на стойностите на размера, посочени в Таблица 1 се обясняват чрез различните пространствени планове при определянето на размера на органа чрез ултразвук. Двете измерения са белязани с (+) и (x);

Фигура 17. Преброяване на броя на левкоцитите в кръвта в отговор на третиране с bscCD19хCD3. Броят на левкоцитите е даден в гига части/литър. Оста за времето показва дни (d) след започването на първото приложение на лекарственото средство като започва от нула, часове (h) следващи индивидуално добавяне на лекарствено средство. Стрелките сочат времето, в което се прилага лекарственото средство;

Фигура 18. Кръвни нива на С-реактивен протеин (CRP) в отговор на третиране с bscCD19хCD3. Нивата на CRP се определят чрез стандартен клиничен биохимичен метод и се изразяват като mg/dl. Оста за времето показва дни (d) след започването на първото приложение на лекарственото средство като започва от нула, часове (h) следващи индивидуално добавяне на лекарствено средство. Стрелките сочат времето, в което се прилага лекарственото средство;

Фигура 19. Кръвни нива на тумор некротис фактор-алфа (TNF) в отговор на третиране с bscCD19хCD3. Нивата на TNF се определят чрез ELISA и се изразяват с ng/ml. Оста за вре-

мето показва дни (d) след започването на първото приложение на лекарственото средство като започва от нула, часове (h) следващи индивидуално добавяне на лекарствено средство. Стрелките сочат времето, в което се прилага лекарственото средство;

Фигура 20. Кръвни нива на интерлевкин-6 (IL-6) в отговор на третиране с bscCD19хCD3. Нивата на IL-6 се определят чрез ELISA и се изразяват с pg/ml. Оста за времето показва дни (d) след започването на първото приложение на лекарственото средство като започва от нула, часове (h) следващи индивидуално добавяне на лекарствено средство. Стрелките сочат времето, в което се прилага лекарственото средство;

Фигура 21. Кръвни нива на интерлевкин-8 (IL-8) в отговор на третиране с bscCD19хCD3. Нивата на IL-8 се определят чрез ELISA и се изразяват с pg/ml. Оста за времето показва дни (d) след започването на първото приложение на лекарственото средство като започва от нула, часове (h) следващи индивидуално добавяне на лекарствено средство. Стрелките сочат времето, в което се прилага лекарственото средство;

Фигура 22. Кръвни нива на разтворим интерлевкин-2 рецептор алфа верига (IL-2R) в отговор на третиране с bscCD19хCD3. Нивата на IL-2R се определят чрез ELISA и се изразяват в единици/ml. Оста за времето показва дни (d) след започването на първото приложение на лекарственото средство като започва от нула, часове (h) следващи индивидуално добавяне на лекарствено средство. Стрелките сочат времето, в което се прилага лекарственото средство.

Изобретението е описано с помощта на следните биологични примери, които са илюстративни и не ограничават обхвата му.

Примери за изпълнение на изобретението

Пример 1. Клонирание на вариабилни (V) имуноглобулинови домени

Домени на V лека верига (VL) и V тежка верига (VH) от HD37 хибридома [22] се клонират съгласно стандартни PCR методи [23]. Синтез на сДНК се осъществява с олиго dT праймери и Taq полимераза.

Списък на праймерите

5'L1:
GAAGCACGCGTAGATATCKTGMTSACCCA AWCTCCA [SEQ ID NO: 1]
3'K:
GAAGATGGATCCAGCGGCCGAGCATCAGC [SEQ ID NO:2]
5'H1:
CAGCCGGCCATGGCGCAGGTSCAGCTGCAGSAG [SEQ ID NO: 3]
3'G:
ACCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGGTGTCGTTTT [SEQ ID NO: 4]
5'VLB5RRV:
AGGTGTACACTCCATATCCAGCTGACCCAGTCTCCA [SEQ ID NO: 5]
3'VLGS15:
GGAGCCGCCGCCGAGAACCCACCTTTGATCTCGAGCTTGGTCCC [SEQ ID NO: 6]
5'VHGS15:
GGCGGCGGCGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTCAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG [SEQ ID
NO: 7]
3'VHBspEI:
AATCCGGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG [SEQ ID NO: 8]

За амплифицирането на V домените чрез PCR се използват праймери 5'L1 и 3'K, ограничаващи V_L домена, и 5'H1 и 3'G за тежката верига основаваща се на праймери, описани от Dubel et al. [24].

сДНК на анти-CD3 scFv фрагмент любезно бе предоставена от А. Traunecker [25].

Пример 2. Конструирани на биспецифични едноверижни фрагменти и експресия в еукариоти

За получаване на анти-CD19 scFv-фрагмент, съответните VL- и VH-области, клонирани в отделни плазмидни вектори служат като матрици за VL- и VH-специфичен PCR, при използване на двойки олигонуклеотидни праймери 5'VLB5RRV/3'VLGS15 и 5'VHGS15/3'VHBspEI, съответно. По този начин припокриващите се комплементарни последователности се въвеждат в PCR-продуктите, които се комбинират, за да образуват кодиращата последователност от 15 аминокиселини (Gly₄Ser₁)₃-линкер по време на последващото сливане-PCR. Този етап на амплифициране се осъществява с праймерната двойка 5'VLB5RRV/3'VHBspEI и полученият слят продукт (или по-точно анти-CD19 scFv-фрагмент) се разцепва с рестрикционни ензими EcoRV и BspEI, като по този начин се клонира в KS-вектор (Stratagene) съдържащ или (EcoRI/Sall-кло-

ниран) кодираща последователност на анти-17-1A/анти-CD3 биспецифично едноверижно анти-25 тяло с N-терминален FLAG-tag [1] или този на модифицираната версия без FLAG/епитоп (21), като по този начин замества анти-17-1A-с анти-CD19-специфичност и предпазване на 5-аминокиселинен (Gly₃Ser₁)₁-линкер свързващ C-терминалния анти-CD3 scFv-фрагмент, съответно. След това, ДНК фрагментът, кодиращ двете версии на анти-CD19/анти-CD3 биспецифичното едноверижно анти-25 тяло с подредбата на домени VL_{CD19}-VH_{CD19}-VH_{CD3}-VL_{CD3} се субклонира EcoRI/Sall в описания експресионен вектор pEF-DHRF [1], съответно. Получените плазмидни ДНК се трансфектират в CHO-клетки с дефицит на DHFR-клетки чрез електропорация: Селекцията, генната амплификация и продуцирането на протеин се осъществяват както е описано [1]. В следващите примери са илюстрирани получените резултати с FLAG-съдържащата версия на bscCD19xCD3.

Пречистване на bscCD19xCD3 от супернатантата на трансфектирани CHO клетки дава добив 4 mg/l културална супернатанта. bsc-Ab се пречиства чрез неговата C-терминална хистидинова опашка чрез афинитетна хроматография върху Ni-NTA-колона както е описано [1]. bsc-Ab се елюира от Ni-NTA колоната като отделен пик при концентрация от 200 mM имидазол.

SDS-Page се провежда съгласно Laemmli [26] с 12% гел следвано от оцветяване с Coomassie brilliant blue R250 за анализиране на пречистването на bsc-Ab. Резултатите от SDS-PAGE анализа (Фиг. 1) показват очаквания размер на bsc-Ab (60 kDa).

Пример 3. Свързващи свойства на bsc-AbCD19xCD3

Свързващите свойства на bsc-Ab към CD3 и CD19 са показани чрез поточен цитометричен анализ върху CD3-позитивни Jurkat клетки, човешки PBMCs и известен брой различни клетъчни линии на CD19-позитивни В клетъчна лимфома, включително Blin I, SKW6.4, Daudi, VJAB and Raji. CD19-позитивни В клетъчни линии Daudi, Raji, VJAB (лимфома на Burkitt), SKW6.4 (човешки EBV трансформирани В клетки) и Blin-1 (pre В клетъчна линия) се използват при поточен цитометричен анализ и изследване за освобождаване на хром. Jurkat е CD3-позитивна Т клетъчна линия; BL60 и плазмцитомни клетъчни линии NCI и L363 са негативни за двете повърхностни молекули, CD3 и CD19. Клетъчните линии се култивират в пълна RPMI 1640 (Biochrom) среда с 10% FCS (GIBCO).

1×10^6 клетки се промиват с PBS, ресуспендират се в 200 μ l PBS с 10% Vernimmun (Centeon, Marburg, Germany) и 0,1% NaN_3 и се инкубират 30 min при 4°C. След етапа на центрофугиране (100 x g, 5 min) клетките се инкубират в 50 μ l bscCD19xCD3 (200 μ g/ml в PBS с 10% Vernimmun и 0,1% NaN_3) за 30 min при 4°C. Клетките се промиват двукратно с PBS. За откриването на bsc-Ab се използва FITC-конюгирано антитяло срещу His-tag (Dianova). Ирелевантните bsc-Ab 17-1AxCD3, получени от същата експресионна система като bscCD19xCD3, или His-tag антитялото самостоятелно, служат като негативни контроли. Поточната цитометрия се провежда с Becton Dickinson FACScan. Не се установява свързване върху BL60, които не експресират нито CD19 нито CD3 (Фиг. 2).

Пример 4. Цитотоксична активност на bsc-AbCD19xCD3 срещу CD19-позитивни лимфомни клетки

За bscCD19xCD3 антитялото е доказано, че е силно цитотоксично за няколко лимфомни клетъчни линии при изследване за освобождаване на ^{51}Cr (Фигура 3). От прясна коричка на

рана се изолират мононуклеарни клетки от човешка периферна кръв (PBMCs) като ефекторни клетки от произволни донори при използване на Lymphoprep™ (Nycomed) градиентно центрофугиране при 100 x g етапи на центрофугиране за отстраняване на тромбоцитите. CD19-позитивни В клетки се изтощават при използване на Dynabeads® M-450 CD19 (Dyna). Изтощените клетъчни популации се анализират чрез поточна цитометрия (Becton Dickinson), която показва 99% изтощаване на CD19-позитивни клетки. PBMCs се инкубират през цялата нощ при 37°C, 5% CO_2 , CD19-позитивни В клетъчни линии (Raji, Blin I, Daudi, VJAB, SKW6.4) се използват като клетки мишени.

Цитотоксичността се измерва при стандартно изследване за освобождаване на хром в облодънни 96-ямкови блюда (Nunc) при използване на RPMI 1640 пълна среда (Biochrom) с 10% FCS (GIBCO).

Нестимулирани PBMCs се прибавят в количества от 80 μ l среда към всяка ямка, съдържаща 20 μ l bsc-Ab в различни концентрации. След това се прибавят 100 μ l от ^{51}Cr -белязани клетки мишени (1×10^4), блюдата се центрофугират 3 min при 100 x g и се инкубират 4 h при 37°C, 5% CO_2 . След допълнителен етап на центрофугиране се отстраняват 50 μ l супернатанта и се изследват за освобождаване на ^{51}Cr в гама брояч (TopCount, Canberra Packard).

Спонтанното освобождаване се измерва при инкубиране на клетките мишени без ефекторни клетки или антитела, като максимално освобождаване се определя при инкубиране на клетките мишени с 10% TritonX-100. Инкубирането на клетките мишени с bscAb без ефекторни клетки не води до лизис, който може да се измери. Процентът специфичен лизис се изчислява с неспецифичното освобождаване в (%) = $\frac{(\text{срт, експериментално освобождаване}) - (\text{срт, спонтанно освобождаване})}{[(\text{срт, максимално освобождаване}) - (\text{срт, спонтанно освобождаване})]} \times 100$. Всички тестове се провеждат в трикратно повторение. SD при трикратните повторения за всички експерименти е под 6%. За наподобяване на *in vivo* условията, се използват нестимулирани PBMCs от здрави донори като ефекторни клетки. Може да се наблюдава бързото индуциране на цитотоксичността до 4 h без какъвто и да е протокол за предварително сти-

мулиране на Т-клетките. Като контрола bsc-антитяло с различна туморна специфичност (bsc17-1AхCD3), но генерирано чрез същата система, като bscCD19хCD3 антитялото, показва лизисна активност незначително над средния фон. Освен това, не може да се наблюдава цитотоксична активност при използване на плазмоцитомна клетъчна линия NCI и L363, които не експресират CD19 като клетки мишени (Фигура 4). При компетитивни изследвания с нарастващи количества CD19-специфично родителско моноклонално антитяло HD37, цитотоксичната активност на bscCD19хCD3 може почти напълно да се блокира (Фигура 5). Тези контроли показват, че bscCD19хCD3-медираните цитотоксични ефекти са антиген специфични. За да се получи повече информация за молекулярните механизми, как bscCD19хCD3 антитялото убива CD 19-позитивните клетки мишени, бе проведен опит да се блокира bscCD19хCD3-медираната цитотоксичност чрез EGTA. Както е показано на Фигура 6, цитотоксичната активност на bscCD19хCD3 може напълно да се блокира с EGTA, което означава, че специфичният лизис е по-скоро Т-клетъчно медиран ефект (най-вероятно чрез перфориновия синтетичен път), отколкото директен ефект (например, индуциращ апоптозис) на самото антитяло.

При използване на нестимулирани Т-клетки, даже при концентрации на антитялото под 1 ng/ml може да се наблюдава значителен цитотоксичен ефект срещу Blin-1 клетки (Фигура 7). Даже при относително ниски Е:Т съотношения [5:1; 2.5:1] и при много високи концентрации на антитялото от 10-100 pg/ml, bscCD19хCD3 антитялото може бързо да индуцира специфична цитотоксична активност на нестимулирани Т-клетки (Фигура 7). В противовес, конвенционално CD19хCD3 антитяло, генерирано по хибрид-хибридомна техника [5-7, 27] не показва значителна цитотоксична активност при тези условия, даже при концентрации до 3000 ng/ml (Фигура 7). Конвенционалното биспецифично антитяло се нуждае от допълнително Т-клетъчно престоимулиране и от високи концентрации на антитяло от приблизително 100 ng/ml, за индуциране на специфична Т-клетъчна цитотоксичност (не е показано), което е в съгласие с литературата [5-7, 27].

Пример 5. Изтощаване на първични (злокачествени) В-клетки с автоложни Т-клетки чрез

цитотоксична активност на bscCD19хCD3

С цел да се определи цитотоксичната активност на bscCD19хCD3 върху първични злокачествени В-клетки, мононуклеарни клетки от периферна кръв (PBMС) на пациент, страдащ от В-CLL (В-клетъчна производна хронична лимфатична левкемия) се изолират чрез Ficoll плътностно градиентно центрофугиране. Тези клетки се култивират последователно в присъствие или отсъствие на bscCD19хCD3 за 5 дни при 37°C/5% CO₂ в RPMI 1640 среда допълнена с 10% FCS и, по желание, с 60 U/ml IL-2. Поточният цитометричен анализ показва, че лимфоцитите от периферната кръв (PBL) на този определен NHL (Non-Hodgkin лимфома)-пациент (който след това систематично се лекува с bscCD19хCD3; виж пример 7) съдържат 92,6% CD19-позитивни В-клетки (= клетки мишени) и 7,4% CD3-позитивни Т-лимфоцити (= ефекторни клетки) при съотношение CD4/CD8 на Т-клетките от 2,6 : 4,8. По-голямата част от тези CD19-позитивни В-клетки се състои от злокачествени клетки. 3x10⁶ PBL/ml на ямка се посяват в обем от 1 ml за всяка в 24-ямкови блюда за тъкнени култури. За негативни контроли се използва културална среда с прибавяне на IL-2 и културална среда с прибавен IL-2 с ирелевантно биспецифично едноверижно антитяло bsc17-1AхCD3 (1) при концентрация от 0,5 micro g/ml. Както е показано на Фигура 9, не се открива изтощаване на CD19-позитивните клетки при тези условия след 5 дни инкубиране. Въпреки това, когато се добави bscCD19хCD3 в концентрации от 0,5 micro g/ml или 0,05 micro g/ml (било то в присъствие или в отсъствие на IL-2) почти всички CD19-позитивни В-клетки се убиват. Културалните клетки в този момент се състоят предимно от Т-лимфоцити с CD4/CD8 Т-клетъчно съотношение от приблизително 1:2 до 1:3. Това показва изключителната цитотоксичност на bscCD19хCD3 към CD19-позитивни В-клетки, при положение, че тоталното изтощаване на първичните В-клетки от автоложните Т-клетки може да се индуцира от концентрации от само 50 ng/ml при крайно неблагоприятно първоначално съотношение на ефекторни клетки мишени под 1:10, даже без IL-2 или друг вид допълнително Т-клетъчно стимулиране.

Пример 6. Пречистване на bscCD19хCD3 за терапевтично използване

BscCD19xCD3 се получава от клетки от яйчник на китайски хамстер (CHO) стабилно трансфектирани с експресионен вектор (pEF-DHFR; виж пример 2) кодиращ bscCD19xCD3 и, допълнително хексахистидин и FLAG tag. Клетките се развиват в безсерумна среда (Rencyte) в кух реактор от фибростъкло (Unisyn). Пет хиляди милилитра супернатанта от клетъчната култура се събират и стерилно се филтрират през 0.2 micro m филтър (AcroCap; Pall Gelman).

BscCD19xCD3 се открива и количествено се определя чрез Western blotting при използване на миши анти-FLAG IgG (Sigma) и козианти-миши IgG свързан към алкална фосфатаза (Sigma). Откриването се провежда чрез хемилуминисценция при използване на BCIP/NBT система (Devitron). Концентрациите на протеин се определят чрез изследване на Bradford (Biorad), при използване на говежди IgG (Biorad) като стандарт за протеина. Чистотата на колонните фракции се изследва чрез редуциране на натриев додецилсулфат (SDS) Bis/Tris 4-12% градиентна полиакриламидна гел електрофореза (PAGE) при използване на MOPS буферна система (Novex).

Пречистването на bscCD19xCD3 до хомогенност изисква катионообменна хроматография, афинитетна хроматография с кобалтов хелат и като последен етап гел филтрация. Тези етапи на пречистване се провеждат при използване на стандартни протоколи (виж по-горе). Поточна схема на метода на пречистване е показана на фигура 10.

Катионообменна хроматография: Супернатантата на клетъчната култура на CHO клетки се смесва с два обема буфер С (30 mM морфолиноетан сулфонова киселина [MES], 20 mM NaСв, 3 mM EDTA, 0.3 mM бензамидин хидрохлорид, pH 5.5) и се пропуска през 70 ml-SP Sepharose Fast Flow катионообменна колона (Pharmacia) при скорост на потока 20 ml/min. Колоната се уравнива с буфер А (20 mM MES, 20 mM NaСв, pH 5.8). След промиване с 5 обема на колоната с буфер А, bscCD19xCD3 се елюира със стъпаловиден градиент 45% буфер В (20 mM MES, 1 M NaСв, pH 5.8) в буфер А. Елюатът получава 0.045 обема 1 M Tris/НСв, pH 8.5, съдържащ 47 mM имидазол, след което се подлага на стерилно филтриране (0.2 microm; AcroCap). Типичен профил на елюиране на катионообмен-

ната хроматография е показан на Фигура 12. BscCD19xCD3 се съдържа във фракция 6.

Афинитетно пречистване с кобалтов хелат: Елюатът от катионообменната колона се пропуска при скорост на потока 2.5 ml/min през 10 ml-Chelating Sepharose Fast Flow колона (Pharmacia) уравнива в буфер АО (50 mM Na₂HPO₄, 400 mM NaCl, pH 8.0). Колоната е предварително уравнива с разтвор на 0.1 M кобалтов хлорид. След промиване с 33 обема на колоната с буфер АО, буфер А (50 mM Na₂HPO₄, 400 mM NaCl, 2 mM имидазол, pH 6.4) и градиент от 0-12% буфер В (50 mM Na₂HPO₄, 400 mM NaCl, 500 mM имидазол, pH 6.4) в буфер А, bscCD19xCD3 се елюира в един етап с 30 ml 100% буфер В. Елюатът се филтрира стерилно, следвано от приблизително 10-кратно концентриране в MacroSep устройство (Pall Gelman; 10 kD cut-off). Типичен профил за елюиране на афинитетната хроматография с кобалтов хелат е показан на Фигура 13. BscCD19xCD3 се открива във фракция No. 7.

Гел филтрация: Концентрираният елюат от афинитетната колона с кобалтов хелат се пропуска при скорост на потока 0.75 ml/min през 124 ml-High Load Superdex 200 колона (Pharmacia; prep grade) уравнива с фосфатно буферирани физиологичен разтвор (Gibco). bscCD19xCD3 се елюира във фракция с размер на молекулите, съответстващ на приблизително 55 kDa (Фигура 14, фракция No. 7). Към фракцията от гел филтрацията съдържаща bscCD19xCD3 се прибавя 5% човешки серумен албумин (Behring), следван от стерилно филтриране през 0.1 microm филтър (Millex; Millipore).

Изобилието на bscCD19xCD3 в супернатантата от клетъчната култура и различните активни фракции от колоната, както са анализирани чрез SDS-PAGE, са показани на Фигура 11. bscCD19xCD3 е главния открит протеин в супернатантата от клетъчната култура (ивица 2). Анти-CD19xанти-CD3 с висока степен на пречистване, който се използва при терапия на хора не показва откриваеми онечиствания (Фигура 11, ивица 5).

Пример 7. Клинично използване на bscCD19xCD3 при пациент с В-клетъчна лимфома

При доброволно използване, пациент (А-В, жена, родена 1937), страдаща от В-клетъчно

производна хронична лимфатична левкемия (В-СLL) се третира с биспецифично едноверижно анти тяло bscCD19xCD3.

История на пациента и разпределяне:

Пациентът е диагностициран с В-СLL през 1992. По време на първоначалното диагностициране болестта е била засегнала области на различни лимфни възли и далака; освен това, е била наблюдавана хемолитична анемия с аутоимунен произход, както и имуноглобулинов дефицит. Пациентката е със struma nodosa, което добре се контролира, и нормално състояние на щитовидната жлеза, чрез лечение с карбимазол 2.5 mg/d.

Пациентката е получила многократни цикли хемотерапия с хлорамбуцил и преднизон от 1992 до 1994. Следвайки прогресирането на болестта лечението е променено на циклофосфамид, дексорубицин, винкристин и преднизон (СНОР, 8 цикъла) и е постигната ремисия за повече от една година. При следващия рецидив пациентката получава нови 6 цикъла със СНОР, следвани от хлорамбуцил и преднизон и единична доза хлорамбуцил самостоятелно, което не довежда до никакво подобряване на болестта. През декември 1998, се провежда облъчване на далака, за да се контролира прогресирането на спленомегалия у пациентката. Пациентката претърпява силно намаляване на костния мозък с многобройни инфекциозни усложнения. Нейната анемия и тромбоцитопения изискват чести трансфузии на червени кръвни клетки и заместител на тромбоцити.

Поради напредналия стадий на заболяването и засегнатата функция на костния мозък, по-агресивни и по-високи дози хемотерапия не се препоръчват на пациентката. Лечение с анти-CD20 анти тяло ретуксимаб не се препоръчва, тъй като ефикасността на ретуксимаб във В-СLL не е добре изяснена до сега.

FACS анализ показва, че 95 % от клетките на периферната кръв на пациентката са CD19 позитивни клетки, докато 77 % от клетките експресира CD20 антигена. Инкубиране на клетки от периферна кръв на пациентката с bscCD19xCD3 показват подчертано изтощаване на CD19-позитивни В-клетки (виж пример 5). Поради тази причина лекуващите лекари са решили да лекуват пациентката с новия bscCD19xCD3 при доброволно използване. Пациентката бе информирана подробно за новостта на съединението и за по-

тенциалните рискове и ползи от такова лечение. Тя напълно разбра обясненията и даде писмено съгласие за доброволно използване.

Описание на клиничното прилагане:

5 Преди началото на лечението пациентката премина клиничен преглед и разширени диагностични процедури, за да се провери степента на заболяването и да се изключат всякакви други рискови фактори. Пациентката е в добро клинично състояние с анемия, с тромбоцитопения и загуба на тегло, но без каквото и да е засягане на сърдечно съдовата система или каквито и да са усложнения възпрепятстващи използването на bscCD19xCD3. През нощта преди първия ден на лечение пациентката се оплаква от мигренозно главоболие. За прилагането на bscCD19xCD3 пациентката е настанена в болнично заведение при засилено наблюдение, за да се подsigури бързо лечение при какъвто и да е спешен случай, който би могъл да възникне. За да се предотвратят каквито и да са остри реакции на цитокините и усложнения от туморен лизис, пациентката приема профилактично IV дози от 2 mg клемастин (Tavegil®) и 200 mg циметидин (Tagamet®), както и 300 mg алопуринол и 20 mg от омерпазол (Antra®).

30 Провежда се алкализизиране и хепаринизиране по време на лечението и последващия период. Освен това пациентката получи всяко необходимо симптоматично лечение.

Кръвни проби бяха взети преди и по време на прилагането на лекарственото средство, за да се следят биохимичните, хематологичните и имунологичните параметри.

35 1^{во} прилагане на bscCD19xCD3 (14 април, 1999):

40 Пациентката получава първа доза от 3 micro g bscCD19xCD3 като 20-минутна инфузия в изотоничен фосфатен буфер, съдържащ 5 % човешки серумен албумин (HSA). По време на инфузията пациентката няма странични ефекти. Приблизително 1 h след инфузията пациентката изпитва студ за около пет min, следвано от изпотяване, леко спадане на кръвното налягане с около 10 mm Hg и леко повишаване на телесната температура (+ 0.5°C) за около няколко h. Освен това нейното главоболие леко се засилва. Пациентката се третира с други 2 mg Tavegil® и 200 mg Tagamet®, 250 mg преднизолон (Solu-Decortin®) и 50 mg петидин (Dolantin®). Всич-

ки симптоми изчезват без да оставят последствия за следващия ден.

2^{ро} прилагане на bscCD19хCD3 (15 април 1999)

Втора доза от 10 microg bscCD19хCD3 се дава един ден по-късно при същите условия. Около един час след инфузията пациентката изпитва силен студ, треска (39.2 °C), слабо усилване на дишането и падане на кръвното. Пациентката се третира с 2 mg Tavegil, 200 mg Tagamet и 300 mg Solu-Decortin и 15 mg пиритрамид (Dipidolor®). За стабилизиране на нейната сърдечносъдова функция пациентката получава инфузия на допамин. След това лечение симптомите значително намаляват. Въпреки това, пациентката се прехвърля в кардиологично отделение за през нощта, за да се осигури постоянно наблюдение на жизнените признаци и незабавна намеса в случай на необходимост. Пациентката се привежда в обикновена болнична стая на следващата сутрин без никакви други усложнения.

По време на следващите три дни пациентката продължава да има субфебрилна температура (около 37.2°C) и развива нищожно плеврално изтичане един ден след втората доза (16 април 1999) и лек оток на долните крайници (18 април 1999). Сърдечносъдовата функция остава стабилна и лабораторните изследвания не показват значителни промени по отношение на сигурността, с изключение на повишаване на гамаглутамил-трансферазата след втората доза bscCD19хCD3 (Фигура 15).

Тъй като bscCD19хCD3 се понася от пациентката и страничните ефекти могат да бъдат контролирани със симптоматично лечение, прилагането на новия bscCD19хCD3 ще продължи при тази пациентка.

Клинична и имунологична ефикасност на bscCD19хCD3:

Клинични резултати:

Провежда се ултразвуков преглед на далака и на пет абдоминални аксиларни лимфни възли един ден преди и четири дни след прилагането на втората доза bscCD19хCD3. Вече един ден след 10 microg-овата доза (16 април 1999), лимфните възли, както и далака показват свиване от около 20 % в сравнение с базовите стойности. Това наблюдение се потвърждава при втори ултразвуков преглед на 19 април 1999. Тег-

лото на далака намалява до 350 g (от 1630 g базова стойност до 1280 g на 19 април 1999) (Таблица 1; Фигура 16).

Хематологични резултати:

Броят бели кръвни клетки, който включва повечето злокачествени В-клетки, намалява по време на курса на лечение и последващите дни (таблица 2; Фигура 17). С-реактивният протеин (CRP) е реакционен протеин на акутната фаза, който отразява активирането и ефекта на провъзпалителните процеси. Той забележимо намалява след прилагането на 10 microg bscCD19хCD3, следвано от непрекъснато намаляване по време на следващите три дни от наблюдението (таблица 2; Фигура 18).

Имунологични резултати

Нивото на серумни цитокини, което отразява острия имунологичен отговор на прилагането на съединението, се измерва преди и на различни интервали след прилагането на новото съединение. Серумните нива на цитокините и на разтворимия IL-2 рецептор се измерват чрез количествено ELISA изследване, съгласно инструкциите на производителя.

Тумор некротизис фактор TNF-алфа нараства значително по начин зависим от дозата, през първия час след прилагането на bscCD19хCD3 (Фигура 19).

Интерлевкин 6 (IL-6) и интерлевкин 8 (IL-8) също показват значително нарастване по начин зависим от дозата. Техните максимални нива се наблюдават 2 до 4 h след прилагането на bscCD19хCD3 (фигури 20, 21). Всички цитокини се връщат до базовите нива за няколко h.

Разтворимият IL-2 рецептор е повишен вече до базовата стойност, което може да се обясни с масата на злокачествените В-клетки, експресиращи IL-2 рецептора. След прилагане на новия bscCD19хCD3, се наблюдава нарастване на разтворимия IL-2 рецептор, което сочи активиране на ефекторните клетки (Фигура 22).

Изводи:

Новият bscCD19-CD3 се прилага надеждно на пациент страдащ от рефракторен В-CLL. Поносимостта на bscCD19хCD3 при доза от 3 microg и 10 microg е приемлива и добре може да се контролира чрез измервания на пролиферацията и симптоматично лечение.

Новият bscCD19хCD3 причинява свиване на преди това уголемения далак и лимфните

възли на пациента, както е показано на снимката от ултразвуковият преглед. Тъй като уголемяването на далака и на лимфните възли на пациента се причинява от инфилтриране със злокачествени В-клетки, свиването отразява разрушаването на злокачествените В-клетки като резултат от прилагането на bscCD19хCD3.

В ярък контраст на което и да е друго биспецифично CD19хCD3 антитяло, известно от състоянието на техниката, биспецифичното CD19хCD3 антитяло от изобретението (bscCD19хCD3) показва клинично действие при В-клетъчно производна не-Hodgkin лимфома, както е измерено чрез свиването на лимфоидните органи, инфил-

трирани от злокачествени В-клетки. Преимуществено, bscCD19хCD3 доказва, че е клинично ефективен при изненадващо ниски дози, които добре се понасят след системно прилагане. Следователно, клиничното действие на bscCD19хCD3 потвърждава неговата изключителна цитотоксична активност, както е определено *in vitro*.

Размерът на три абдоминални лимфни възли, един от ляво и един от дясно аксиларен лимфен възел и на далака се определят и се измерват ултразвуково при използване на Toshiba SSA100 устройство. Размерите са дадени в три измерения и в mm. Теглото на далака се изчислява от размера му и от ултразвуковата плътност.

ТАБЛИЦА 1:

Ефект на bscCD19xCD3 върху размера на лимфните възли и далака при пациент, страдащ от В-клетъчна лимфома

Ултразвукови измервания

	12 април, 1999	16 април, 1999	19 април, 1999
Лимфни възли			
Абдоминални			
	1) 54 x 29 x 14 mm	42 x 30 x 13 mm	42 x 30 x 14 mm
	2) 56 x 33 x 18 mm	43 x 33 x 18 mm	43 x 30 x 16 mm
	3) 46 x 32 x 27 mm	46 x 31 x 22 mm	47 x 32 x 23 mm
Аксиларни			
ляво	36 x 24 x 16 mm	34 x 22 x 15 mm	30 x 22 x 14 mm
дясно	37 x 24 x 13 mm	33 x 20 x 11 mm	32 x 23 x 14 mm
далак			
	270 x 146 x 69 mm	265 x 132 x 64 mm	265 x 128 x 63 mm
	1630 g	1340 g	1280 g

ТАБЛИЦА 2:

Кръвни нива на селекционни маркери в отговор на лечение с bscCD19xCD3.

		14, април 1999	15, април 1999	16, април 1999	17, април 1999	18, април 1999	19, април 1999
	Едини- ци						
GGT	УЛ	22	24 (сутрин) - (вечер)	124 (6.00 h) 107 (12.00 h)	96	89	87
LDH	УЛ	618	536 (сутрин) 773 (вечер)	548	697	551	539
Левкоци- ти	Gp/l	46,8	43,3 (сутрин) 22,3 (вечер)	36,9	37,0	28,3	36,6
Лимфо- цити	%	85	58,8 (сутрин) 82,0 (вечер)	60,9	64,4	65,5	88
CRP	mg/dl	< 0,4	1,0 (сутрин) 0,7 (вечер)	5,2	2,5	2,0	0,7

Кръвните нива на гама-глутамил трансферазата (GGT), лактата дехидрогеназата (LDH) и на С-реактивния протеин (CRP) се определят чрез стандартни клинични биохимични методи и се изразяват в единици/ml (GGT), единици/l (LDH) и mg/dl (CRP). Броят на левкоцитите се изразява като Giga точки/l, а броят на лимфоцитите се представя като процент от общите левкоцити. Базовите стойности на 14 април 1999, пре-

ди лечението се дават в първата колона. Отговорът на 3 micro g bscCD19xCD3 на 15 април 1999 (което е приложено на 14 април) е показано във втората колона. Отговорът на второто третиране с 10 micro g от съединението през същия ден е показан в третата колона. Кръвните нива на селекционните маркери през четвъртия ден следващи третирането с лекарственото средство са дадени в последните колони.

СПИСЪК НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ

(1) ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ:

(i) ЗАЯВИТЕЛ:

(A) ИМЕ: DOERKEN, Bernd
 (B) УЛИЦА: Lyckallee 47
 (C) ГРАД: Berlin
 (D) ЩАТ: none
 (E) ДЪРЖАВА: Germany
 (F) ПОЩЕНСКИ КОД (ZIP): 14055

(A) ИМЕ: RIETHMUELLER, Bernd
 (B) УЛИЦА: Finauer Str. 12
 (C) ГРАД: Munich
 (D) ЩАТ: none
 (E) ДЪРЖАВА: Germany
 (F) ПОЩЕНСКИ КОД (ZIP): 80805

(ii) ЗАГЛАВИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО:

CD19 X CD3 СПЕЦИФИЧНИ ПОЛИПЕПТИДИ И ТЯХНОТО ИЗПОЛЗВАНЕ

(iii) БРОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИ: 10

(iv) КОМПЮТЪРЕН ФОРМАТ:

(A) СРЕДА: флопи
 (B) КОМПЮТЪР: IBM PC съвместим
 (C) ОПЕРАЦИОННА СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS
 (D) СОФТУЕР: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 36 базови двойки
 (B) ВИД: нуклеинова киселина
 (C) ВЕРИЖНОСТ: единична
 (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

- (ii) ТИП МОЛЕКУЛА: друга нуклеинова киселина
(А) ОПИСАНИЕ: /desc = “олигонуклеотид”
(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: ДА

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТА: SEQ ID NO: 1:
GAAGCACGCG TAGATATCKT GMTSACCCAA WCTCCA 36

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (А) ДЪЛЖИНА: 30 базови двойки
(В) ВИД: нуклеинова киселина
(С) ВЕРИЖНОСТ: единична
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

- (ii) ТИП МОЛЕКУЛА: друга нуклеинова киселина
(А) ОПИСАНИЕ: /desc = “олигонуклеотид”

(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: ДА

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТА: SEQ ID NO: 2:
GAAGATGGAT CСAGCGGCCG CAGCATCAGC 30

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (А) ДЪЛЖИНА: 33 базови двойки
(В) ВИД: нуклеинова киселина
(С) ВЕРИЖНОСТ: единична
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

- (ii) ТИП МОЛЕКУЛА: друга нуклеинова киселина
(А) ОПИСАНИЕ: /desc = “олигонуклеотид”

(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: ДА

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТА: SEQ ID NO: 3:
CAGCCGGCCA TGGCGCAGGT SCAGCTGCAG SAG 33

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (А) ДЪЛЖИНА: 39 базови двойки
(В) ВИД: нуклеинова киселина
(С) ВЕРИЖНОСТ: единична
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

- (ii) ТИП МОЛЕКУЛА: друга нуклеинова киселина
(А) ОПИСАНИЕ: /desc = “олигонуклеотид”

(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: ДА

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТА: SEQ ID NO: 4:
ACCAGGGGCCAGTGGATAGA CAAGCTTGGG TGTCGTTTT 39

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 36 базови двойки
- (B) ВИД: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: единична
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) ТИП МОЛЕКУЛА: друга нуклеинова киселина

(A) ОПИСАНИЕ: /desc = "олигонуклеотид"

(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: ДА

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТА: SEQ ID NO: 5:
AGGTGTACAC TCCATATCCA GCTGACCCAG TCTCCA 36

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 6:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 48 базови двойки
- (B) ВИД: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: единична
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) ТИП МОЛЕКУЛА: друга нуклеинова киселина

(A) ОПИСАНИЕ: /desc = "олигонуклеотид"

(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: ДА

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТА: SEQ ID NO: 6:
GGAGCCGCCG CCGCCAGAAC CACCACSTTT GATCTCGAGCTTGGTCCC 48

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

- (A) ДЪЛЖИНА: 48 базови двойки
- (B) ВИД: нуклеинова киселина
- (C) ВЕРИЖНОСТ: единична
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) ТИП МОЛЕКУЛА: друга нуклеинова киселина

(A) ОПИСАНИЕ: /desc = "олигонуклеотид"

(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: ДА

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТА: SEQ ID NO: 7:

65066

GGCGGCGGCG GCTCCGGTGG TGGTGGTTCT CAGGTA CTGC AGAGTCGG 48

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 39 базови двойки

(B) ВИД: нуклеинова киселина

(C) ВЕРИЖНОСТ: единична

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) ТИП МОЛЕКУЛА: друга нуклеинова киселина

(A) ОПИСАНИЕ: /desc = "олигонуклеотид"

(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: ДА

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 8:

AATCCGGAGGAGACGGTGAC CGTGGTCCCTTGGCCCCAG 39

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 9:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 1611 базови двойки

(B) ВИД: нуклеинова киселина

(C) ВЕРИЖНОСТ: двойна

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) ТИП МОЛЕКУЛА: cДНК

(iii) ХИПОТЕТИЧНОСТ: НЕ

(ix) СВОЙСТВА:

(A) ИМЕ/КЛЮЧ: CDS

(B) РАЗПОЛОЖЕНИЕ: 11..1603

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА: SEQ ID NO: 9:

GAATTCCACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA 49

Met Gly Trp Ser Cys lie lie Leu Phe Leu Val Ala Thr

1

5

10

GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAC TAC AAA GAT GAT GAC GAT
 Ala Thr Gly Val His Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 15 20 25

AAG GAT ATC 97
 Lys Asp Ile

CAG CTG ACC CAG TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA
 Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 30 35 40

GGG CAG AGG 145
 Gly Gln Arg
 45

GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT
 Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr
 50 55

GAT GGT GAT 193
 Asp Gly Asp
 60

AGT TAT TTG AAC TGG TAC CAA CAG ATT CCA GGA CAG CCA
 Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro
 65 70

CCC AAA CTC 241
 Pro Lys Leu
 75

CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAT CTA GTT TCT GGG ATC CCA
 Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro
 80 85 90

CCC AGG TTT 289
 Pro Arg Phe

AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
 95 100 105

CAT CCT GTG 337
 His Pro Val

GAG AAG GTG GAT GCT GCA ACC TAT CAC TGT CAG CAA AGT
 Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser
 110 115 120

ACT GAG GAT 385
 Thr Glu Asp
 125

CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTC GAG ATC
 Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 130 135

AAA GGT GGT GGT 433
 Lys Gly Gly Gly
 140

GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGT TCT
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150

CAG GTG CAG CTG 481
 Gln Val Gln Leu
 155

CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG TCC
 Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 160 165

TCA GTG AAG ATT 529
 Ser Val Lys Ile
 170

TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TAC TGG
 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp
 175 180 185

ATG AAC TGG 577
 Met Asn Trp

GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT
 Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 190 195 200

GGA CAG ATT TGG 625
 Gly Gln Ile Trp
 205

CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG
 Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly
 290 295

GCC TCA GTG AAG 913
 Ala Ser Val Lys
 300

ATG TCC TGC AAG ACT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC
 Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 305 310

ACG ATG CAC 961
 Thr Met His
 315

TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT
 Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 320 325 330

GGA TAC ATT 1009
 Gly Tyr Ile

AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC
 Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 335 340 345

AAG GAC AAG 1057
 Lys Asp Lys

GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC
 Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 350 355 360

ATG CAA CTG 1105

Met Gln Leu

365

AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT

Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

370

375

GCA AGA TAT 1153

Ala Arg Tyr

380

TAT GAT GAT CAT TAC TGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC

Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

385

390

ACC ACT CTC 1201

Thr Thr Leu

395

ACA GTC TCC TCA GTC GAA GGT GGA AGT GGA GGT TCT GGT

Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

400

405

410

GGA AGT GGA 1249

Gly Ser Gly

GGT TCA GGT GGA GTC GAC GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT

Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser

415

420

425

CCA GCA ATC 1297

Pro Ala Ile

ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys

430

435

440

AGA GCC AGT 1345

Arg Ala Ser

445

TCA AGT GTA AGT TAC ATG AAC TGG TAC CAG CAG AAG TCA
 Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
 450 455

GGC ACC TCC 1393
 Gly Thr Ser
 460

CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC AAA GTG GCT TCT
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
 465 470

GGA GTC CCT 1441
 Gly Val Pro
 475

TAT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCA TAC TCT
 Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 480 485 490

CTC ACA ATC 1489
 Leu Thr Ile

AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 495 500 505

CAA CAG TGG 1537
 Gln Gln Trp

AGT AGT AAC CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG
 Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 510 515 520

GAG CTG AAA 1585
 Glu Leu Lys
 525

CAT CAT CAC CAT CAT CAT TAGTCGAC 1611
 His His His His His His
 530

(2) ИНФОРМАЦИЯ ЗА SEQ ID NO: 10:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТТА:

(A) ДЪЛЖИНА: 531 amino acids

(B) ТИП: аминокиселина

(D) ТОПОЛОГИЯ: линейна

(ii) ТИП НА МОЛЕКУЛАТА: протеин

(xi) ОПИСАНИЕ НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ: SEQ ID NO: 10:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Asp Ile Gln Leu Thr
 20 25 30

 Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile
 35 40 45

 Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu
 50 55 60

 Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

 Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser
 85 90 95

 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val
 100 105 110

 Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr
 115 120 125

 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys

165 170 175

Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln

180 185 190

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp

195 200 205

Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr

210 215 220

Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala

225 230 235 240

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr

245 250 255

Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

260 265 270

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln

275 280 285

Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys

290 295 300

Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys

305 310 315 320

Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser

325 330 335

Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu

340 345 350

Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu

355 360 365

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp
 370 375 380

His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 385 390 395 400

Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 405 410 415

Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala
 420 425 430

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
 435 440 445

Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
 450 455 460

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe
 465 470 475 480

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
 485 490 495

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
 500 505 510

Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His His
 515 520 525

His His His
 530

Патентни претенции

1. Едноверижен мултифункционален полипептид, включващ

(а) първи домен, съдържащ сайт за свързване на имуноглобулинова верига или антитяло, специфично разпознаващо CD19 антигена; и

(б) втори домен, съдържащ сайт за свързване на имуноглобулинова верига или антитяло, специфично разпознаващо CD3 антиген в човешки Т клетки,

характеризиращ се с това, че посочените домени са подредени в следния ред $V_L CD19-V_H CD19-V_H CD3-V_L CD3$.

2. Полипептид, съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че посочените два домена са свързани чрез полипептиден линкер.

3. Полипептид, съгласно претенция 1 или 2, характеризиращ се с това, че първият и/или вторият домен наподобяват или съответстват на V_H и V_L областите на естествено съществуващо в природата антитяло.

4. Полипептид, съгласно коя да е претенция от 1 до 3, характеризиращ се с това, че посоченото антитяло е моноклонално антитяло, синтетично антитяло или хуманизирано антитяло.

5. Полипептид, съгласно коя да е претенция от 1 до 4, характеризиращ се с това, че поне един от посочените домени е едноверижен фрагмент на вариабилната област на антитялото.

6. Полипептид, съгласно коя да е претенция от 2 до 5, характеризиращ се с това, че посоченият полипептиден линкер съдържа множество глицинови, аланинови и/или серинови остатъци.

7. Полипептид, съгласно коя да е претенция от 2 до 6, характеризиращ се с това, че посоченият полипептиден линкер съдържа множество последователни копия на аминокиселинна последователност.

8. Полипептид, съгласно коя да е претенция от 2 до 7, характеризиращ се с това, че посоченият полипептиден линкер съдържа от 1 до 5 аминокиселинни остатъка.

9. Полипептид, съгласно коя да е претенция от 2 до 8, характеризиращ се с това, че посоченият полипептиден линкер съдържа аминокиселинните последователности:

Gly Gly Gly Gly Ser.

10. Полипептид, съгласно коя да е претенция от 1 до 9, характеризиращ се с това, че посоченият първи домен съдържа поне един CDR от V_H и V_L областта, включващ аминокиселинната последователност кодирана от ДНК последователността, посочена на Фигура 8, от нуклеотиди 82 до 414 (V_L) и нуклеотид 460 до 831 (V_H) и/или когато посоченият домен съдържа поне един CDR от V_H и V_L областта, включващ аминокиселинната последователност, кодирана от ДНК последователността, посочена на Фигура 8, от нуклеотиди 847 до 1203 (V_H) и нуклеотиди 1258 до 1575 (V_L).

11. Полипептид, съгласно коя да е претенция от 1 до 10, характеризиращ се с това, че

(а) посоченият сайт за свързване на първия домен е с афинитет поне от приблизително 10^{-7} M; и/или

(б) посоченият сайт за свързване на втория домен е с афинитет поне от приблизително 10^{-7} M.

12. Полипептид, съгласно коя да е претенция от 1 до 11, характеризиращ се с това, че е биспецифично едноверижно антитяло.

13. Полипептид, съгласно коя да е претенция от 1 до 12, характеризиращ се с това, че съдържа поне още един друг домен.

14. Полипептид, съгласно претенция 13, характеризиращ се с това, че посоченият друг домен е свързан чрез ковалентни или нековалентни връзки.

15. Полипептид, съгласно претенция 13 или 14, характеризиращ се с това, че поне един друг домен включва ефекторна молекула с конформация подходяща за биологична активност, способна да отдели един йон или избирателно да се свързва към твърд носител или към предварително избрана детерминанта.

16. Полинуклеотид, който при експресия кодира полипептид, съгласно коя да е претенция от 1 до 15.

17. Вектор, включващ полинуклеотид, съгласно претенция 16.

18. Клетка, трансфектирана с полинуклеотида от претенция 16 или вектора от претенция 17.

19. Метод за получаване на полинуклеотид съгласно коя да е претенция от 1 до 15, характеризиращ се с това, че се култивират клетки съгласно претенция 18 и се изолира посоче-

ният полипептид от културата.

20. Състав, характеризиращ се с това, че включва полипептид, съгласно коя да е претенция от 1 до 15, полинуклеотид от претенция 16 или вектор от претенция 17.

21. Съставът, съгласно претенция 20, характеризиращ се с това, че е фармацевтичен състав, по желание включващ освен това фармацевтично приемлив носител.

22. Съставът, съгласно претенция 20, характеризиращ се с това, че е състав за диагностика, по желание включващ освен това подходящи средства за определяне.

23. Използване на полипептида, съгласно коя да е претенция от 1 до 15, полинуклеотида от претенция 16 или вектора от претенция 17 за получаване на фармацевтичен състав за лечение на В-клетъчни злокачествени заболявания, В-клетъчно медиранни автоимунни заболявания или изтощаване на В-клетките.

24. Използване, съгласно претенция 23, характеризиращо се с това, че посоченото В-клетъчно злокачествено заболяване е В-клетъчна лимфома, не-Hodgkin лимфома, или В-клетъчна хронична лимфатична левкемия (B-CLL).

25. Използване, съгласно претенция 23, характеризиращо се с това, че посочените В-клетъчни медиранни автоимунни заболявания са Миастения Гравис, Морбус Базедов, Хашимото тиреоидитис или Гудпастор синдром.

26. Използване на полинуклеотид съгласно претенции от 1 до 15, полинуклеотид съгласно претенция 16, или на вектор от претенция 17 за получаване на фармацевтичен състав за забавяне на патологични състояния, причинени от В-клетъчни нарушения.

27. Използване на полинуклеотид съгласно претенция 16, или на вектор от претенция 17 за получаване на състави за генна терапия.

28. Метод за идентифициране на активатори или инхибитори на Т-клетъчното активиране или стимулиране, който включва:

(а) култивиране на Т-клетки и CD19 позитивни клетки, за предпочитане В-клетки, в присъствие на полипептид съгласно коя да е претенция от 1 до 15 и, по желание, в присъствие на съставка, способна да предостави сигнал, който може да бъде открит, в отговор на Т-клетъчно активиране със съединение, което трябва да се скринира, при условия, при които да се поз-

воли активиране на Т-клетките, и

(b) откриване присъствието или отсъствието на сигнал, генериран от взаимодействието на съединението с клетките.

5

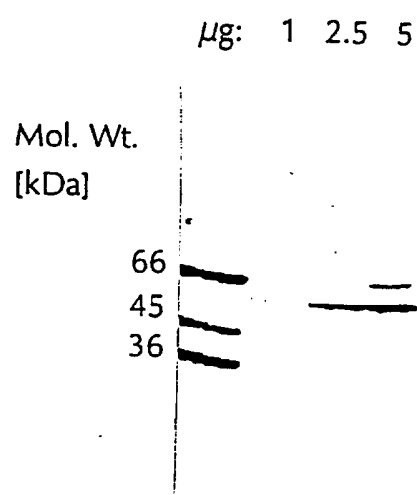
Приложение: 22 фигури

Литература

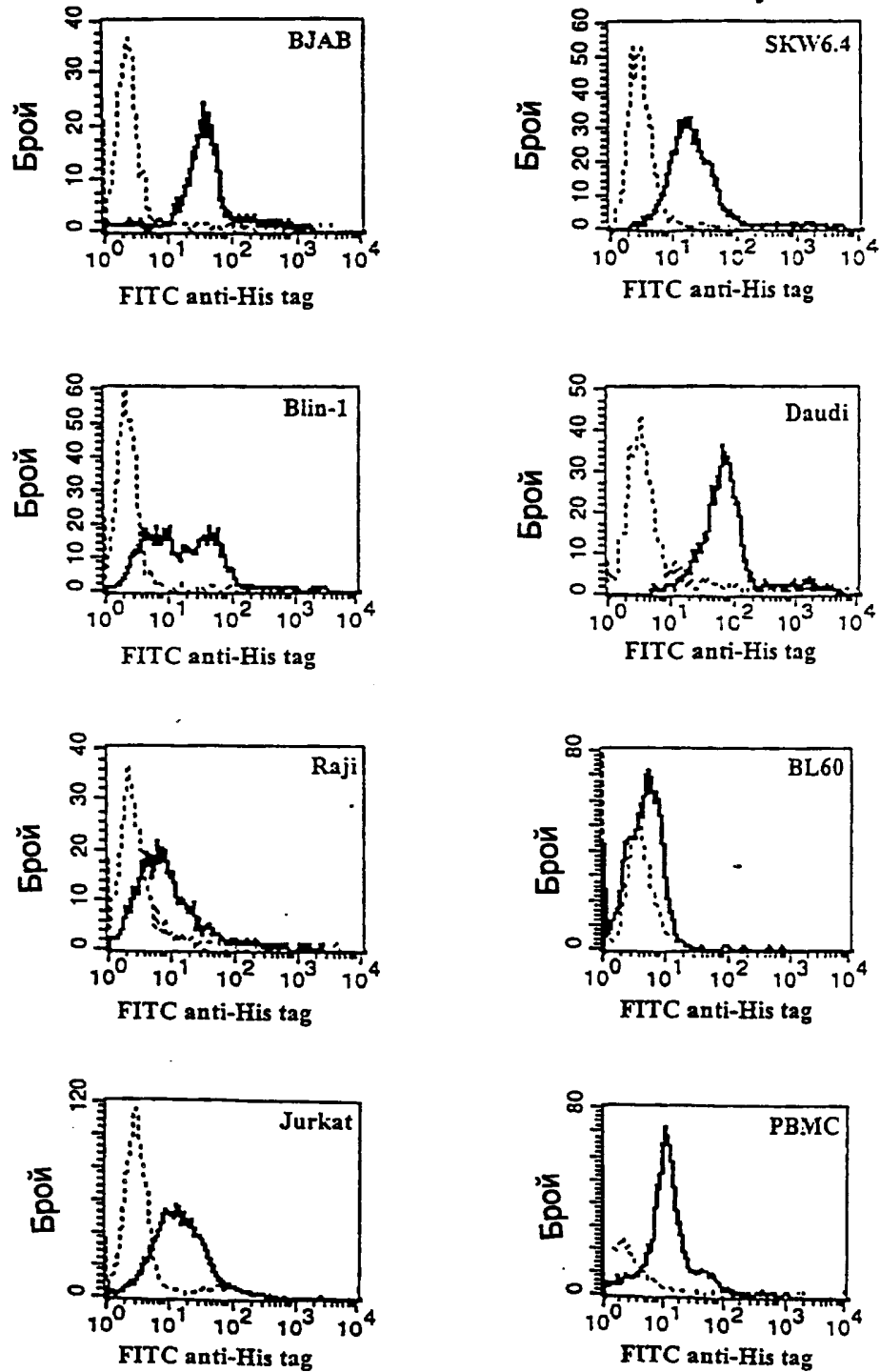
1. Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021-5.
2. Gianni, N. Engl. J. Med. 336 (1997), 1290-7.
3. Urba, J. Natl. Cancer Inst. Monogr. (1990), 29-37.
4. Fisher, Cancer (1994).
5. Bohlen, Blood 82 (1993), 1803-121.
6. Bohlen, Cancer Res 53 (1993), 18:4310-4.
7. Bohlen, Cancer Res 57 (1997), 1704-9.
8. Haagen, Clin. Exp. Immunol. 90 (1992), 368-75.
9. Haagen, Cancer Immunol. Immunother. 39 (1994), 391-6.
10. Haagen, Blood 84 (1994), 556-63.
11. Haagen, Blood 85 (1995), 3208-12.
12. Weiner, Leuk Lymphoma 16 (1995), 199-207.
13. Csoka, Leukemia 10 (1996), 1765-72.
14. Uckun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8603-7.
15. Staerz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 1453-7.
16. Lanzavecchia, Eur. J. Immunol. 17(1987), 105-11.
17. Mallender, J. Biol. Chem. 269 (1994), 199-206.
18. Gruber, J. Immunol. 152 (1994), 5368-74.
19. Kostelny, J. Immunol. 148 (1992), 1547-53.
20. Mack, J. Immunol. 158 (1997), 3965-70.
21. Kufer, Cancer Immunol. Immunother. 45 (1997), 193-7.
22. Pezzutto, J. Immunol. 138 (1987), 2793-9.
23. Ortandi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 3833-7.
24. Dubel, J. Immunol. Methods 175 (1994), 89-95.
25. Traunecker, Embo J. 10 (1991),

- 3655-9.
26. Laemmli, *Nature* 227 (1970), 680-5.
27. Bohlen, *J. Immunol. Methods* 173 (1994), 55-62.
28. Demanet, *Int. J. Cancer Suppl.* 7 (1992), 5 67-8.
29. De, *J. Hematother.* 4 (1995), 433-7.
30. Haagen, *Leuk Lymphoma* 19 (1995), 381-93.
31. Anderson, *Blood* 80 (1992), 2826-34. 10
32. Zhu, *Int. J. Cancer* 62 (1995), 319-24.
33. Hartmann, *Blood* 89(1997), 2042-7.
34. Valone, *J. Clin. Oncol.* 13 (1995), 2281-92.
35. Valone, *J. Hematother.* 4 (1995), 471-5.
36. Bolhuis, *Int. J. Cancer Suppl.* 7 (1992), 78-81.
37. Canevari, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995), 1463-9.
38. Nitta, *Lancet* 335 (1990), 368-71.
39. Yokota, *Cancer Res.* 52 (1992), 3402-8.
40. Weiner, *J. Immunol.* 152 (1994), 2385-92.
41. Maloney, *Blood* 84 (1994), 2457-66.
42. Reff, *Blood* 83 (1994), 435-45.
43. Kipriyanov, *Int. J. Cancer* 77 (1998), 763-772.

Фигура 1:
Оцветен с Coomassie Blue SDS/полиакриламиден гел на
пречистен bscCD19xCD3

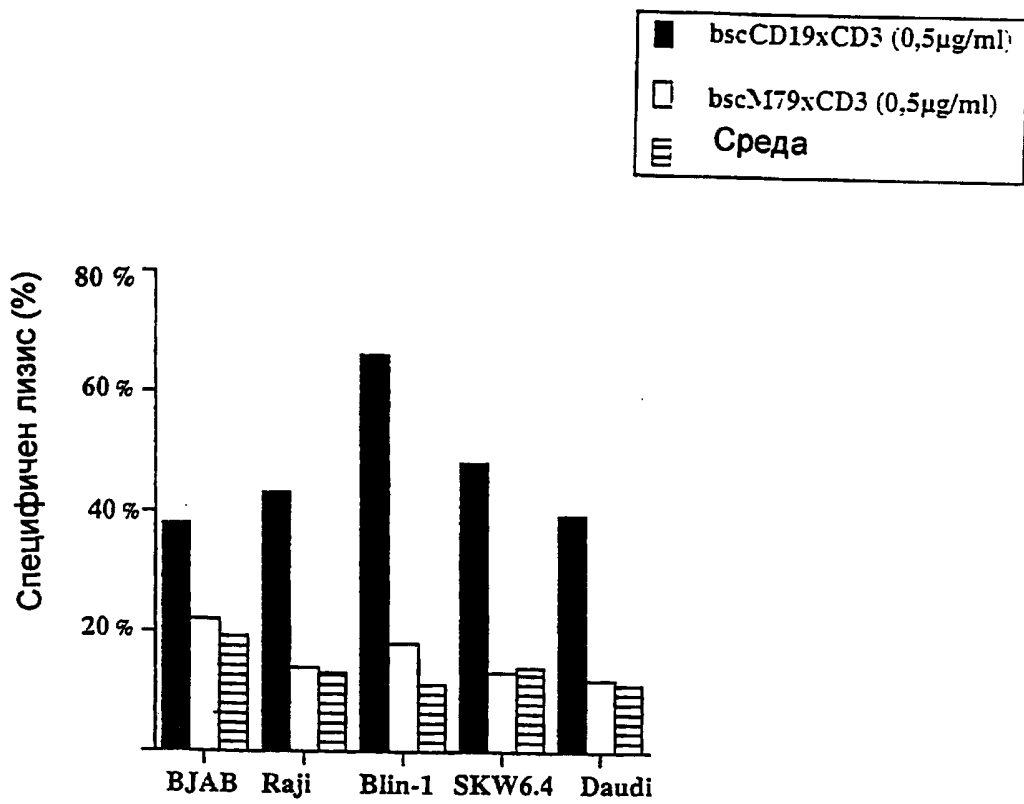


Фигура 2:



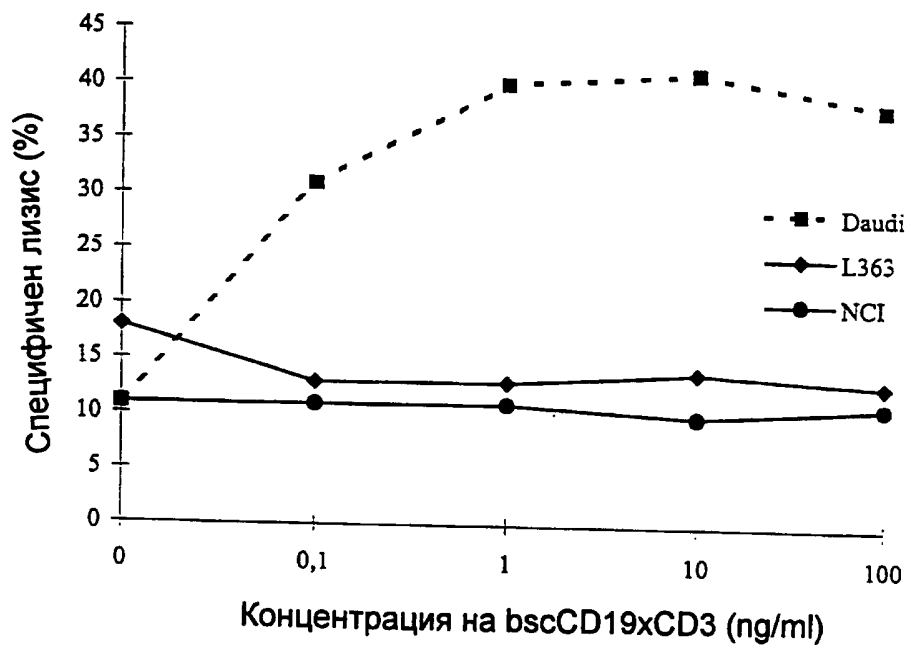
Фигура 3:

Цитотоксичност на bscCD19xCD3 при изследване за освобождаване на ^{51}Cr с нестимулиран РВМС срещу различни В-клетъчни линии



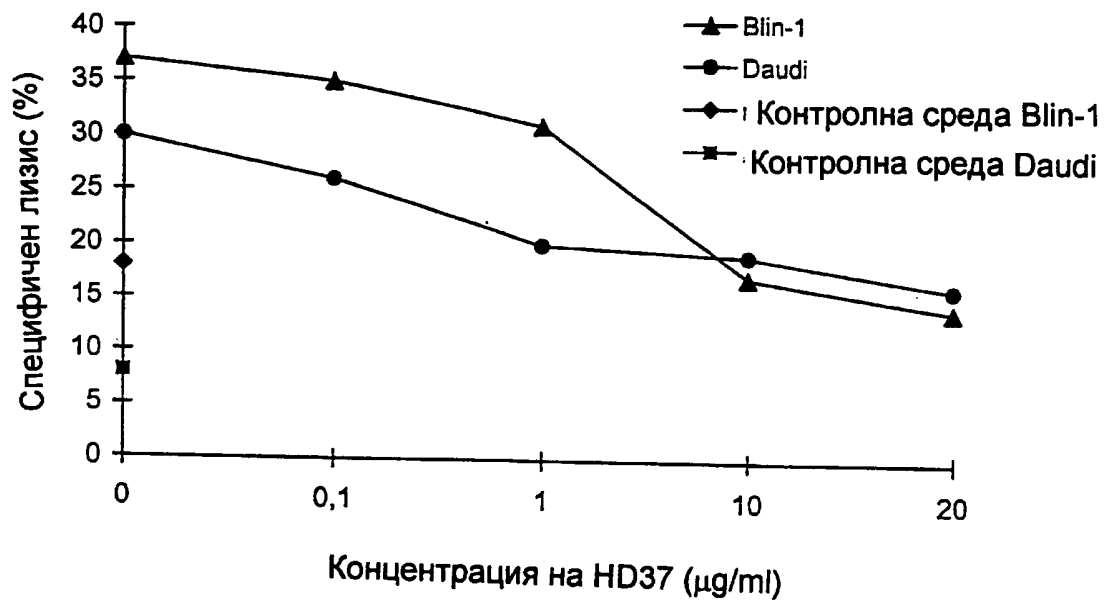
Фигура 4:

Изследване за цитотоксичност с PBMC срещу CD19⁺ Daudi и CD19⁻ цитоплазматични клетки (L363 и NCI)



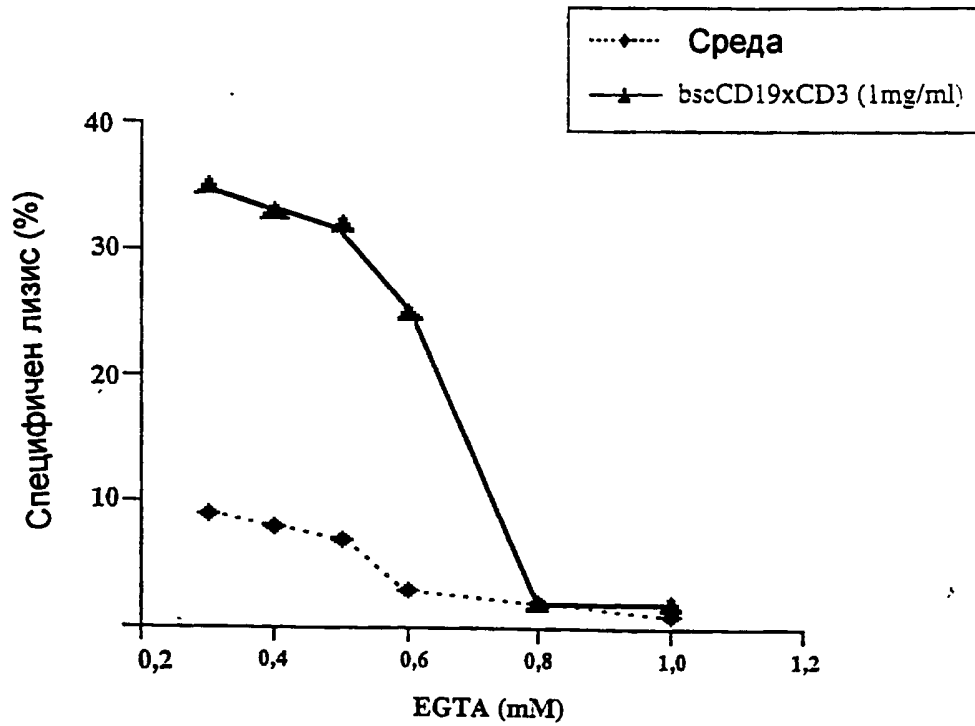
Фигура 5:

Инхибиране цитотоксичността на bscCD19xCD3 от родителското анти-CD19 антитяло HD37



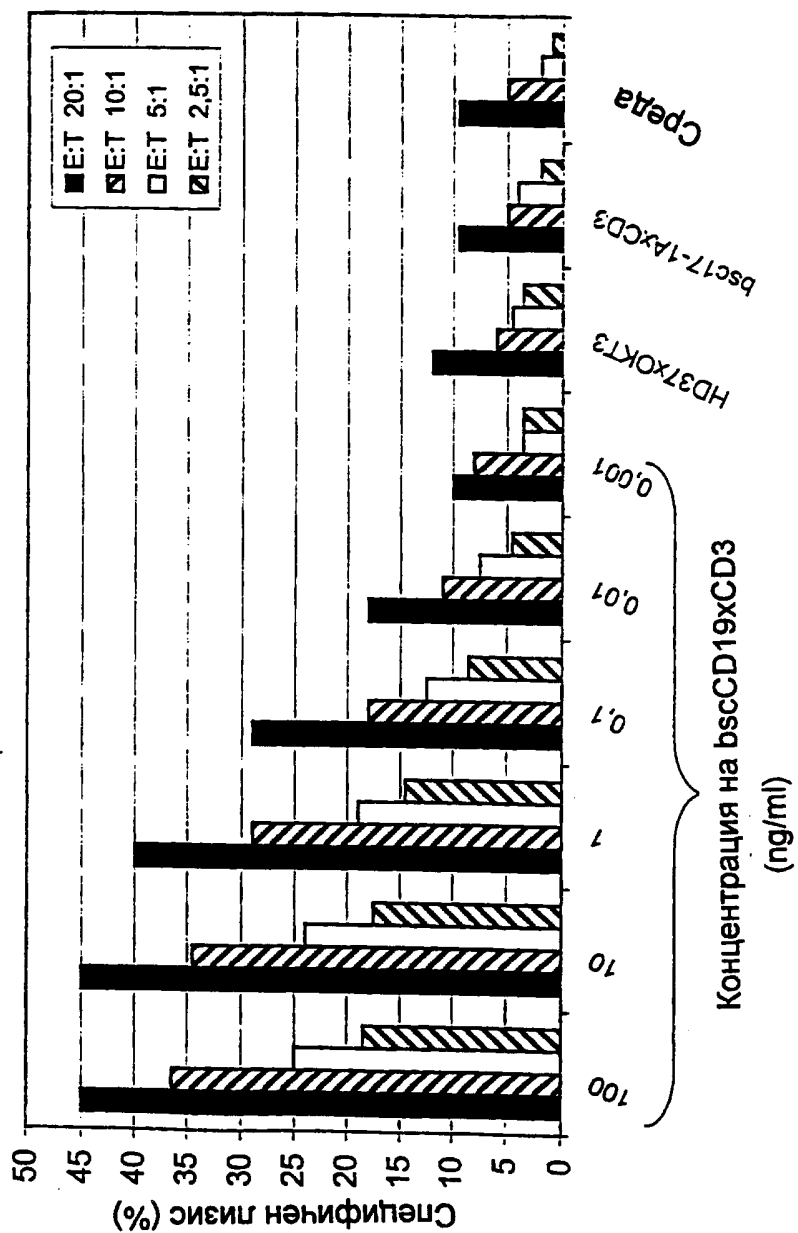
Фигура 6:

Изследване за цитотоксичност с нестимулирани PBMC срещу Daudi клетки след прибавяне на нарастващи количества EGTA



Фигура 7:

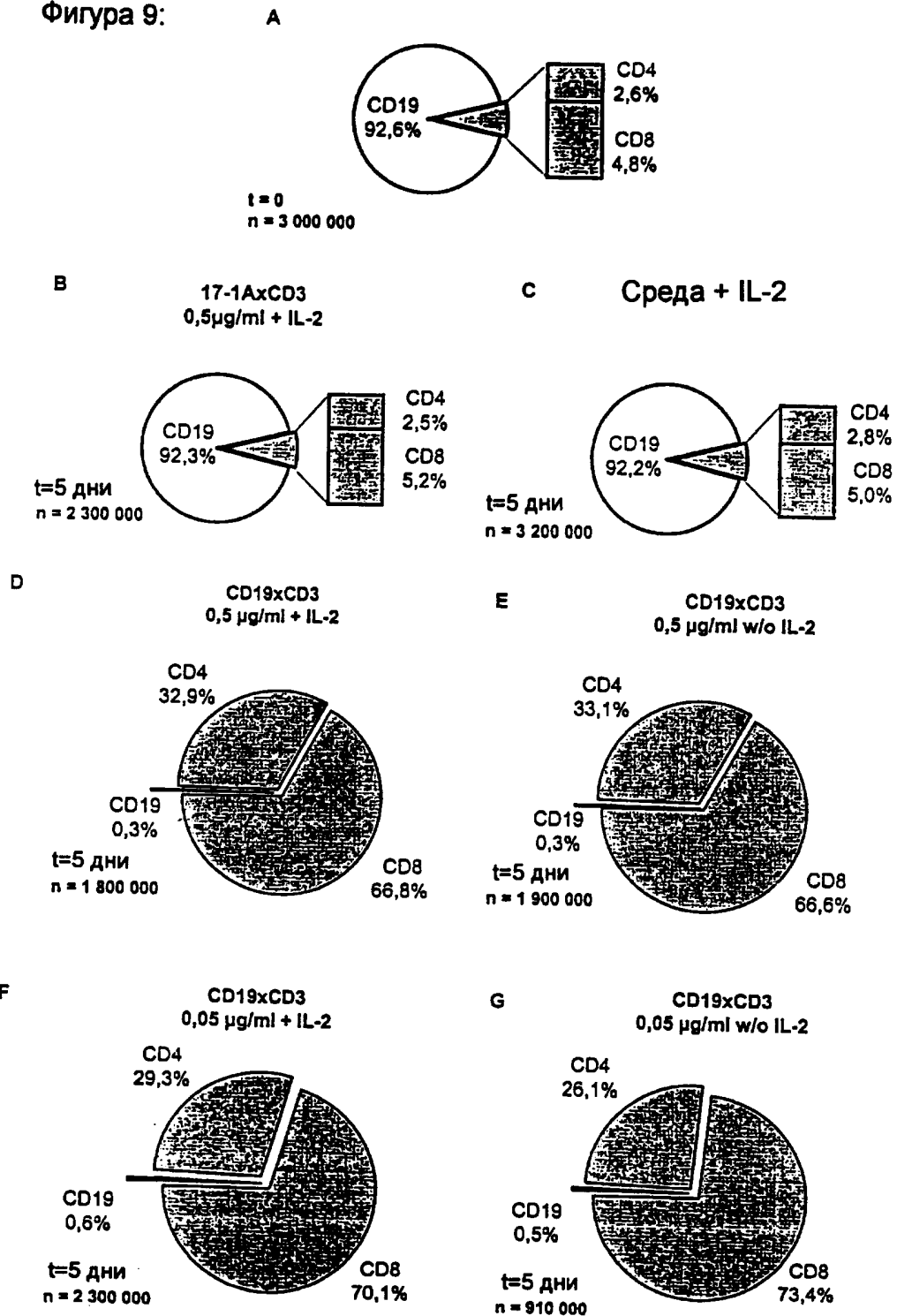
Цитотоксичност на bscCD19xCD3 в изследване за освобождаване на ^51Cr с нестимулирани РВМС в различни съотношения Е:Т



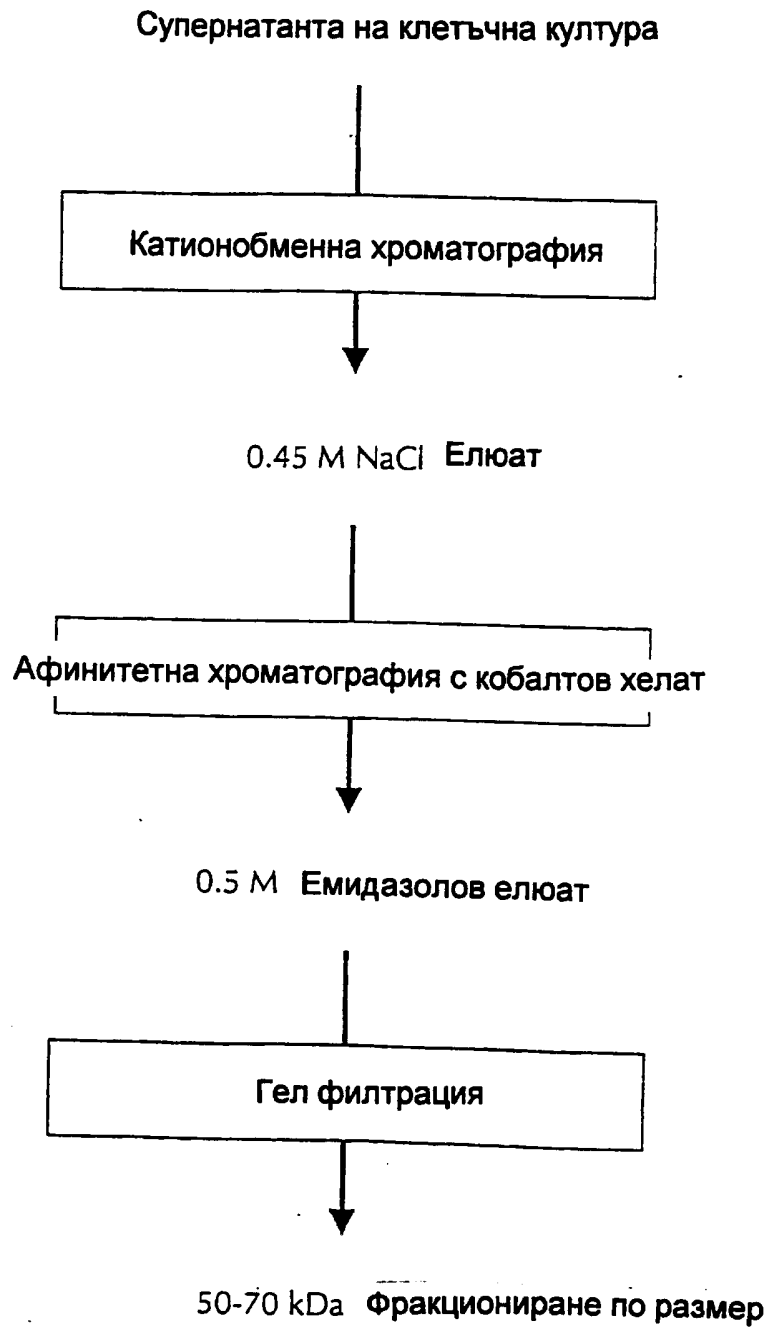
Фигура 8: (Продължение)

GAG	ACT	765	ACG	ACG	GTA	774	GGC	CGT	TAT	783	TAT	GCT	792	ATG	GAC	TAC	801	TGG	GGC	CAA	810	GGG
E	T	T	T	V	G	R	Y	Y	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G					
ACC	ACG	819	GTC	ACC	GTC	828	TCC	GGA	GGT	837	GGT	GGA	846	TCC	GAT	ATC	855	AAA	CTG	CAG	864	CAG
T	T	V	T	V	S	S	G	G	G	G	S	D	I	K	L	Q	Q					
TCA	GGG	873	GCT	GAA	CTG	882	GCA	AGA	CCT	891	GGG	GCC	900	GTC	AAG	ATG	909	TCC	TGC	AAG	918	ACT
S	G	A	E	L	A	R	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	T					
TCT	GGC	927	TAC	ACC	TTT	936	ACT	AGG	TAC	945	ACG	ATG	954	CAC	TGG	GTA	953	AAA	CAG	AGG	972	GGA
S	G	Y	T	F	T	R	Y	T	M	H	W	V	K	Q	R	P	G					
CAG	GGT	981	CTG	GAA	TGG	990	ATT	GGA	TAC	999	AAT	CCT	1008	AGC	CGT	GGT	1017	TAT	ACT	AAT	1026	TAC
Q	G	L	E	W	I	G	-Y	I	N	P	S	R	G	Y	T	N	Y					
AAT	CAG	1035	AAG	TTC	AAG	1044	GAC	AAG	GCC	1053	ACA	TTG	1062	ACT	ACA	GAC	1071	AAA	TCC	AGC	1080	ACA
N	Q	K	F	K	D	X	A	T	L	T	T	D	K	S	S	S	T					
GGC	TAC	1089	ATG	CAA	CTG	1098	AGC	CTG	ACA	1107	TCT	GAG	1116	GAC	TTT	GCA	1125	GTC	TAT	TAC	1134	TGT
A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C					
GCA	AGA	1143	TAT	TAT	GAT	1152	GAT	CAT	TAC	1161	TGC	CTT	1170	GAC	TAC	TGG	1179	GGC	CAA	GGC	1188	ACT
A	R	Y	Y	D	D	H	Y	C	L	D	Y	W	G	Q	G	T	T					
CTC	ACA	1197	GTC	TCC	TCA	1206	GTC	GAA	GGT	1215	GGA	AGT	1224	GGA	GGT	TCT	1233	GGT	GGA	AGT	1242	GGA
L	T	V	S	S	V	E	G	G	S	G	G	S	G	G	S	G	G	S	G	G		
TCA	GGT	1251	GGA	GTC	GAC	1260	GAC	ATT	CAG	1269	CTG	ACC	1278	CAG	TCT	CCA	1287	GCA	ATC	ATG	1296	TCT
S	G	G	V	D	D	I	Q	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A					
TCT	CCA	1305	GGG	GAG	AAG	1314	GTC	ACC	ATG	1323	ACC	TGC	1332	AGA	GCC	AGT	1341	TCA	AGT	GTA	1350	TAC
S	P	G	E	K	V	T	M	T	C	R	A	S	S	S	V	S	Y					
ATG	AAC	1359	TGG	CAC	CAG	1368	CAG	AAG	TCA	1377	GGC	ACC	1386	TCC	CCC	AAA	1395	AGA	TGG	ACT	1404	TAT
M	N	W	Y	Q	Q	K	S	G	T	S	P	K	R	W	I	Y	D					
ACA	TCC	1413	AAA	GTC	GCT	1422	TCT	GGA	GTC	1431	CCT	TAT	1440	CGC	TTC	AGT	1449	GGC	AGT	GGG	1458	TCT
T	S	X	V	A	S	G	V	P	Y	R	F	S	G	S	G	S	G					
ACC	TCA	1467	TAC	TCT	CTC	1476	ACA	ATC	AGC	1485	AGC	ATG	1494	GAG	GCT	GAA	1503	GAT	GCT	GCC	1512	TAT
T	S	Y	S	L	T	T	S	S	M	E	A	E	D	A	A	T	Y					
TAC	TGC	1521	CAA	CAG	TGG	1530	AGT	AGT	AAC	1539	CCG	CTC	1548	ACG	TTC	GGT	1557	GGT	GGG	ACC	1566	CTG
Y	C	Q	Q	W	S	S	N	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L					
GAG	CTG	1575	AAA	CAT	CAT	1584	CAC	CAT	CAT	1593	CAT	TAG	TCG	AC	3'							
E	L	K	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H					

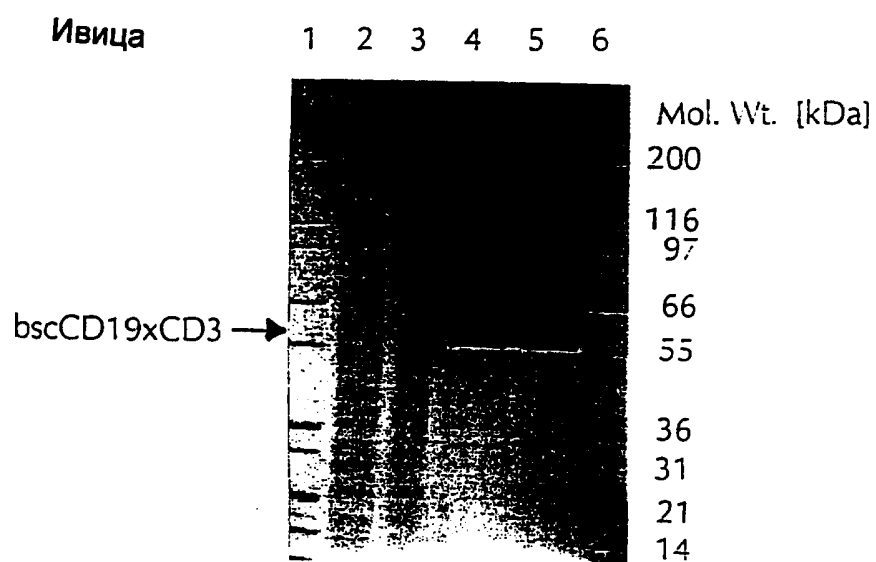
Фигура 9:



Фигура 10: Пречистване на bscCD19xCD3

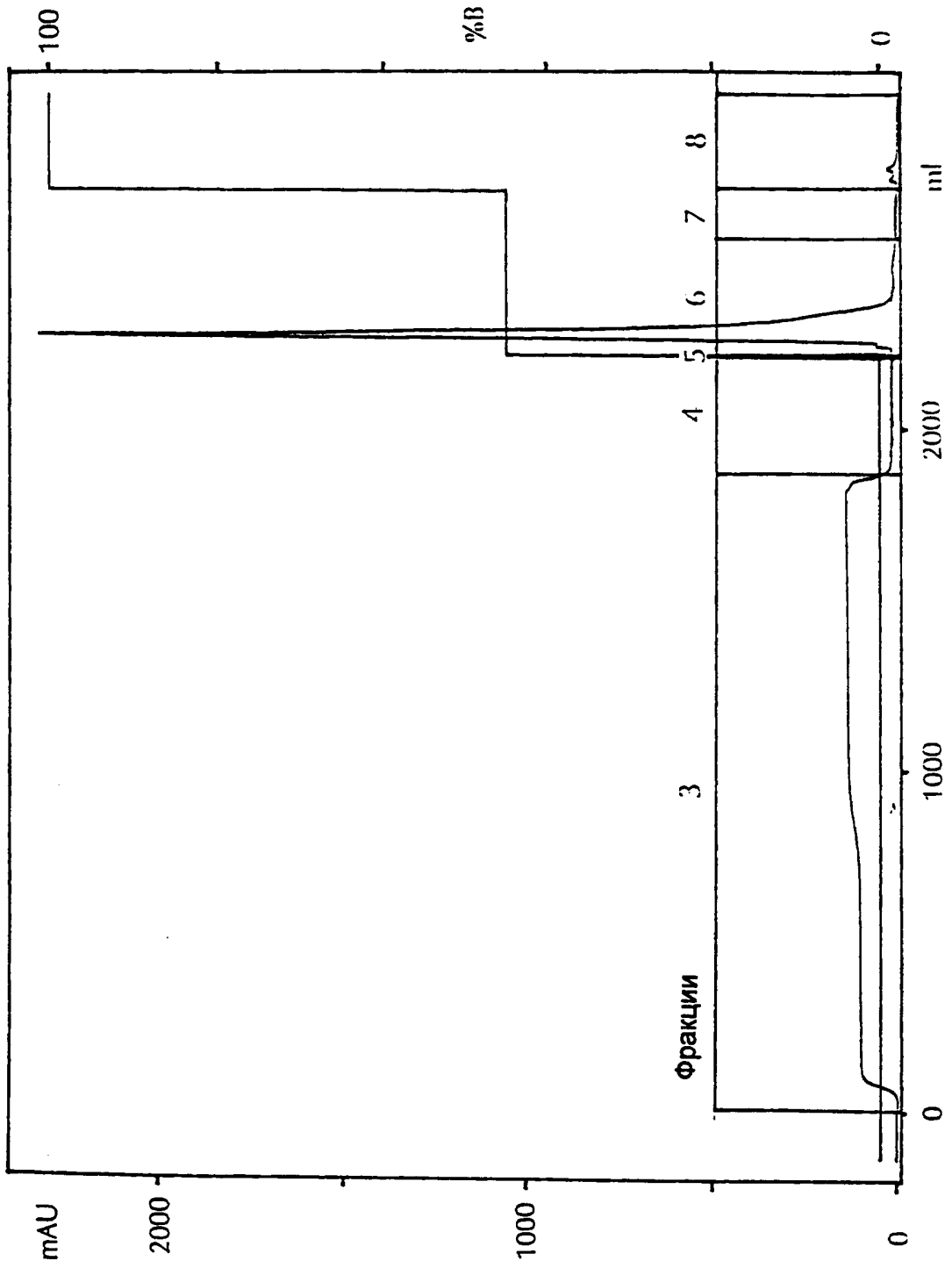


Фигура 11: SDS-PAGE анализ на bscCD19xCD3



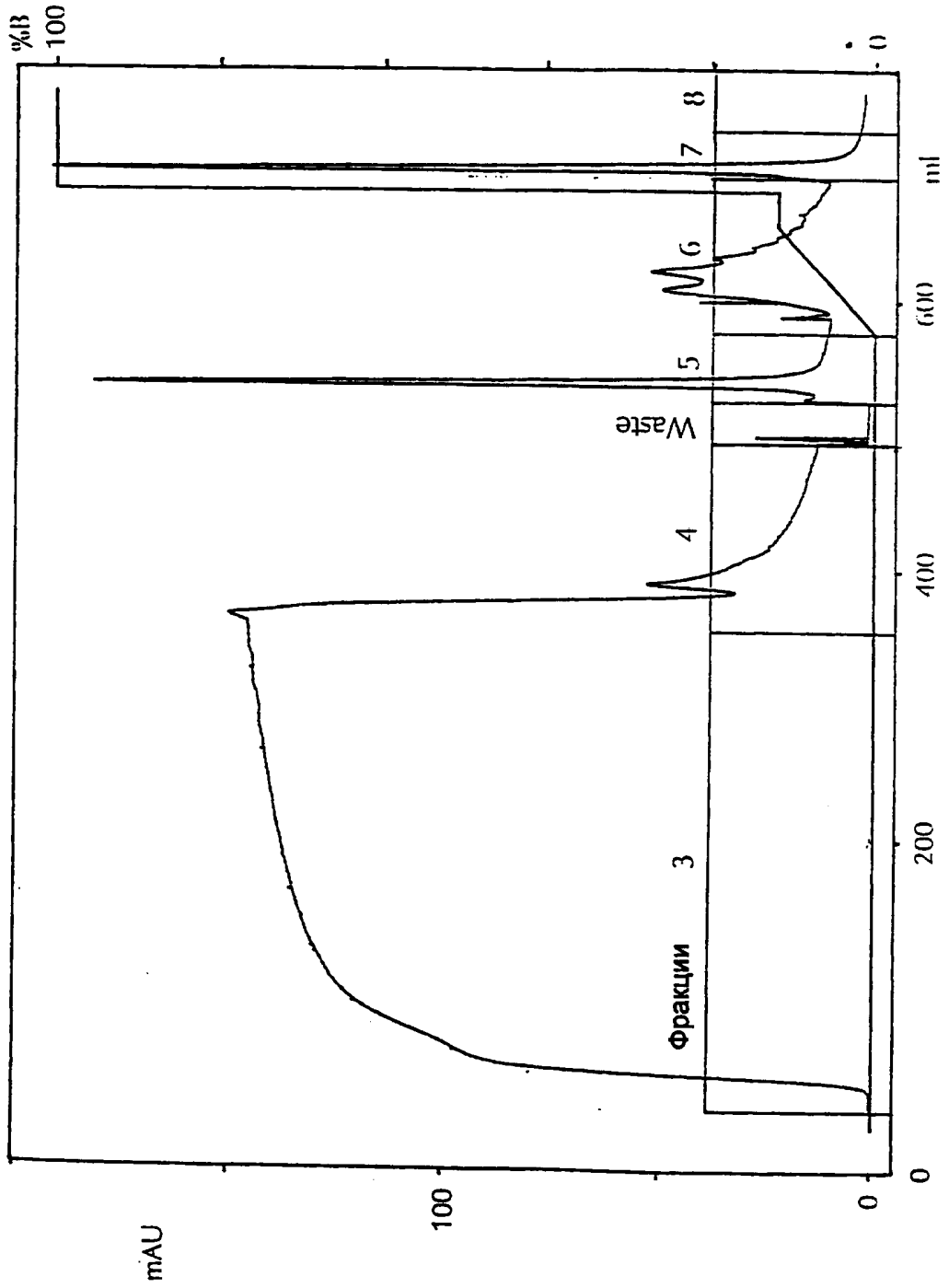
Фигура 12:

Катионообменна хроматография bscCD19XCD3

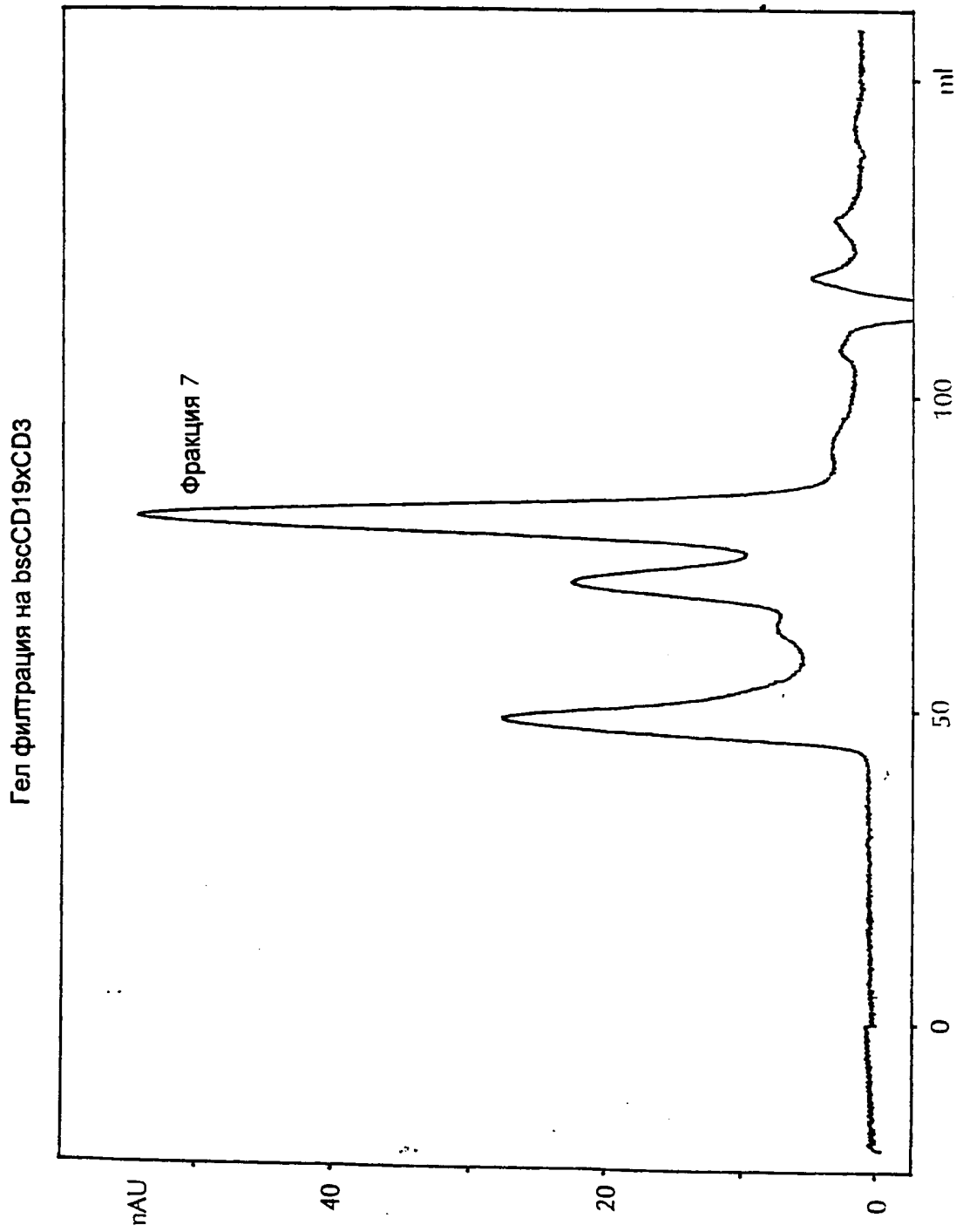


Фигура 13:

Афинитетна хроматография с кобалтов хелат на bscCD19xCD3



Фигура 14:



Фигура 15:

GGT

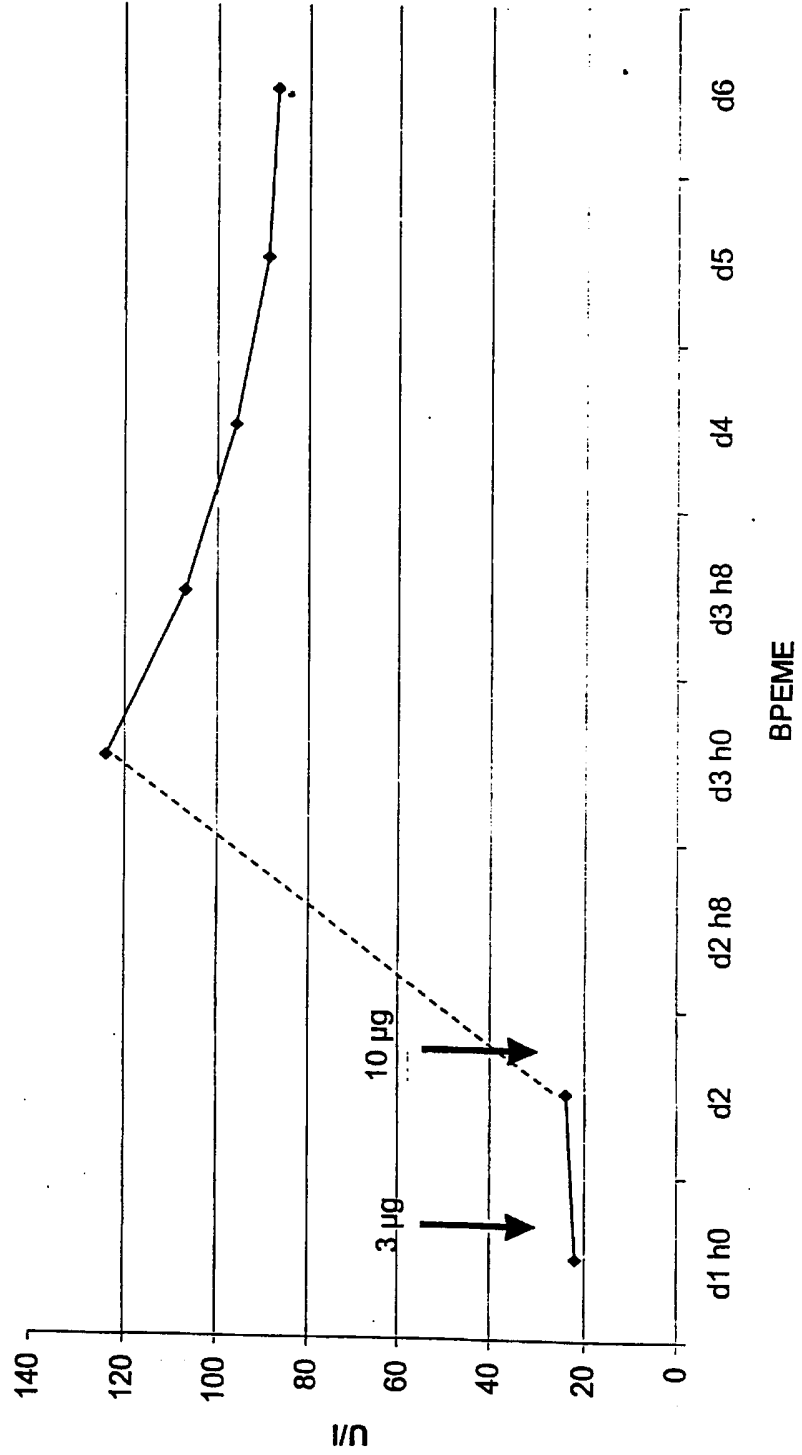
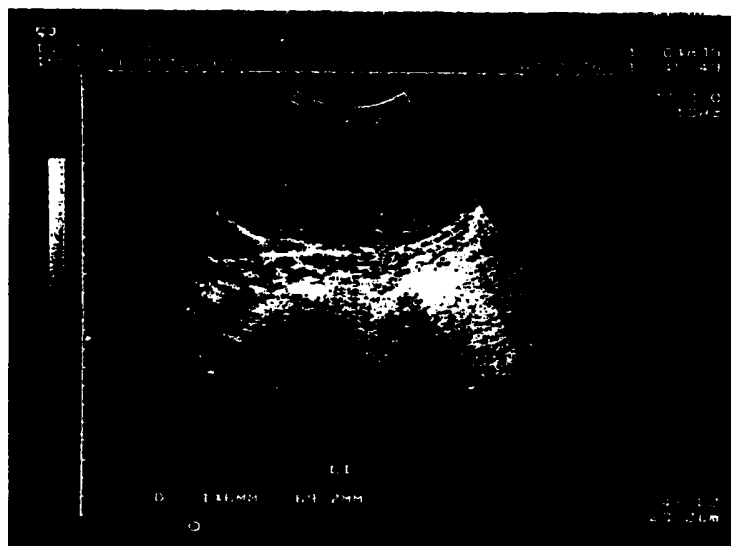
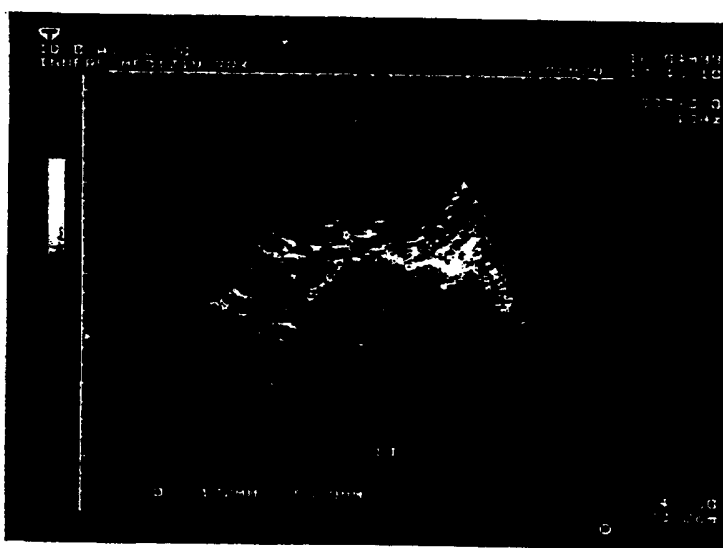


Figure 16

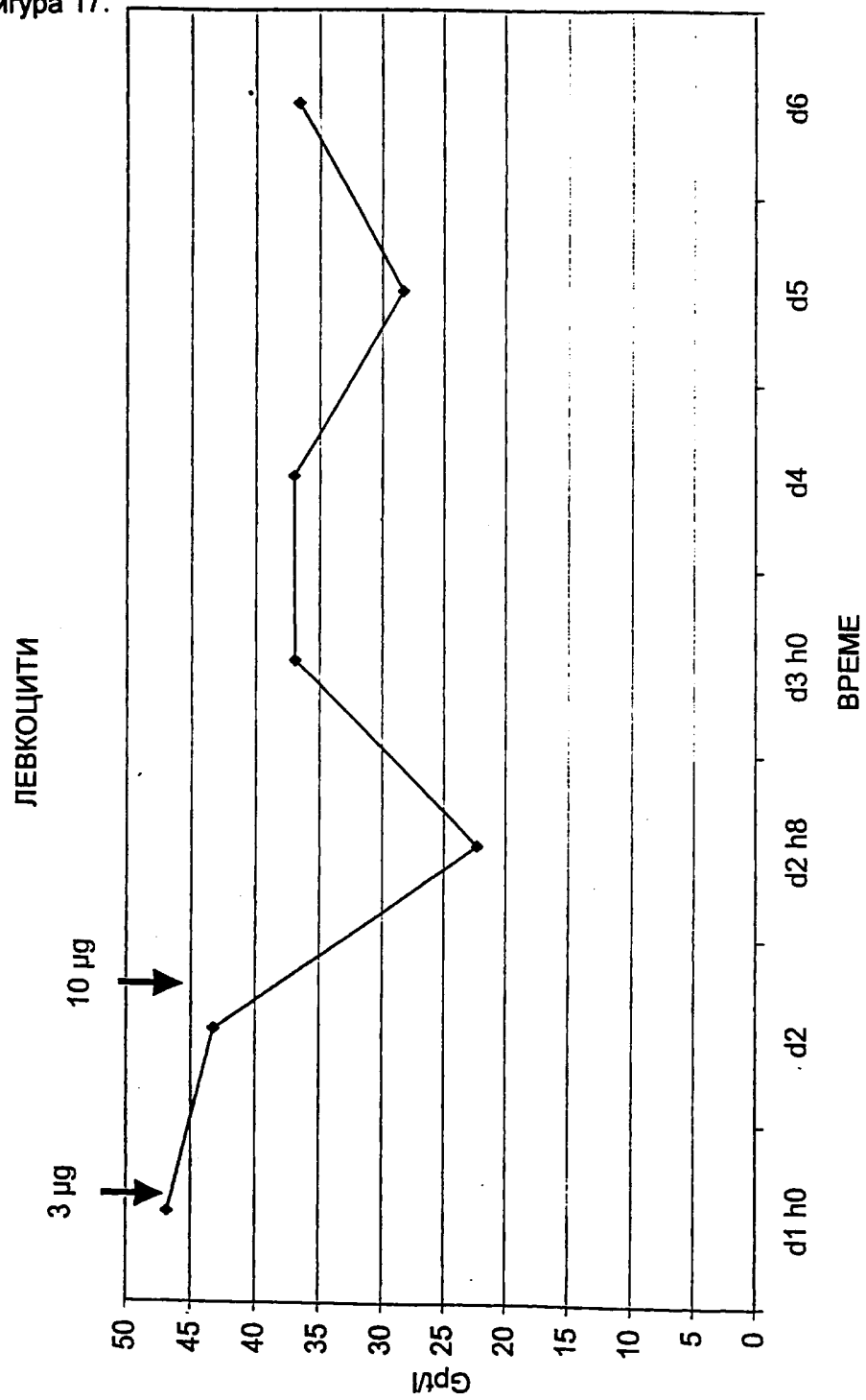
A



B

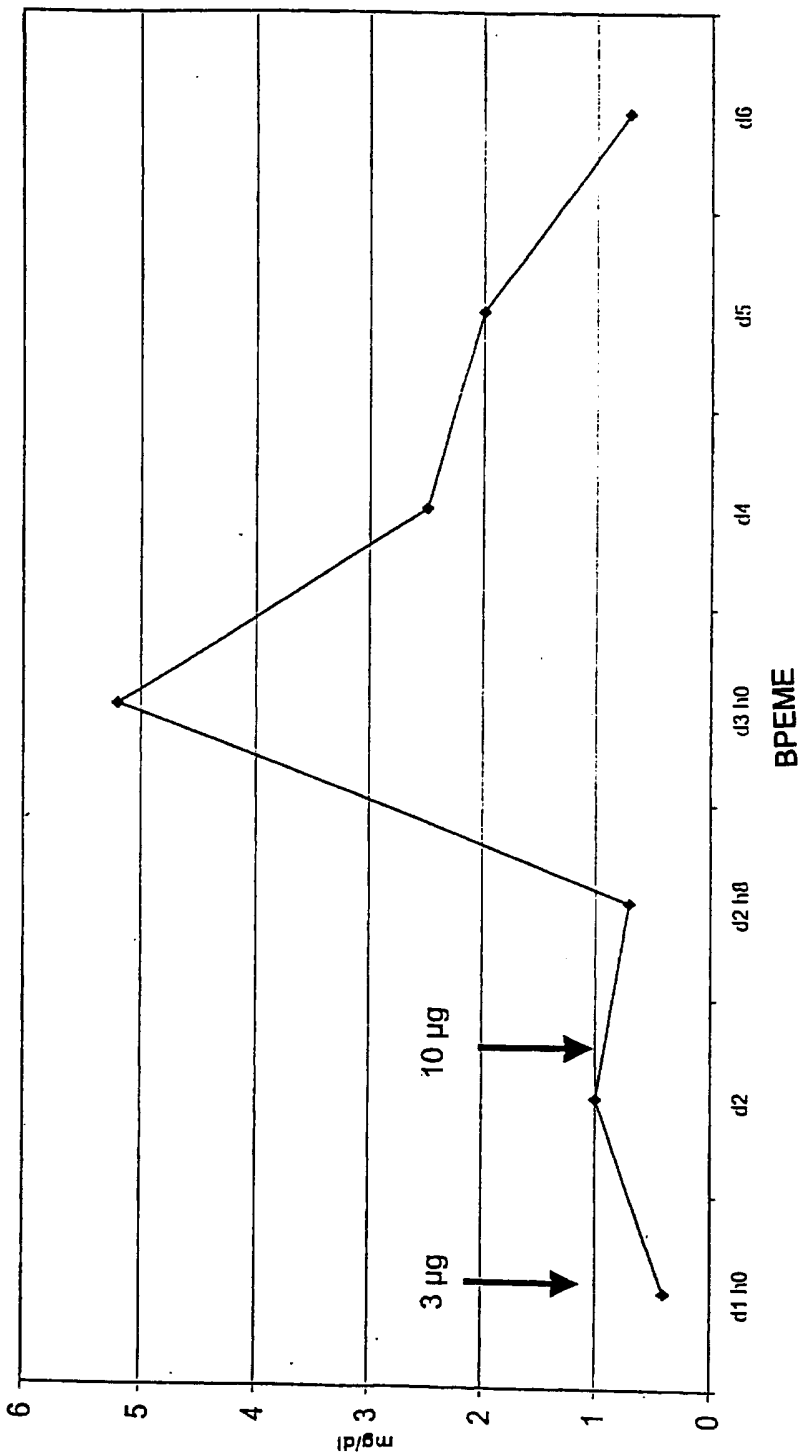


Фигура 17:

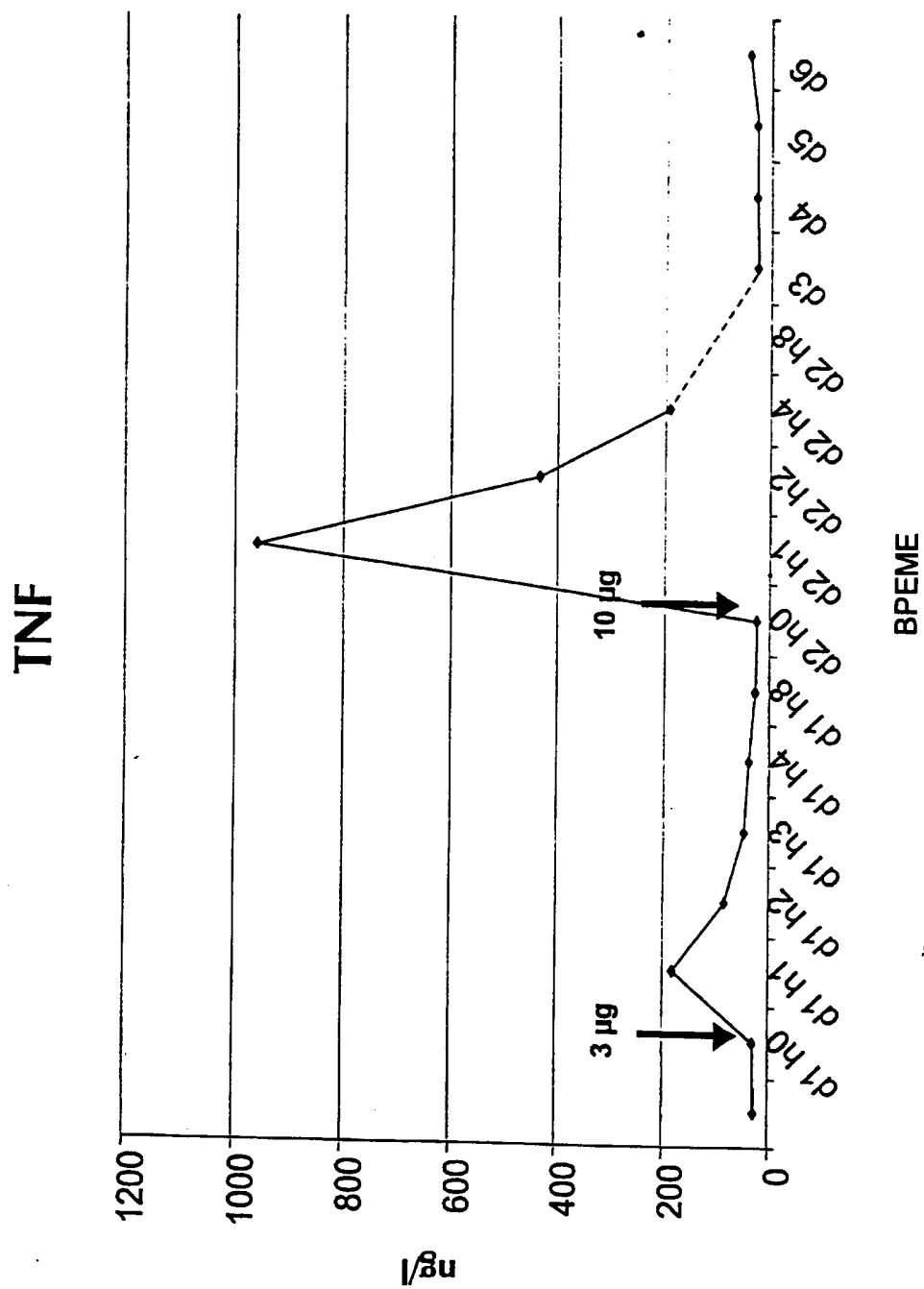


Фигура 18:

CRP

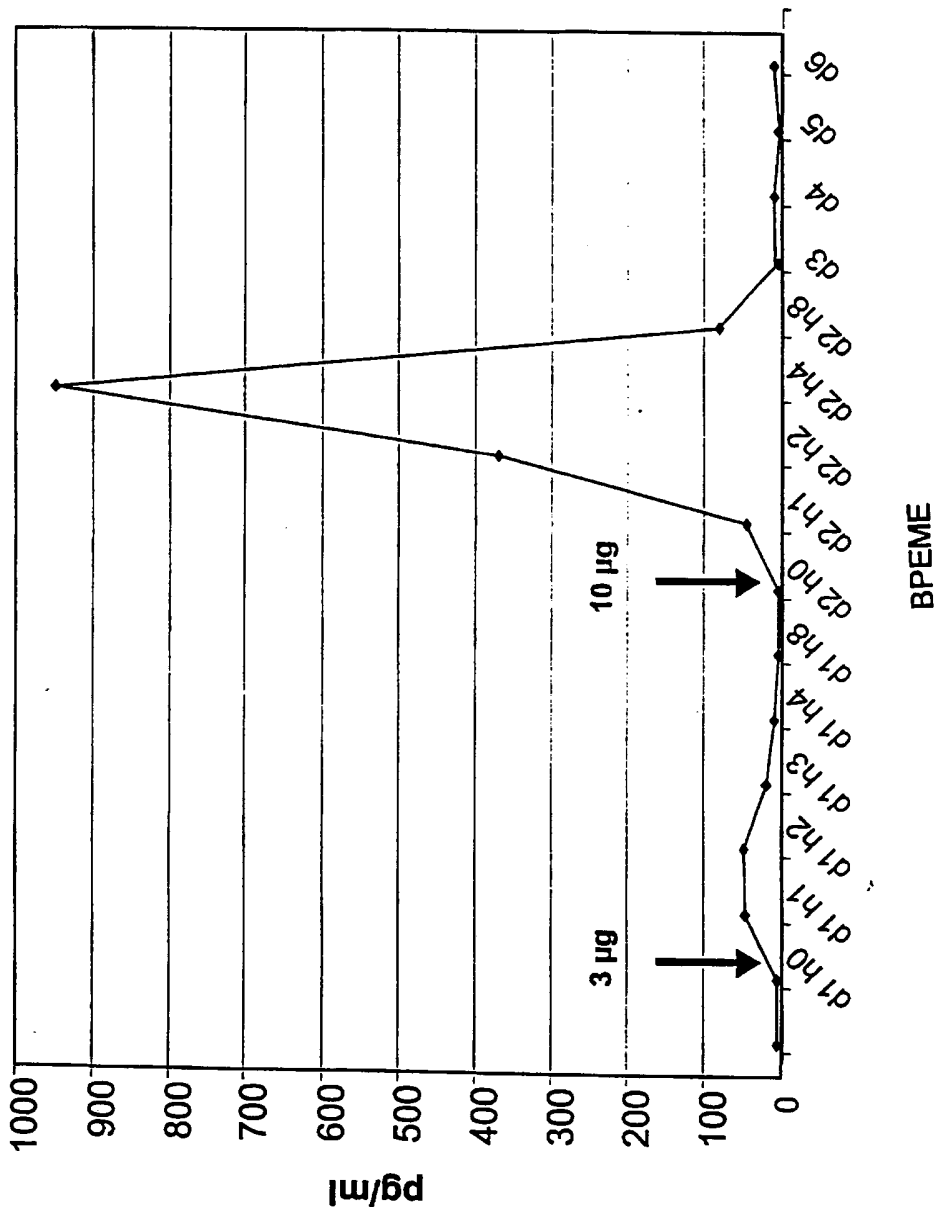


Фигура 19:



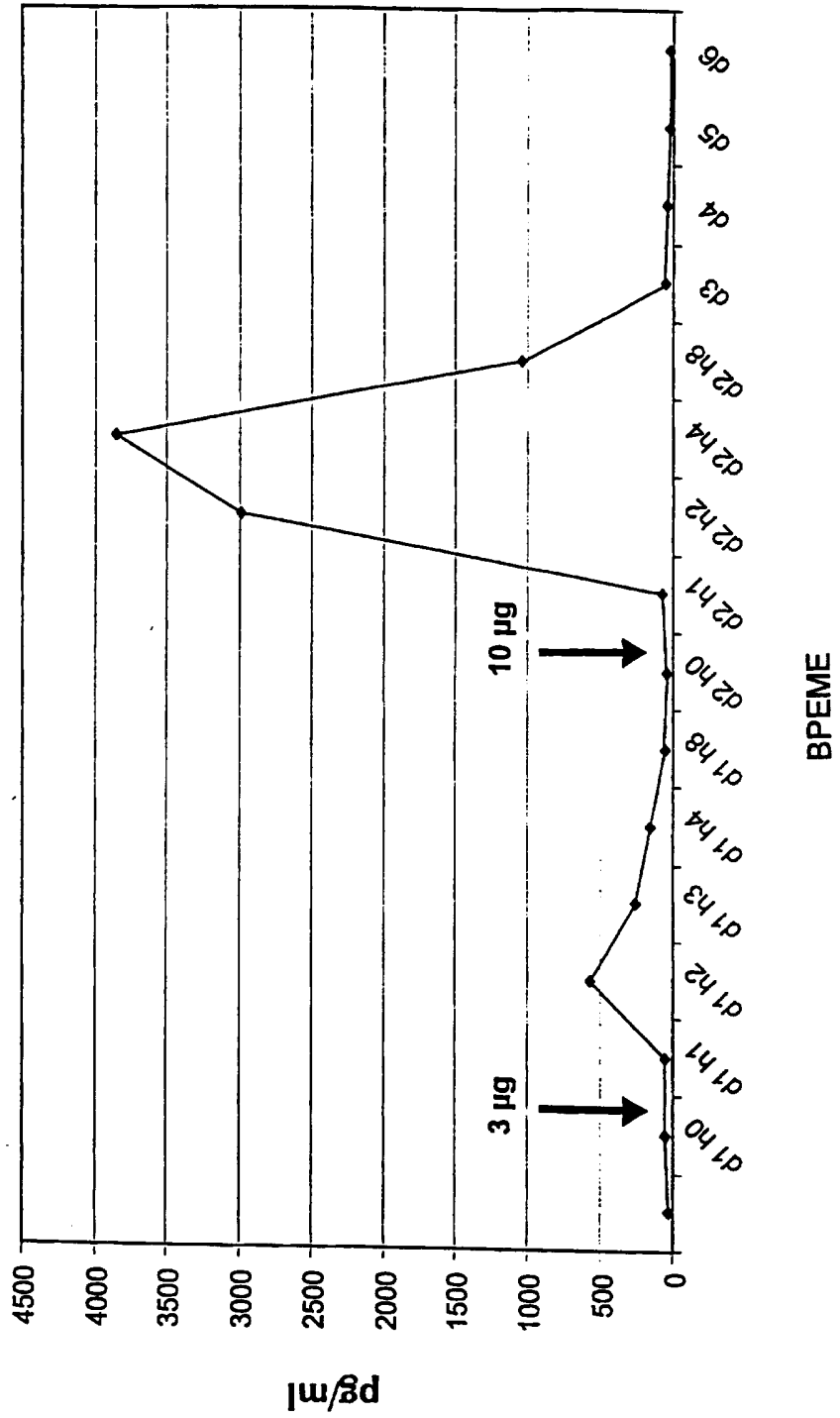
Фигура 20:

IL-6

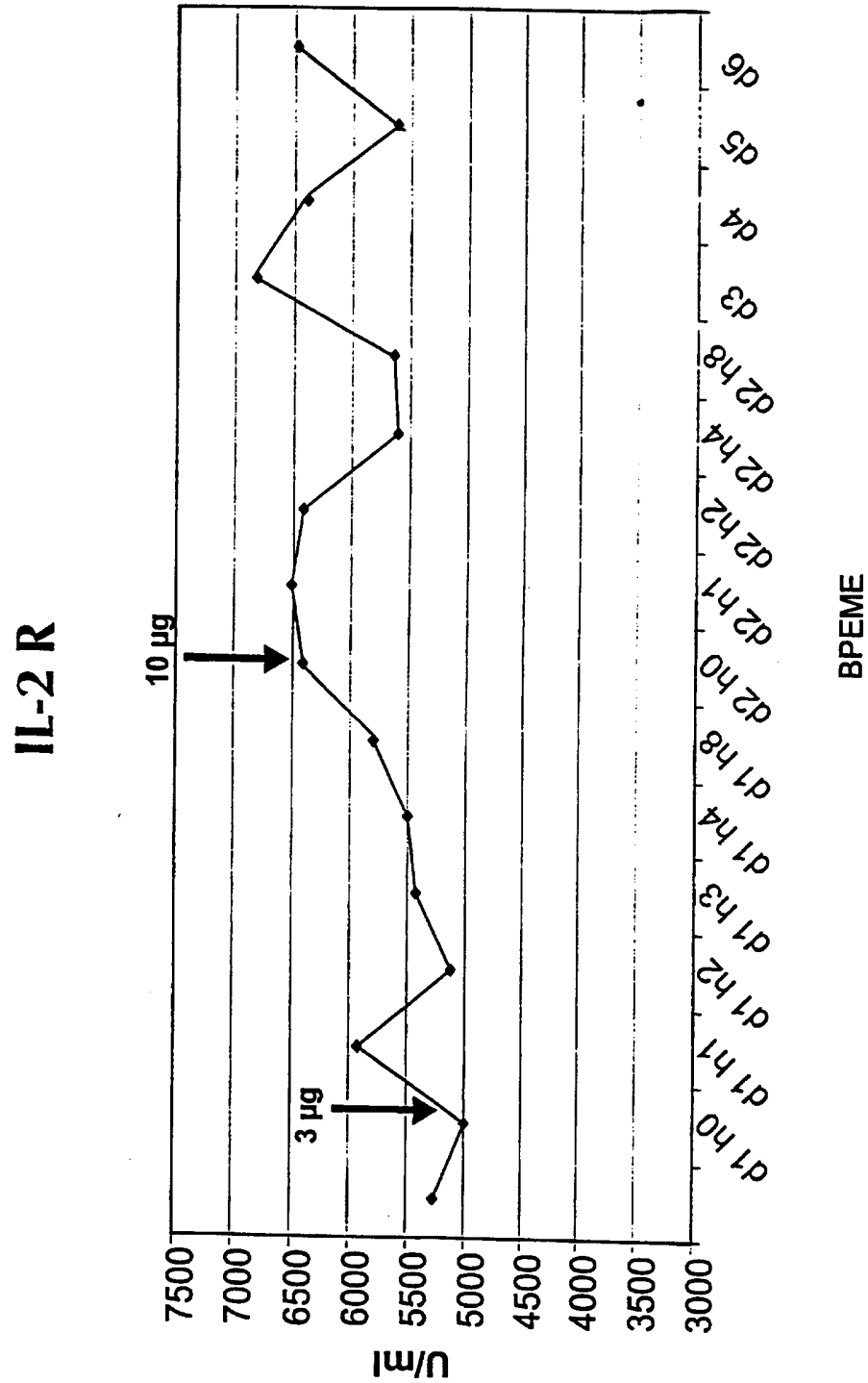


Фигура 21:

IL-8



Фигура 22:



Издание на Патентното ведомство на Република България
1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д. Кацарова

Редактор: Е. Синкова

Пор. № 43480

Тираж: 40 ЗС