

Епітопи, які викликають смерть Т-клітин

Споріднена заявка

Ця заявка заявляє пріоритет Попередньої заявки США № 60/570,161, поданої 11 травня 2004 р., зміст якої включено шляхом посилання у повному обсязі.

Рівень техніки

Контроль над небажаними імунними реакціями є суттєвим для лікування аутоімунних хвороб, відторгнення трансплантатів, алергічних хвороб та пов'язаних з Т-клітинами ракових захворювань. Активність надмірно агресивних Т-клітин може стримуватися шляхом імуносупресії або шляхом викликання імунологічної толерантності. Вважається, що апоптоз бере участь у підтриманні належних функцій імунної системи та видаленні небажаних клітин, таких як надмірно агресивні Т-клітини (Kabelitz et al. (1993) Immunol Today 14, 338-340; та Raff (1992) Nature 356, 397-399).

Короткий опис винаходу

Винахід стосується епітопів, які викликають смерть Т-клітин. Епітопи, крім іншого, можуть бути застосовані для відбору сполук, які зв'язуються з епітопами. Такі сполуки є корисними для лікування хвороб, пов'язаних з надмірно агресивними Т-клітинами. Прикладами таких хвороб є аутоімунні хвороби, відторгнення трансплантатів, алергічні хвороби та пов'язані з Т-клітинами ракові захворювання.

В одному аспекті винахід стосується тривимірної конформації виділеного епітопа. Зв'язування ліганду з епітопом на активованих Т-клітинах викликає смерть клітин. Такий епітоп представлено:

(1) X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 1), де

X<sub>1</sub> є Tyr, Trp, His або Met;

X<sub>2</sub> є Asp;

X<sub>3</sub> є Ser, Phe, Pro, Glu або His;

X<sub>4</sub> є будь-якою амінокислотою, яка трапляється у природі у тварин; і

X<sub>5</sub> є Pro, Tyr, His або Trp;

(2) X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub> (SEQ ID NO:2), де

X<sub>6</sub> є Asp;

X<sub>7</sub> є Tyr, Met, Asn, Trp або Phe;

X<sub>8</sub> є Phe або Leu;

X<sub>9</sub> є Pro; і

X<sub>10</sub> є Glu; або

(3) X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub> (SEQ ID NO:3), де

X<sub>11</sub> є Pro;

X<sub>12</sub> є Met;

X<sub>13</sub> є Glu або Ser; і

X<sub>14</sub> є Ile.

Будь-який з цих описаних вище епітопів може бути, наприклад, поліпептидом, взаємодіючою ділянкою двох поліпептидів, вуглеводним компонентом, глікопротеїном або будь-яким їх конформаційним, функціональним еквівалентом.

В іншому аспекті винахід стосується виділеного поліпептиду, який містить X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub> або X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>. Зв'язування ліганду з поліпептидом на активованих Т-клітинах викликає смерть клітин. В одному варіанті втілення поліпептид містить від 4 до 400 амінокислот (наприклад, будь-яке ціле число від 4 до 400 включно). Наприклад, поліпептид може бути X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub> (SEQ ID NO:1), X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub> (SEQ ID NO:2), X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub> (SEQ ID NO:3) або будь-якою з послідовностей SEQ ID NOs: 4, 6-18 та 20-22.

Термін "виділений епітоп" або "виділений поліпептид" стосується епітопа або поліпептиду, практично вільного від зв'язаних з ним у природі молекул, тобто, він принаймні на 75% (наприклад, будь-яке число від 75% до 100% включно) є чистим за сухою масою. Чистоту вимірюють будь-яким прийнятним стандартним способом, наприклад, шляхом колонкової хроматографії, електрофорезу на поліакриламідному гелі, або аналізу шляхом HPLC. Виділений епітоп або поліпептид згідно з винаходом може бути очищений з природного джерела, утворений способами рекомбінантних ДНК або хімічними способами.

У ще одному аспекті винахід стосується нової сполуки, яка зв'язується з одним з вищеописаних епітопів. Сполука може бути будь-яким типом молекули, включаючи антитіла, такі як моноклональні антитіла. Сполуку згідно з винаходом застосовують для виявлення епітопа згідно з винаходом і для викликання смерті активованих Т-клітин.

Обсяг винаходу також охоплює спосіб одержання антитіл. Спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості одного з вищеописаних епітопів (наприклад, поліпептидів). Антитіла застосовують для виявлення епітопа згідно з винаходом або для викликання смерті активованих Т-клітин.

Винахід також стосується способу розпізнавання прийнятної сполуки (наприклад, моноклонального антитіла) для викликання смерті активованих Т-клітин. Спосіб включає контактування випробуваної сполуки з епітопом згідно з винаходом і визначення, чи зв'язується випробувана сполука з епітопом. Якщо випробувана сполука зв'язується з епітопом, вона є придатною для викликання смерті активованих Т-клітин.

Винахід також стосується способу викликання смерті активованих Т-клітин шляхом контактування активованих Т-клітин зі сполукою згідно з винаходом.

У ще одному аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить фармацевтично прийнятний носій та (1) епітоп згідно з винаходом, такий як поліпептид, або (2) сполуку, яка зв'язується з епітопом.

Винахід забезпечує композиції та способи для лікування хвороб, пов'язаних з надмірно агресивними Т-клітинами, таких як аутоімунні хвороби, відторгнення трансплантатів, алергічні хвороби та пов'язані з Т-клітинами ракові захворювання. Деталі одного або кількох варіантів втілення винаходу викладено нижче у супровідному описі. Інші особливості, цілі та переваги винаходу стануть зрозумілими з детального опису.

Детальний опис

В основі винаходу лежить несподіване виявлення того факту, що активовані Т-клітини можуть зазнавати апоптозу та виснаження через застосування нових епітопів, які викликають смерть Т-клітин. Виснаження активованих Т-клітин є особливо корисним для лікування станів, пов'язаних з надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією або проліферацією Т-клітин. Наприклад, виснаження активованих Т-клітин в результаті може забезпечувати зниження або усунення небажаної активності або проліферації Т-клітин, пов'язаної з аутоімунними хворобами, відторгненням трансплантатів, алергічними хворобами або пов'язаними з Т-клітинами раковими захворюваннями.

Відповідно, винахід стосується тривимірної конформації виділеного епітопа. Зв'язування ліганду з епітопом на активованих Т-клітинах викликає смерть клітин. Епітоп є представленим  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ ,  $X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$  або  $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ . Тривимірна конформація  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ ,  $X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$  або  $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$  може бути визначена, наприклад, шляхом застосування програм комп'ютерного моделювання, як описано у публікаціях Duggan et al., (1995) J Med Chem. 38:3332-41 та Toogood (2002) J Med Chem. 45: 1543-57. Епітопи, які є рівноцінними за конформацією та функціональністю, можуть бути побудовані згідно з тривимірною конформацією  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ ,  $X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$  або  $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ , які одержують способами, відомими спеціалістам у даній галузі, і випробують на їхню здатність брати участь у викликанні смерті активованих Т-клітин, способами на зразок того, який описано у представленому нижче прикладі. Див., наприклад, Barbas et al. (2001) Phage display. A laboratory manual. CSHL Press; Parmley et al. (1998) Gene 73, 305-318; Scott et al. (1990) Science 249, 386-390; Патентна заявка США № 20030049252 A1; WO 03/013603 A1; Osborne (1996) Curr Opin Immunol 8:245-248; Lin et al. (1997) J. Immunol. 158, 598-603; Zhang et al. (1995) Nature 377, 348-350; Lai et al. (1995) Eur J. Immunol 25, 3243-3248; Mollereau et al. (1996) J Immunol 156, 3184-3190; та Gribben et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92, 811-815.

Вжитий авторами термін "активована Т-клітина" означає Т-клітину, яка має більш високу частоту, швидкість або ступінь проліферації, порівняно з неактивованою Т-клітиною. Термін "смерть" клітини включає запрограмовану смерть клітини, тобто апоптоз. "Викликання смерті клітини" агентом відбувається тоді, коли популяція клітин, оброблених агентом, має вищу швидкість відмирання, порівняно з популяцією необроблених клітин. Наприклад, відсоток *in vitro* активованих Т-клітин, які зазнають апоптозу, збільшується приблизно удвічі при обробці моноклональними антитілами m128-9F9, m152-15A7 або m166-43B6, порівняно з необробленими клітинами, як визначають шляхом забарвлення анексином V та FACS-аналізу (див. приклад нижче).

Винахід також стосується виділеного поліпептиду, який містить  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ ,  $X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$  або  $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ . Поліпептид застосовують для розпізнавання сполук, які викликають смерть активованих Т-клітин. Зв'язування такої сполуки з поліпептидом, який експресується на поверхні активованих Т-клітин, викликає смерть клітин. Крім того, вільні поліпептиди (тобто ті, які не експресуються на поверхні клітин) можуть інгібувати небажану смерть клітини через конкуренцію за ендogenous викликаючі смерть ліганди з поліпептидами поверхні клітин. Довжина або послідовність поліпептиду у цих випадках може бути різною. Поліпептид згідно з винаходом може бути одержаний, наприклад, як виділений білок поверхні Т-клітин, синтетичний поліпептид або рекомбінантний поліпептид. Для одержання рекомбінантного поліпептиду нуклеїнову кислоту, яка його кодує, з'єднують з іншою нуклеїновою кислотою, яка кодує іншого учасника злиття, наприклад, глутатіон-S-трансферазу (GST), 6x-His-епітопну мітку або білок M13 гена 3. Одержана в результаті злита нуклеїнова кислота у відповідних клітинах-хазяїнах експресує злитий білок, який може бути виділений стандартними способами. Виділений злитий білок піддають подальшій обробці, наприклад, шляхом ферментного гідролізу, для видалення іншого учасника злиття і одержання рекомбінантного поліпептиду згідно з цим винаходом.

Епітоп згідно з винаходом або поліпептид згідно з винаходом може бути застосований для утворення антитіл в організмах тварин (для вироблення антитіл) або людей (для лікування хвороб). Способи одержання моноклональних та поліклональних антитіл та їх фрагментів у тварин є відомими спеціалістам у даній галузі. Див., наприклад, Harlow and Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Термін "антитіло" включає інтактні молекули, а також їх фрагменти, такі як Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv (одноланцюгове антитіло) та dAb (антитіло з одним доменом; Ward, et. al. (1989) Nature, 341, 544). Ці антитіла застосовують для виявлення епітопа, наприклад, при розпізнаванні сполуки, яка зв'язується з епітопом (див. нижче). Антитіла, які є здатними викликати смерть активованих Т-клітин, також є корисними для лікування хвороб, таких як аутоімунні хвороби, відторгнення трансплантатів, алергічні хвороби або пов'язані з Т-клітинами ракові захворювання. Взагалі, епітоп згідно з винаходом, наприклад, поліпептид, може бути з'єднаний з білком-носієм, таким як KLH, змішаний з ад'ювантом і введений шляхом ін'єкції до організму тварини-хазяїна. Антитіла, вироблені в організмі цієї тварини, після цього очищають шляхом афінної хроматографії пептиду. До тварин-хазяїв, яких зазвичай використовують, належать кролі, миші, морські свинки та щури. Різні ад'юванти, які можуть застосовуватися для посилення імунологічної реакції, залежать від виду хазяїна, і до них належать ад'ювант Фройнда (повний і неповний), мінеральні гелі, такі як гідроксид алюмінію, поверхнево-активні речовини, такі як лізолецитин, плуронік-поліолі, поліаніони, пептиди, олійні емульсії, гемоціанін моллюска фісурелії та динітрофенол. Корисними людськими ад'ювантами є BCG (бацила Calmette-Guerin) та Corynebacterium parvum.

Поліклональні антитіла, гетерогенні популяції молекул антитіла, є присутніми у сироватці імунізованих суб'єктів. Моноклональні антитіла, гомогенні популяції антитіл до конкретного антигена одержують, застосовуючи стандартну гібридомну технологію (див., наприклад, Kohler et al. (1975) Nature 256, 495; Kohler et al. (1976) Eur J Immunol 6, 511; Kohler et al. (1976) Eur J Immunol 6, 292; та Hammerling et al. (1981) Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y.). Зокрема, моноклональні антитіла одержують будь-яким способом, який забезпечує вироблення молекул антитіла безперервними лініями клітин у культурі, як описано у публікації Kohler et al. (1975) Nature 256, 495 і Патенті США № 4,376,110; способом із застосуванням В-клітинної гібридомної людини (Kosbor et al. (1983) Immunol Today 4, 72; Cole et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80, 2026, та способом із застосуванням EBV-гібридомної (Cole et al. (1983) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Такі антитіла можуть належати до будь-якого класу імуноглобулінів,

включаючи IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, та будь-якого його підкласу. Гібридома, яка виробляє моноклональні антитіла згідно з винаходом може бути культивована *in vitro* або *in vivo*. Здатність до утворення високих титрів моноклональних антитіл *in vivo* робить цей спосіб вироблення особливо корисним.

Крім того, можуть застосовуватися способи, розроблені для вироблення "химерних антитіл". Див., наприклад, Morrison et al. (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81, 6851; Neuberger et al. (1984) Nature 312, 604; та Takeda et al. (1984) Nature 314:452. Химерне антитіло є молекулою, в якій різні частини походять з різних видів тварин, таких як ті, що мають мінливу ділянку, взятую з моноклонального антитіла миші, та постійну ділянку людського імуноглобуліну. В альтернативному варіанті способи, описані для вироблення однокланцевих антитіл (Патенти США №№ 4,946,778 та 4,704,692), можуть бути застосовані для створення бібліотеки фагів однокланцевих Fv-антитіл. Однокланцеві антитіла утворюють шляхом з'єднання важко- та легколанцюгових фрагментів ділянки Fv через амінокислотний місток. Крім того, фрагменти антитіл можуть бути утворені відомими способами. Наприклад, до таких фрагментів належать, крім інших, F(ab)<sub>2</sub> фрагменти, які можуть бути вироблені шляхом гідролізу пепсином молекули антитіла, та фрагменти Fab, які можуть бути утворені шляхом відновлення дисульфідних містків фрагментів F(ab)<sub>2</sub>. Антитіла також можуть бути олюднені способами, відомими спеціалістам у даній галузі. Наприклад, моноклональні антитіла з потрібною специфічністю зв'язування можуть бути олюднені у промисловому масштабі (Scotgene, Шотландія; і Oxford Molecular, Palo Alto, Calif). Повністю олюднені антитіла, на зразок тих, які експресуються у трансгенних тваринах, охоплюються обсягом винаходу (див., наприклад, Green et al. (1994) Nature Genetics 7, 13; і Патенти США №№ 5,545,806 та 5,569,825).

Винахід також стосується нової сполуки, яка зв'язується з епітопом згідно з винаходом і викликає смерть активованих Т-клітин. Така сполука може бути сконструйована, наприклад, шляхом застосування програм комп'ютерного моделювання, згідно з тривимірною конформацією епітопа, і синтезована з застосуванням способів, відомих спеціалістам у даній галузі. Вона також може бути розпізнана шляхом лабораторного відбору, як описано нижче.

Випробувані сполуки можуть бути одержані шляхом застосування будь-якого з численних підходів у способах комбінаторних бібліотек, які є відомими спеціалістам у даній галузі. До таких бібліотек належать: бібліотеки пептидів, бібліотеки пептоїдів (бібліотеки молекул, які мають функціональності пептидів, але з новим, непептидним основним ланцюгом, який є стійким до ферментного розщеплення), просторово адресовані паралельні бібліотеки у твердій фазі або у фазі розчину, синтетичні бібліотеки, які одержують, шляхом відбору за допомогою деконволюції або афінної хроматографії, бібліотеки "одна кулька – одна сполука" та бібліотеки антитіл. Див., наприклад, Zuckermann et al. (1994) J Med Chem 37, 2678-85; Lam (1997) Anticancer Drug Des 12, 145; Lam et al. (1991) Nature 354, 82; Houghten et al. (1991) Nature 354, 84; та Songyang et al. (1993) Cell 72, 767.

Приклади способів синтезу молекулярних бібліотек можна знайти у публікаціях існуючого рівня техніки, наприклад: DeWitt et al. (1993) PNAS USA 90, 6909; Erb et al. (1994) PNAS USA 91, 11422; Zuckermann et al. (1994) J Med Chem 37, 2678; Cho et al. (1993) Science 261, 1303; Carrell et al. (1994) Angew Chem Int Ed Engl 33, 2059; Carrell et al. (1994) Angew Chem Int Ed Engl 33, 2061; та Gallop et al. (1994) J Med Chem 37, 1233.

Бібліотеки сполук можуть існувати у розчині (наприклад, Houghten (1992) Biotechniques 13, 412-421) або кульках (Lam (1991) Nature 354, 82-84), кристалів (Fodor (1993) Nature 364, 555-556), бактерій (Патент США № 5,223,409), спор (Патент США № 5,223,409), плазмідів (Cull et al. (1992) PNAS USA 89, 1865-1869) або фарів (Scott and Smith (1990) Science 249, 386-390; Devlin (1990) Science 249, 404-406; Cwirla et al. (1990) PNAS USA 87, 6378-6382; Felici (1991) J Mol Biol 222, 301-310; та Патент США № 5,223,409).

Для розпізнавання прийнятної сполуки для викликання смерті активованих Т-клітин епітоп згідно з винаходом приводять у контакт з випробуваною сполукою і оцінюють зв'язування сполуки з епітопом. Якщо сполука зв'язується з епітопом, вона є придатною для викликання смерті активованих Т-клітин.

Аналіз для відбору може здійснюватися різними шляхами. Наприклад, один спосіб включає закріплення епітопа (або молекули, яка містить епітоп, наприклад, поліпептиду або злитого білка) або випробуваної сполуки на твердій фазі і виявлення комплексу епітоп-випробувана сполука, який утворюється на твердій фазі наприкінці реакції. На практиці мікротитрувальні планшети можуть зручно застосовуватись як тверда фаза. Якірний компонент може бути іммобілізований нековалентними або ковалентними приєднаннями. Нековалентне приєднання може здійснюватися шляхом простого вкривання твердої поверхні розчином якірного компонента і висушування планшетів. В альтернативному варіанті іммобілізоване антитіло (наприклад, моноклональне антитіло), специфічне до якірного компонента, може застосовуватися для іммобілізації якірного компонента на твердій поверхні. Неякірний компонент додають до твердої поверхні, вкритої якірним компонентом. Після завершення реакції незв'язану фракцію неякірних компонентів видаляють (наприклад, шляхом промивання) за умов, коли будь-які утворені комплекси залишаються іммобілізованими на твердій поверхні. Виявлення цих комплексів може здійснюватися багатьма шляхами. Якщо неякірний компонент є попередньо міченим, виявлення мітки, іммобілізованої на твердій поверхні, вказує на утворення комплексів. Якщо неякірний компонент не є попередньо міченим, застосовують непряму мітку для виявлення комплексів, утворених на поверхні, наприклад, з використанням антитіла, специфічного до неякірного компонента (антитіла, у свою чергу, може бути прямо мічене або непрямо мічене антитілом проти Ig).

В альтернативному варіанті реакція може здійснюватись у рідкій фазі. Комплекси відокремлюють від незв'язаних компонентів, наприклад, застосовуючи іммобілізоване антитіло, специфічне до епітопа (або молекули, яка містить епітоп) або випробуваної сполуки. Комплекси після цього виявляють, наприклад, застосовуючи мічене антитіло, специфічне до іншого компонента.

Прийнятна сполука може бути перевірена шляхом підтвердження її здатності викликати смерть активованих Т-клітин шляхом застосування способу, описаного нижче у прикладі, або будь-якого іншого способу, відомого спеціалістам у даній галузі. Перевірена сполука може застосовуватися для викликання смерті активованих Т-клітин і для лікування таких хвороб, як аутоімунні хвороби, відторгнення трансплантатів, алергічні хвороби або пов'язані з Т-клітинами ракові захворювання.

Винахід забезпечує спосіб викликання смерті активованих Т-клітин, наприклад, шляхом контактування активованих Т-клітин зі сполукою згідно з винаходом *in vitro*, або шляхом введення суб'єктові, який цього потребує, ефективної кількості сполуки згідно з винаходом. Суб'єкти, які підлягають лікуванню, можуть бути визначені як такі, що мають, або у яких існує ризик виникнення стану, який характеризується надмірною або небажаною опосередкованою Т-клітинами імунною реакцією, наприклад, пацієнти, які страждають від аутоімунних хвороб, відторгнення трансплантатів, алергічних хвороби або пов'язаних з Т-клітинами ракових захворювань. Цей спосіб може здійснюватись окремо або разом з іншими ліками або терапією.

Термін "лікування" визначається як введення композиції суб'єктові з метоювилікування, послаблення, полегшення, усунення, профілактики або поліпшення стану хвороби, симптому порушення, хворобливого стану, який є вторинним відносно порушення, або схильності до виникнення порушення. "Ефективна кількість" є кількістю композиції, яка може забезпечити бажаний з медичної точки зору результат у підданого лікуванню суб'єкта.

Прикладами хвороб, які підлягають лікуванню, є, крім інших, цукровий діабет, артрит (включаючи ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит, остеоартрит, та псоріатичний артрит), розсіяний склероз, енцефаломієліт, злаякісна міастенія, системний червоний вовчак, аутоімунний тиреоїдит, дерматит (включаючи атопічний дерматит та екзематозний дерматит), псоріаз, синдром Шегрена, хвороба Крона, афтозна виразка, запалення райдужної оболонки ока, кон'юнктивіт, кератокон'юнктивіт, діабет I типу, запальні хвороби кишечника, виразковий коліт, астма, алергічна астма, шкірний червоний вовчак, склеродерма, вагініт, проктит, медикаментозні висипи, лепрозні зворотні реакції, лепрозна вузлувата еритрема, аутоімунний увеїт, алергічний енцефаломієліт, гостра некротична геморагічна енцефалопатія, ідіопатична двостороння прогресуюча сенсориневральна втрата слуху, апластична анемія, справжня еритроцитарна анемія, ідіопатична тромбоцитопенія, поліхондрія, гранулематоз Вегенера, хронічний активний гепатит, синдром Стивенса-Джонсона, ідіопатичні тропічні афти, плоский лишай, базедова хвороба, саркоїдоз, біліарний первинний цироз печінки, задній увеїт, інтерстиціальний фіброз легенів, хвороба "трансплантат проти хазяїна", випадки трансплантації (включаючи трансплантацію з застосуванням алогенних або ксеногенних тканин), такі як трансплантація кісткового мозку, трансплантація печінки або трансплантація будь-якого органу або тканини, алергії, такі як атопічна алергія, СНІД та Т-клітинні новоутворення, такі як лейкемії або лімфоми.

Згідно з одним з *in vivo* способів, терапевтичну композицію (наприклад, композицію, яка містить епітоп згідно з винаходом, поліпептид згідно з винаходом або сполуку згідно з винаходом) вводять суб'єктові. Зазвичай епітоп, поліпептид або сполуку суспендують у фармацевтично прийнятному носії (наприклад, фізіологічному розчині) і вводять перорально або шляхом внутрішньовенної інфузії, або вводять шляхом ін'єкції або імплантату підшкірно, внутрішньом'язово, інтратекально, внутрішньочеревинно, ректально, інтравагінально, інтраназально, внутрішньошлунково, внутрішньотрахеально, або внутрішньолегенево.

Потрібна доза залежить від вибору шляху введення; характеру композиції; характеру хвороби суб'єкта; розміру, маси, площі поверхні, віку та статі суб'єкта; інших застосовуваних медикаментів; та рішення лікаря. Прийнятна доза становить у межах 0,01-100,0 мг/кг. Зміни доз у широких межах можуть передбачатись з врахуванням різних наявних композицій та різниці ефективності різних шляхів введення. Наприклад, пероральне введення зазвичай вимагає більш високих доз, ніж введення шляхом внутрішньовенної ін'єкції. Зміни цих рівнів доз можуть регулюватись з застосуванням стандартної емпіричної практики оптимізації, яка є добре зрозумілою спеціалістам у даній галузі. Поміщення композиції у прийнятний носій для доставлення (наприклад, полімерні мікрочастинки або вживлювані засоби) може підвищувати ефективність доставлення, зокрема, для перорального доставлення.

Обсяг цього винаходу також охоплює фармацевтичну композицію, яка містить фармацевтично прийнятний носій та ефективну кількість сполуки згідно з винаходом. Фармацевтичну композицію застосовують для лікування вищеописаних хвороб. До фармацевтично прийнятних носіїв належать розчинник, дисперсійне середовище, покриття, антибактеріальний та протигрибковий агент, а також ізотонічний агент та агент затримки абсорбції.

Фармацевтична композиція згідно з винаходом може бути рецептована у дозовані форми для різних шляхів введення з застосуванням традиційних способів. Наприклад, вона може бути рецептована у формі капсули, герметичної желатинової капсули або таблетки для перорального введення. Капсули можуть містити будь-які стандартні фармацевтично прийнятні матеріали, такі як желатин та целюлоза. Таблетки можуть бути рецептовані згідно з традиційними процедурами шляхом пресування сумішей композиції з твердим носієм та мастилом. Прикладами твердих носіїв є крохмаль, цукор та бентоніт. Композиція також може вводиться у формі таблетки або капсули з твердою оболонкою, яка містить зв'язувальну речовину, наприклад, лактозу або маніт, традиційний наповнювач та таблетувальний агент. Фармацевтична композиція може вводиться парентеральним шляхом. Прикладами парентеральних дозованих форм є водні розчини, активний агент в ізотонічному розчині або 5% розчині глюкози або іншому фармацевтично прийнятному наповнювачі. Циклодекстрини або інші солюбілізуючі агенти, загальновідомі серед спеціалістів у даній галузі, застосовують як фармацевтичні наповнювачі для доставлення терапевтичного агента.

Ефективність композиції згідно з цим винаходом оцінюють як *in vitro*, так і *in vivo*. Див., наприклад, наведені нижче приклади. Тобто, композицію випробують на її здатність до викликання смерті активованих Т-клітин *in vitro*. Для *in vivo* випробувань композиції вводять шляхом ін'єкції тварині (наприклад, мишачій моделі), а після цього оцінюють терапевтичний ефект. На основі результатів визначають відповідний діапазон доз та шлях введення.

Представлені нижче конкретні приклади слід тлумачити як суто пояснювальні, і вони жодним чином не обмежують решту опису. Вважається, що спеціаліст у даній галузі на основі представленого авторами опису без зайвих зусиль може повністю скористатися даним винаходом. Усі наведені авторами публікації, таким чином, є включеними авторами шляхом посилання в їх повному обсязі.

Приготування суспензії клітин мишачої селезінки

Мишачу селезінку занурювали у 8 мл збалансованого сольового розчину Хенка (HBSS), обережно

подрібнювали стерильним покривним склом, переносили у 15 мл центрифугувальну пробірку (Costar) і центрифугували при 200 x г протягом 5 хвилин. Супернатант зливали і осад з клітин ресуспендували у залишковому буфері шляхом обережного обстукування стінок. Забруднюючі еритроцити (RBC) піддавали лізисові шляхом додавання 1 мл лізисного буфера для RBC (0,6 М NH<sub>4</sub>Cl, 0,17 М Tris-основи, pH 7,65), з наступною 2-хвилинною інкубацією при кімнатній температурі та швидким гасінням з використанням 9 мл HBSS. Клітини осаджували при 200 x г протягом 5 хвилин, двічі промивали і ресуспендували у середовищі RPMI. Концентрацію та життєздатність клітин у суміші визначали за допомогою гемоцитометра (Cambridge Scientific Inc.) та виключення трипанового синього.

Одержання викликаючих апоптоз моноклональних антитіл проти Т-клітин

Викликаючі апоптоз моноклональні антитіла проти Т-клітин одержували шляхом імунізації миші активізованими конканаваліном А людськими Т-клітинами і відбирали на їхню здатність зв'язуватися з активованими людськими Т-клітинами, а отже, викликати апоптоз Т-клітин. Моноклональні антитіла одержували загальновідомими способами злиття клітин згідно з публікацією Kohler and Milstein ((1976) Euro J Immunol 6, 511-519) для вироблення гібридоми, яка секретує потрібні антитіла. Три гібридоми, вироблені згідно з цими способами, секретували моноклональні антитіла, позначені як m128-9F9, m152-15A7 та m166-43B6, відповідно, які були здатні викликати апоптоз Т-клітин *in vitro*.

Концентрований супернатант культури кожної гібридоми центрифугували при 20000 x г протягом 10 хвилин і супернатант розводили у співвідношенні 1:1 зв'язувальним буфером (0,1 М ацетату натрію, pH 5,0). Колонку G-протеїну (об'єм шару приблизно 1 мл) тричі промивали 3-5 мл зв'язувального буфера. Очищений супернатант культури подавали на колонку G-протеїну і пропущену через неї рідину збирали і повторно пропускали через колонку. Після цього колонку промивали 6-10 мл зв'язувального буфера і зв'язане антитіло елюювали з колонки з 5 мл буфера для елюювання (0,1 М гліцин-HCl, pH 2,8). Кожна фракція містила 1 мл елююваного антитіла, і елюювану фракцію доводили до нейтрального pH шляхом змішування кожної 1 мл фракції з 50 мікролітрами 1 М Tris-HCl, pH 7,5. Фракції, які містили антитіло, об'єднували і діалізували на 2 л PBS, pH 7,4 тричі по три години для кожного діалізу. Концентрацію білка у зразках антитіла визначали за процедурою, описаною у публікації Bradford, застосовуючи комплект Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA).

Викликання смерті активованих людських Т-клітин моноклональними антитілами

Активовані Т-клітини (див. вище) ресуспендували до кінцевої концентрації 5 x 10<sup>5</sup> клітин/мл у середовищі RPMI, яке містило 5 нг/мл IL-2, і обробляли контрольним Ig, m128-9F9, m152-15A7 або m166-43B6.

Загальновідомо, що викликаючі смерть Т-клітин антитіла можуть застосовуватися як терапевтичні агенти для лікування пов'язаних з Т-клітинами хвороб, таких як відторгнення трансплантатів, аутоімунні хвороби та алергія. Утворювали три моноклональні антитіла проти людських Т-клітин і досліджували здатність цих моноклональних антитіл викликати апоптоз активованих людських Т-клітин. Супернатанти культур, які містять моноклональні антитіла, секретовані лінією клітин гібридома m128-9F9, m152-15A7 або m166-43B6, інкубували або з неактивованими людськими Т-клітинами (День 0) або *in vitro* активованими людськими Т-клітинами (День 7) протягом 6 годин. Клітини після цього забарвлювали анексином V і піддавали FACS-аналізові. CD3-позитивні клітини стробоскопували для забезпечення підрахунку *in vitro* активованих людських Т-клітин або сплываючих людських Т-клітин. Апоптозні клітини були позитивними на забарвлення анексином V. У Таблиці 1 показано відсоток апоптозних Т-клітин серед усіх сканованих Т-клітин. Несподівано було виявлено, що моноклональні антитіла, секретовані лініями клітин гібридоми m128-9F9, m152-15A7 та m166-43B6, викликали смерть *in vitro* активованих Т-клітин, але не впливали на неактивовані людські Т-клітини. Ця здатність викликати апоптоз активованих Т-клітин при збереженні сплываючих Т-клітин є унікальною особливістю апоптозного шляху і є домінуючою особливістю терапевтичних реагентів, спрямованих на опосередковані Т-клітинами хвороби.

Таблиця 1

Відсоток апоптозних Т-клітини

	Необроблен.	Anti-myc	m128-9F9	Необроблен.	Anti-myc	m152-15A7	M166-43B6
День 0	4,17	6,67	5,82	18,18	15,52	5,23	6,57
День 7	12,63	13,36	28,71	24,18	23,08	51,66	49,44

Виявлення епітопів, які викликають смерть Т-клітин

Для виявлення викликаючих смерть епітопів, які розпізнаються моноклональними антитілами m128-9F9, m152-15A7 та m166-43B6, ці моноклональні антитіла застосовували для відбору консенсусних зв'язувальних послідовностей у бібліотеці поліпептидів (Ph. D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit, New England Biolabs, Inc.). Бібліотека містила різні 12-мер пептиди, зв'язані з білком M13 гена 3406-aa. 96-лункові мікротитрувальні планшети вкривали 50 мкг/лунку антитіла у концентрації 10 мкг/мл у 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,6) вкриваючого буфера до наступного дня при 4°C. Після промивання планшети блокували шляхом інкубації з блокувальним буфером, який містив 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,6), 5 мг/мл BSA, 0,02% NaN<sub>3</sub> (150 мкг/лунку) протягом принаймні однієї години при 4°C. Планшети після цього інкубували зі злитими білками з описаної вище бібліотеки поліпептидів у різних концентраціях протягом однієї години при кімнатній температурі. Після промивання 0,5% Tween, що містив TBS, зв'язані злиті білки елюювали з 1 мг/мл BSA, який містив 0,2 М буфера гліцину-HCl (pH 2,2), і нейтралізували за допомогою 1 М Tris-HCl (pH 9.). Після цього визначали амінокислотні послідовності елююваних злитих білків.

Поліпептидні послідовності, зв'язані моноклональним антитілом m128-9F9, показано нижче:

WPEDSSYDSWPRG SEQ ID NO:4  
LDYDFLPETEP SEQ ID NO:5

TATWDPDYFSDS	SEQ ID NO:6
AETDYDPDHFTPG	SEQ ID NO:7
DARYSHDPAWPYG	SEQ ID NO:8
AGQKWDPPEWPHSG	SEQ ID NO:9
EPNMDPNWASPSG	SEQ ID NO:10
KSHYDESWWYNGG	SEQ ID NO:11
YDHHWTNPPTQK	SEQ ID NO:12
YDHHWPRDDIAP	SEQ ID NO:13

Одержували консенсусну поліпептидну послідовність  $X_1$ - $X_2$ - $X_3$ - $X_4$ - $X_5$ , де  $X_1 = Y/W/H/M$ ,  $X_2 = D$ ,  $X_3 = S/F/P/E/H$ ,  $X_4 =$  будь-яка амінокислота, і  $X_5 = P/Y/H/W$ .

Поліпептидні послідовності, зв'язані моноклональним антитілом m166-43B6, показано нижче:

QDTWYDPDYFPES	SEQ ID NO:14
SHTLLNDMFPEES	SEQ ID NO:15
SPLRDNFPETLW	SEQ ID NO:16
ASPYMDNFPPEEN	SEQ ID NO:17
QLVQDWLPEESH	SEQ ID NO:18
YLDYDFLPETEPP	SEQ ID NO:19

Одержували консенсусну поліпептидну послідовність  $X_6$ - $X_7$ - $X_8$ - $X_9$ - $X_{10}$ , де  $X_6 = D$ ,  $X_7 = Y/M/N/W/F$ ,  $X_8 = F$  або  $L$ ,  $X_9 = P$ , і  $X_{10} = E$ .

Поліпептидні послідовності, зв'язані моноклональним антитілом m152-15A7, показано нижче:

YTPMPMEISHSA	SEQ ID NO:20
MNDKYIPMSISA	SEQ ID NO:21
KIPHKTLVPMEI	SEQ ID NO:22
TDSAAMEIQTQ	SEQ ID NO:23

Одержували консенсусну поліпептидну послідовність  $X_{11}$ - $X_{12}$ - $X_{13}$ - $X_{14}$ , де  $X_{11} = P/A$ ,  $X_{12} = M$ ,  $X_{13} = E/S$ , і  $X_{14} = I$ .

ELISA-аналіз епітопів, які викликають смерть Т-клітин, розпізнаних моноклональними антитілами

Для виявлення специфічності викликаючих смерть клітин епітопів, розпізнаних вищеописаними моноклональними антитілами, здійснювали сендвіч-ELISA. Послідовні розведення (від 0,0017 фмоль до 17 фмоль) поліпептидів, які містили епітопи, інкубували з моноклональними антитілами m128-9F9, m152-15A7 або m166-43B6, попередньо нанесеними на ELISA-планшети, для визначення їх афінності зв'язування.

96-лункові мікротитрувальні планшети вкривали 50 мкг/лунку антитіл у концентрації 1 мкг/мл до наступного дня при 4°C. Планшети блокували шляхом інкубації з 0,25% BSA у PBS (150 мкг/лунку) протягом 1 години при 37°C. Планшети після цього інкубували зі злитими білками, які містили різні поліпептиди, протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після 4-разового промивання PBS, який містив 0,05% Tween 20 (PBST), планшети інкубували з антитілами, специфічними до іншого учасника злиття, у кількості 2 мкг/мл протягом 1,5 години при кімнатній температурі. Після інкубації планшети 4 рази промивали PBST. Після цього у кожному лунку додавали 50 мкл розведеного від 1 до 3000 разів специфічних антитіл кози проти іншого учасника злиття, кон'югованих з лужною фосфатазою (AP), і планшети інкубували протягом 1 години при 37°C. Ферментну реакцію здійснювали шляхом додавання 50 мкл субстратного розчину AP (1 таблетка субстрату AP, розчинена у 5 мл субстратного буфера). Результати підтверджували, що всі з вибраних поліпептидів специфічно зв'язуються з їхніми відповідними антитілами, застосованими для відбору.

Інші варіанти втілення

Усі відмітні ознаки, розкриті в цьому описі, можуть поєднуватись у будь-яку комбінацію. Кожна відмітна ознака, розкрита в цьому описі, може бути замінена на альтернативну відмітну ознаку, яка служить для тієї самої, рівноцінної або подібної мети. Таким чином, якщо прямо не вказано іншого, кожна розкрита відмітна ознака є лише прикладом із загальної групи рівноцінних або подібних відмітних ознак.

З наведеного вище опису спеціаліст у даній галузі може легко визначити суттєві характеристики даного винаходу і без відхилення від його сутності та обсягу може здійснити різні зміни та модифікації винаходу для його пристосування до різних варіантів та умов застосування. Таким чином, інші варіанти втілення також охоплюються обсягом винаходу.