



(19) REPUBLIKA HRVATSKA  
DRŽAVNI ZAVOD ZA  
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator  
dokumenta:

HR P20031054 B1

HR P20031054 B1

(12) **PATENTNI SPIS**

(51) MKP:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C07K 14/31** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)

(45) Datum objavljivanja patenta:

30.12.2016.

(21) Broj prijave patenta: P20031054A

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 17.12.2003.

(43) Datum objavljivanja prijave patenta u HR: 30.04.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/SE02/01188  
Datum podnošenja međunarodne prijave 19.06.2002.

(87) Broj međunarodne objave: WO 03/002143  
Datum međunarodne objave 09.01.2003.

(31) Broj prve prijave: 0102327-4

(32) Datum podnošenja prve prijave: 28.06.2001.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: SE

(73) Nositelj patenta:

(72) Izumitelj:

**Active Biotech AB, P.O. Box 724, 22007 Lund, SE**  
**Göran Forsberg, Sturegatan 52, 24131 Eslöv, SE**  
**Eva Erlandsson, Elverksvägen 5, 24010 Dalby, SE**  
**Per Antonsson, Spårsnögatan 35, 22652 Lund, SE**  
**Björn Walse, Skyttelinjen 130, 22649 Lund, SE**

(74) Zastupnik:

Odvjetnica Dina Korper Žemva, 10000 Zagreb, HR

(56) Citirana literatura/dokumenti:

WO 9904820 A  
WO 9736932 A  
WO 9601650 A  
WO 0130854 A  
WO 0136486 A

(54) Naziv izuma:

**NOVO PROIZVEDEN SUPERANTIGEN ZA HUMANU TERAPIJU**

HR P20031054 B1

**OPIS IZUMA****Pozadina izuma**5 **Polje izuma**

Sadašnji izum se odnosi na polje imunologije i proliferativnih oboljenja, kao što je rak. Posebnije, on se odnosi na pripreme i načine korištenja, gdje pripravci obuhvaćaju superantigene koji su promijenjeni radi smanjenja seroreaktivnosti.

10

**Odgovarajuća područja**

Superantigeni (SAg-ovi) sačinjavaju skupinu bakterijskih i virusnih proteina koji su krajnje učinkoviti u aktiviranju velike frakcije populacije T-stanica. Superantigeni se vežu izravno na glavni histokompatibilni kompleks (MHC) bez da se procesiraju. U stvari se superantigeni vežu neprocesirano izvan utora koji veže antigen na molekulama MHC II klase, tako uglavnom izbjegavajući polimorfizam u mjestu vezanja peptida. Mehanizam vezivanja ovisi o vezivanju superantigena na receptor T-stanica (TCR) u V $\beta$  lancu, umjesto vezivanja na hipervarijabilne petlje receptora T-stanica (TCR).

20 Stafilokokni enterotoksini (SEs) su homologna skupina superantigena, s obzirom i na strukturu i na funkciju (Papageorgiou i ostali, 2000). Poznati su kao glavni uzrok trovanja hranom i sindroma toksičnog šoka kod ljudi.

Novi pristup tumorskoj terapiji temeljen na SAg-u je razvijen za adjuvantski tretman krutih tumora. On koristi obje glavne poluge imuno sustava ugrađujući Fab dio tumor-specifičnog monoklonskog antitijela i SAg koji aktivira T-stanice u jednom rekombinantnom fuzijskom proteinu. Fab-SAg proteini vezani na tumorske stanice mogu potaknuti SAg-om aktivirane citotoksične T-stanice da ubiju tumorske stanice izravno sa na superantigen antitijelo ovisno stanično posredovanom citotoksičnošću, SADCC. Dodatno, aktivirane T-stanice proizvode tumoricidalne i proinflamatorne citokine koji poništavaju probleme heterogenosti tumora, odnosno makromolekulsko uzimanje.

30 Tumorski terapeutici temeljeni na superantigenu su imali neki uspjeh, međutim, jedan klinički problem na koji treba ukazati je aktivacija sustavnog imunog sustava. Fuzijski proteini s divljom vrstom SEA su proučavani u kliničkim ispitivanjima raka debelog crijeva i gušterače (Alpaugh i ostali, 1998). Uočena su ograničenja unatoč dobivenih ohrabrujućih rezultata. Prvo je produkt bio jako otrovan. Drugo, prethodno pripravljena antitijela na superantigene kod pacijenata su načinila doziranje kompleksnim. Dodatno, produkt je bio imunogen. Stoga su ponovljeni ciklusi terapije bili mogući kod ograničenog broja pacijenata.

Do sadašnjeg izuma su na SAg temeljene terapije bile ograničene dozom. Sadašnji izum je prvi koji mijenja superantigen što rezultira smanjenjem seroreaktivnosti uz zadržavanje aktivnosti superantigena; stoga je sadašnji izum nov i nije očit.

40

**Kratak sažetak izuma**

Prije spomenuto je naglasilo dosta široko izvedbe i tehničke prednosti sadašnjeg izuma s ciljem da se detaljni opis izuma koji slijedi može bolje razumjeti. Dodatne izvedbe i prednosti izuma će se opisati ovdje kasnije što oblikuje subjekt zahtjeva izuma. Iskusni u području trebaju cijeniti što se koncepcija i specifična izvedba otkrivenog može lako iskoristiti kao temelj za izmjene i oblikovanje drugih struktura za provođenje istih svrha sadašnjeg izuma. Iskusni u području bi također trebali shvatiti da se takve jednakovrijedne konstrukcije ne odmiču od duha i raspona izuma kako je postavljen u dodanim zahtjevima. Nove izvedbe za koje se vjeruje da su karakteristika izuma, i kao njihove organizacije i kao način rada, skupa s daljnjim objektima i prednostima, će se bolje razumjeti iz slijedećeg opisa kada se razmatra s pratećim slikama. Očekuje se da će se brzo razumjeti, međutim, da je svaka slika načinjena samo u svrhu ilustracije i opisa i nije bila namjera kao definicija ograničenja sadašnjeg izuma.

U sadašnjem izumu je osiguran konjugat koji obuhvaća bakterijski superantigen i neko antitijelo, gdje je superantigen superantigen niskog titra koji obuhvaća područja A do E, koje područje A je mjesto vezivanja TCR, a područja B do E određuju vezivanje MHC molekule klase II; i DNK sekvenca koja kodira za superantigen je supstituirana tako da nije više od 15 aminokiselinskih ostataka u području A zamijenjeno s različitim aminokiselinama, tako da supstituirani superantigen ima smanjenu seroreaktivnost u usporedbi sa superantigenom iz kojeg je dobiven; i gdje je antitijelo antitijelo pune dužine ili bilo koja druga molekula koja veže aktivni fragment antitijela, koji je usmjeren prema strukturi površine stanice povezane s rakom. Primjeri superantigena uključuju, ali nisu ograničeni na stafilokokni enterotoksin (SE), *Streptococcus pyogenes* egzotoksin (SPE), *Staphylococcus aureus* toksin sindroma toksičnog šoka (TSST-1),

60

streptokokni mitogeni egzotoksin (SME) i streptokokni superantigen (SSA). U specifičnim izvedbama, stafilokokni enterotoksin je stafilokokni enterotoksin A (SEA) ili stafilokokni enterotoksin E (SEE).

5 U specifičnim izvedbama, položaji aminokiselinskih ostataka u području A koji će se zamijeniti su odabrani iz skupine koja se sastoji od 20, 21, 24, 27, 173 i 204. Također se razmišljalo da područje C može obuhvatiti supstitucije u ne više od 15 aminokiselinskih ostataka. Ove supstitucije se mogu pojaviti na položajima aminokiselinskih ostataka 79, 81, 83 i 84. Još dalje, područje E može obuhvaćati supstitucije od ne više od 15 aminokiselinskih ostataka, u kojima se supstitucija može pojaviti na položaju aminokiselinskog ostatka 227.

10 U drugoj izvedbi sadašnjeg izuma, osiguran je konjugat koji obuhvaća bakterijski superantigen i neko antitijelo, gdje je superantigen superantigen niskog titra koji obuhvaća područja A do E, koje područje A je mjesto vezivanja TCR, a područja B do E određuju vezivanje MHC molekula klase II; aminokiselinska sekvencija superantigena je supstituirana tako da nije više od 15 aminokiselinskih ostataka u području B zamijenjeno s različitim aminokiselinama, tako da supstituirani superantigen ima smanjenu seroreaktivnost u usporedbi sa superantigenom iz kojeg je dobiven; i gdje je antitijelo antitijelo pune dužine ili bilo koja druga molekula koja veže aktivni fragment antitijela, koji je upućen prema strukturi površine stanice povezane s rakom. Specifično, položaji aminokiselinskih ostataka u području B koji će se zamijeniti mogu se odabrati iz skupine koja se sastoji od 34, 35, 39, 40, 41, 42, 44, 45 i 49.

20 Jedna druga izvedba sadašnjeg izuma osigurava konjugat koji obuhvaća bakterijski superantigen i neko antitijelo, gdje je superantigen superantigen niskog titra koji obuhvaća područja A do E, koje područje A je mjesto vezivanja TCR, a područja B do E određuju vezivanje MHC molekula klase II; aminokiselinska sekvencija superantigena je supstituirana tako da nije više od 15 aminokiselinskih ostataka u području C zamijenjeno s različitim aminokiselinama, tako da supstituirani superantigen ima smanjenu seroreaktivnost u usporedbi sa superantigenom iz kojeg je dobiven; i gdje je antitijelo antitijelo pune dužine ili bilo koja druga molekula koja veže aktivni fragment antitijela, koji je upućen prema strukturi površine stanice povezane s rakom. U specifičnim izvedbama rak je odabran iz skupine koja se sastoji od raka pluća, dojke, debelog crijeva, bubrega, gušterače, jajnika, želuca, grlića maternice i prostate. Položaji aminokiselinskih ostataka u području C koje će se zamijeniti su odabrani iz skupine koja se sastoji iz 74, 75, 78, 79, 81, 83 i 84.

30 Primjeri superantigena uključuju, ali nisu ograničeni na stafilokokni enterotoksin (SE), *Streptococcus pyogenes* egzotoksin (SPE), *Staphylococcus aureus* toksin sindrom toksičog šoka (TSST-1), streptokokni mitogeni egzotoksin (SME) i streptokokni superantigen (SSA). U specifičnim izvedbama, stafilokokni enterotoksin je stafilokokni enterotoksin A (SEA) ili stafilokokni enterotoksin E (SEE).

35 U specifičnim izvedbama konjugat može dalje obuhvaćati supstitucije u ne više od 15 aminokiselinskih ostataka u području A. Položaji aminokiselinskih ostataka u području A koje će se zamijeniti mogu biti na položajima 20, 21, 24, 27, 173 ili 204. Još dalje, konjugat može obuhvaćati supstitucije od ne više od 15 aminokiselinskih ostataka u području E. Još posebnije, supstitucija područja E se može pojaviti kod položaja 227 aminokiselinskog ostatka.

40 U daljnjoj specifičnoj izvedbi, konjugat može obuhvaćati SEE aminokiselinsku sekvenciju uključujući supstitucije R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K83S, K84S i D227S ili SEE aminokiselinsku sekvenciju uključujući supstitucije R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K83S, K84S i D227S. Još dalje, konjugat može obuhvaćati aminokiselinsku sekvenciju SEQ ID NO: 2.

45 U daljnjim izvedbama konjugat može obuhvaćati neko antitijelo, na primjer, ali nije ograničen na Fab fragment. Specifični Fab fragmenti mogu uključivati C215Fab ili 5T4Fab.

Još dalje konjugat može također obuhvaćati citokin, kao što je interleukin. U specifičnim izvedbama interleukin je IL2 ili njegov derivat koji ima bitno istu biološku aktivnost kao prirodni IL2.

50 Jedna druga izvedba obuhvaća konjugat koji obuhvaća bakterijski superantigen i neko antitijelo, gdje je superantigen superantigen niskog titra koji obuhvaća područja A do E, koje područje A je mjesto vezivanja TCR, a područja B do E određuju vezivanje MHC molekula klase II; aminokiselinska sekvencija superantigena je supstituirana tako da nije više od 15 aminokiselinskih ostataka u području D zamijenjeno s različitim aminokiselinama, tako da supstituirani superantigen ima smanjenu seroreaktivnost u usporedbi sa superantigenom iz kojeg je nastao; i gdje je antitijelo pune dužine ili bilo koja druga molekula koja veže aktivni fragment antitijela, koji je upućen prema strukturi površine stanice povezane s rakom. Položaji aminokiselinskih ostataka u području D koji će se zamijeniti su odabrani iz skupine koja se sastoji iz 187, 188, 189 i 190.

60 U jednoj drugoj izvedbi je osiguran konjugat koji obuhvaća bakterijski superantigen i neko antitijelo, gdje je superantigen superantigen niskog titra koji obuhvaća područja A do E, čije područje A je mjesto vezivanja TCR, a

područja B do E određuju vezivanje MHC molekula klase II; aminokiselinska sekvenca superantigena je supstituirana tako da nije više od 15 aminokiselinskih ostataka u području E zamijenjeno s različitim aminokiselinama, tako da supstituirani superantigen ima smanjenu seroreaktivnost u usporedbi sa superantigenom iz kojeg je nastao; i gdje je antitijelo antitijelo pune dužine ili bilo koja druga molekula koja veže aktivni fragment antitijela, koji je upućen prema strukturi površine stanice povezane s rakom. U specifičnim izvedbama stafilokokni enterotoksin je stafilokokni enterotoksin A (SEA) ili stafilokokni enterotoksin E (SEE). Također, položaji aminokiselinskih ostataka u području E koji će se zamijeniti su odabrani iz skupine koja se sastoji iz 217, 220, 222, 223, 225 i 227.

U specifičnoj izvedbi, konjugat dalje obuhvaća supstitucije od ne više od 15 aminokiselinskih ostataka u području A. Specifično, supstitucije u području A se mogu pojaviti na položajima aminokiselinskih ostataka 20, 21, 24, 27, 173 i 204.

U jednoj drugoj specifičnoj izvedbi, konjugat dalje obuhvaća supstitucije od ne više od 15 aminokiselinskih ostataka u području B u kojem se supstitucije mogu pojaviti na položajima aminokiselinskih ostataka 34, 35, 39, 40, 41, 42, 44, 45 i 49.

Još dalje konjugat može obuhvaćati supstitucije od ne više od 15 aminokiselinskih ostataka u području C. Specifično, supstitucije u području C se pojavljuju na položajima aminokiselinskih ostataka 74, 75, 78, 79, 81, 83 i 84. Konjugat također može dalje obuhvaćati supstitucije od ne više od 15 aminokiselinskih ostataka u području D, u kojem se supstitucije mogu pojaviti na položajima 187, 188, 189 i 190 aminokiselinskih ostataka.

U jednoj drugoj specifičnoj izvedbi je osiguran farmaceutski pripravak koji obuhvaća terapijsku količinu konjugata, gdje rečeni konjugat koji obuhvaća bakterijski superantigen i neko antitijelo, gdje je superantigen superantigen niskog titra koji obuhvaća područja A do E, koje područje A je mjesto vezivanja TCR, a područja B do E određuju vezivanje MHC molekula klase II; aminokiselinska sekvenca superantigena je supstituirana tako da nije više od 15 aminokiselinskih ostataka u području C zamijenjeno s različitim aminokiselinama, tako da supstituirani superantigen ima smanjenu seroreaktivnost u usporedbi sa superantigenom iz kojeg je dobiven; i gdje je antitijelo antitijelo pune dužine ili bilo koja druga molekula koja veže aktivni fragment antitijela, koji je upućen prema strukturi površine stanice povezane s rakom. Specifično su položaji aminokiselinskih ostataka u području C koje će se zamijeniti odabrani iz skupine koja se sastoji iz 74, 75, 78, 79, 81, 83 i 84.

U daljnjim izvedbama farmaceutski pripravak može obuhvatiti konjugat koji obuhvaća supstitucije od ne više od 15 aminokiselinskih ostataka u području A, koje se supstitucije pojavljuju u području A na položajima 20, 21, 24, 27, 173 i 204 aminokiselinskih ostataka. Još dalje, farmaceutski pripravak može također obuhvaćati supstitucije od ne više od 15 aminokiselinskih ostataka u području E. Specifično, supstitucija u području E može biti na položaju 227 aminokiselinskog ostatka.

U specifičnim izvedbama farmaceutski pripravak može obuhvaćati konjugat koji obuhvaća SEE aminokiselinsku sekvencu (SEQ ID NO : 7) isto kao i dodatne supstitucije R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K83S, K84S i D227S.

U jednoj drugoj specifičnoj izvedbi farmaceutski pripravak može obuhvaćati konjugat koji obuhvaća SEE aminokiselinsku sekvencu (SEQ ID NO : 7) isto kao i dodatne supstitucije R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K83S, K84S i D227S. Još dalje, farmaceutski pripravak obuhvaća konjugat koji ima aminokiselinsku sekvencu SEQ ID NO: 1.

U daljnjim specifičnim izvedbama farmaceutski pripravak obuhvaća neko antitijelo, na primjer Fab fragment. Specifično je Fab fragment C215Fab ili 5T4Fab. Farmaceutski pripravak može nadalje obuhvaćati citokin, kao što je interleukin. Interleukin može biti IL2 ili njegov derivat koji ima bitno istu biološku aktivnost kao i prirodni IL2.

Jedna druga izvedba sadašnjeg izuma uključuje način tretiranja raka kod sisavaca aktiviranjem imunog sustava rečenih sisavaca što obuhvaća davanje rečenim sisavcima terapijski djelotvornu količinu konjugata, gdje rečeni konjugat obuhvaća bakterijski superantigen i neko antitijelo, gdje je superantigen superantigen niskog titra koji obuhvaća područja A do E, koje područje A je mjesto vezivanja TCR, a područja B do E određuju vezivanje MHC molekula klase II; aminokiselinska sekvenca superantigena je supstituirana tako da nije više od 15 aminokiselinskih ostataka u području C zamijenjeno s različitim aminokiselinama, tako da supstituirani superantigen ima smanjenu seroreaktivnost u usporedbi sa superantigenom iz kojeg je dobiven; i gdje je antitijelo antitijelo pune dužine ili bilo koja druga molekula koja veže aktivni fragment antitijela, koji je upućen prema strukturi površine stanice povezane s rakom. Primjeri raka uključuju, ali nisu ograničeni na, rak pluća, dojke, debelog crijeva, bubrega, gušterače, jajnika, želudac, grlića maternice

i prostate. Specifično su položaji aminokiselinskih ostataka u području C koje će se zamijeniti odabrani iz skupine koja se sastoji iz 74, 75, 78, 79, 81, 83 i 84.

U daljnjim izvedbama, područje A može također obuhvaćati supstitucije od ne više od 15 aminokiselinskih ostataka, koje se supstitucije pojavljuju u području A na položajima 20, 21, 24, 27, 173 i 204 aminokiselinskih ostataka. Također, područje E može dalje obuhvaćati supstitucije od ne više od 15 aminokiselinskih ostataka. Specifično, supstitucija u području E može biti na položaju 227 aminokiselinskog ostatka. Konjugat može obuhvaćati SEE aminokiselinsku sekvencu (SEQ ID NO : 7) isto kao i dodatne supstitucije R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K83S, K84S i D227S ili supstitucije R20G, N21T, S24G, R27K, K79E, K81E, K83S, K84S i D227S. Još dalje, farmaceutski pripravak obuhvaća konjugat koji ima aminokiselinsku sekvencu SEQ ID NO: 1.

### **Kratki opis crteža**

Slijedeći crteži čine dio sadašnje specifikacije i uključeni su da dalje pokažu određene vidove sadašnjeg izuma. Izum može biti razumljiviji pozivanjem na jedan ili više ovih crteža skupa s detaljnim opisom specifičnih izvedbi predstavljenih ovdje.

SLIKA 1 pokazuje peptidne fragmente prepoznate od ljudskog anti-SEA koji su identificirani iz pepsinom obrađene SEA/E-18 eluirane s anti-SEA stupca. Fragmenti su identificirani i prije i nakon pročišćavanja uporabom reverzno faznog HPLC povezane s masenim spektrometrom (MS). Fragmenti nađeni u obrađenom uzorku kod istog retencijskog vremena i prije i nakon afinitnog pročišćavanja su smatrani kao pozitivni.

SLIKA 2 je sedam različitih identificiranih peptida, prikazanih kao crte iznad aminokiselinske sekvence za SEA/E-120. Slova u svijetlo sivom ukazuju koji ostaci su zamijenjeni u SEA/E-120 u usporedbi prema SEA/E-18.

SLIKA 3 je strukturno poravnanje sekvence SEA, SED i SEH korištenih kao predlošci za konstrukciju komparativnog računalnog modela SEA/E-18. Strukturno sačuvana područja su označena s crnim kutijama.

SLIKA 4 je multiplicirano poravnanje sekvence SEA, SEE, SEA/E-18 i SEA/E-120. Prikazano kao crte iznad poravnanja su pet različitih područja A-E unutar kojih se drže sve supstitucije kod SEA/E-120.

SLIKA 5 je SEA/E-18 model (u crnom) prenesen na SEA (1SXT u sivom).

SLIKA 6 su područja SEA/E-18 koja odgovaraju identificiranim seroreaktivnim peptidima.

SLIKA 7 je scintilacijski proksimitivni test (SPA) koji je izmjerio specifično vezivanje <sup>125</sup>I humanog anti-SEA vezanog na C215FabSEA, C215Fab SEA/E-18, -65, -97, -109, -110, -113 ili -120 na biotin konjugiranom anti-mišjemF(ab)<sub>2</sub> na streptavidin PVT podlogu.

SLIKA 8A I SLIKA 8B ilustriraju sposobnost utjecaja na citotoksičnost usmjerenu prema tumoru. SLIKA 8A pokazuje citotoksičnost kako je izmjerena u superantigen antitijelo ovisnom testu stanične citotoksičnosti, SADCC. SLIKA 8B pokazuje djelotvornost superantigena da utječe na ubijanje s T stanicama MHC ekspresirajućih stanica klase II što rezultira u sustavnoj citotoksičnosti koja može uzrokovati pokrajnje efekte izmjerene u superantigen ovisnom testu stanične citotoksičnosti, SDCC. Sve nove kimere su snizile njihov učinak u SDCC s najmanje 1log i s čak 3log za C215Fab SEA/E-120.

SLIKA 9 je vrpčasti dijagram modela SEA/E-120. Pokrajnji lanci ostataka G20, T21, G24 i K27 su označeni tamno sivo, pokrajnji lanci ostataka S34, S39, S40, E41, K42, A44, T49, T74, A75, S78, E79, E81, S83 i S84 su označeni sivo, pokrajnji lanci ostataka T217, S220, T222, S223, S225 su označeni crno i pokrajnji lanac ostatka 227 je označen svijetlo sivo.

SLIKA 10 je aminokiselinska sekvencu 5T4Fab SEA/E-120 (SEQ ID NO: 1) s promijenljivim dijelovima iz murinskog antitijela 5T4 i stalni dijelovi od murinskog antitijela C242. Položaji 1-458 je lanac A a položaji 459-672 su lanac B.

### **Detaljan opis izuma**

Lako je uočljivo osobi iskusnoj u području da različite se izvedbe i modifikacije mogu načiniti u otkrivenom izumu u ovoj Prijavi bez napuštanja raspona i duha izuma.

Kako se ovdje koristi specifikacija "a" ili "an" (u engl. tekstu) može značiti jedan ili više. Kako se ovdje koristi u zahtjevu(ima), kada se koristi skupa s riječi "obuhvaća", riječi "a" ili "an" (u engl. tekstu) može značiti jedan ili više od jedan. Kako se ovdje koristi "neki drugi" može značiti najmanje drugi ili više.

5 Izraz "antitijelo" kako se ovdje koristi, odnosi se na neku imunoglobulinsku molekulu, koja je sposobna specifično se vezati na specifični epitop na nekom antigenu. Kako se ovdje koristi, za antitijelo je namjeravano da se odnosi široko na bilo koje imunologično vezivajuće sredstvo kao što je IgG, IgM, IgA, IgD i IgE. Antitijela mogu biti netaknuti imunoglobulinski derivati iz prirodnih izvora ili iz rekombinantnih izvora i mogu biti imunoaktivni dijelovi netaknutih imunoglobulina. Antitijela u sadašnjem izumu mogu postojati u mnogim oblicima uključujući, na primjer, poliklonalna antitijela, monoklonalna antitijela, Fv, Fab i F(ab)<sub>2</sub>, kao i antitijela jednog lanca i humanizirana antitijela (Harlow i istali, 1988.; Bird i ostali, 1988.).

Izraz "antigen" kako se ovdje koristi je definiran kao molekula koja izaziva imuni odgovor. Ovaj imuni odgovor može uključivati produkciju antitijela, aktiviranje specifičnih imunološki kompetentnih stanica, ili oboje. Neki antigen može biti izveden iz organizama, podjedinice proteina/antigena, ubijene ili inaktivirane cijele stanice ili lizata. Stoga, osoba iskusna u području shvaća da bilo koja makromolekula, virtualno uključujući sve proteine, može služiti kao antigeni. Nadalje, antigeni se mogu izvesti iz rekombinantne DNA.

Izraz "rak" kako se koristi ovdje je određen kao proliferalno oboljenje ili maligni neoplazam (tumor). Primjeri uključuju, ali nisu ograničeni na, rak dojke, rak prostate, rak jajnika, rak grlića maternice, rak kože, rak gušterače, rak debelog crijeva i rak pluća.

Izraz "konjugat" kako se koristi ovdje je određen kao fuzijski protein superantigena ili inačica superantigena spojenog ili konjugiranog na neko antitijelo ili dio antitijela.

Izraz "imunogeni" ili "imunogenost" kako se koristi ovdje je određen kao tvar ili molekula koja pobuđuje imuni odgovor.

Izraz "glavni (većinski) histokompatibilni kompleks", ili "MHC", kako se koristi ovdje je određen kao specifični grozd gena, mnogi od kojih kodiraju proteine stanične površine povezane s evolucijom koji su uključeni u prezentaciju antigena, koja je među najvažnijim determinantama (odrednicama) histokompatibilnosti. Klasa I MHC, ili MHC-I, funkcionira uglavnom kod antigen prezentacije u CD8 T limfocita. Klasa II MHC, ili MHC-2, funkcionira uglavnom u antigen prezentaciji u CD4 T limfocita.

Izraz "seroreaktivan", "seroreakcija" ili "seroreaktivnost" kako se koristi ovdje je određena kao reakcija ili akcija koja se pojavljuje kao rezultat seruma ili sere. Netko iskusan u području shvaća da serum ili sera pacijenta ili životinje sadržava neutralizirajuća antitijela ili ranije nastala antitijela ili endogena antitijela u mnoštvu antigena ili molekula. Stoga je seroreaktivnost povezana na reakciju neutralizirajućih antitijela u serumu.

Izraz "superantigen" kako se koristi ovdje je određen kao klasa molekula koje stimuliraju podskup T-stanica vezivanjem na MHC molekule klase II i na V $\beta$  domenu receptora T-stanica, stimulirajući aktiviranje T-stanica koje ekspresiraju određene V $\beta$  V genske segmente.

Izraz "receptor T-stanica" kako se koristi ovdje je određen kao receptor koji se sastoji od disulfidno vezanog heterodimera visoko odstupajućih  $\alpha$  ili  $\beta$  lanaca ekspresiranih na staničnoj membrani kao kompleks s nepromjenljivim CD3 lancima. T-stanice koje nose ovu vrstu receptora se često nazivaju  $\alpha$ : $\beta$  T-stanice. Jedan alternativni receptor načinjen od varijabilnih  $\gamma$  i  $\delta$  lanaca je ekspresirao CD3 na podskupu T-stanica.

Izraz "terapijski djelotvoran" kako se koristi ovdje je određen kao količina farmaceutskog pripravka koja je djelotvorna kod tretiranja oboljenja ili stanja.

Izraz "inačica" ili "inačice" kako se koristi ovdje odnosi se na proteine ili peptide koji se razlikuju od referentnih proteina, odnosno peptida. Inačice u ovom smislu su opisane niže i drugdje u sadašnjem otkriću mnogo podrobnije. Na primjer, promjene u sekvenci nukleinskih kiselina inačice mogu biti tihe, to jest, ne moraju promijeniti aminokiseline kodirane sa sekvencom nukleinskih kiselina. Gdje su promjene ograničene na tihu promjenu ove vrste inačica će kodirati peptid s istom sekvencom aminokiselina kao referentni peptid. Promjene u sekvenci nukleinskih kiselina inačice mogu promijeniti sekvencu aminokiselina peptida kodiranog referentnom sekvencom nukleinskih kiselina. Takve promjene sekvence nukleinskih kiselina mogu rezultirati u supstituciji aminokiselina, dodavanju, poništavanju, fuziji i kraćenju peptida kodiranog referentnom sekvencom, kako je raspravljeno niže. Općenito, razlike u aminokiselinskim sekvencama su ograničene tako da su sekvence referentne i inačice ukupno jako slične i, u mnogim područjima su iste.

Peptid inačice i referentni peptid se mogu razlikovati u aminokiselinskoj sekvenci u jednoj ili više supstitucija, dodataka, poništavanja, fuzija i skraćivanja, koji mogu biti nazočni u bilo kojoj kombinaciji. Inačica također može biti fragment peptida iz izuma koji se razlikuje od referentne peptidne sekvence što je kraći od referentne sekvence, kao što je terminalno ili unutrašnje poništenje. Jedna druga inačica peptida iz izuma također uključuje peptid koji zadržava bitno istu funkciju ili aktivnost takvog peptida. Inačica može također biti (i) jedna u kojoj je jedan ili više aminokiselinskih ostataka supstituiran s konzerviranim ili nekonzerviranim aminokiselinskim ostatkom i tako supstituiran aminokiselinski ostatak može ili ne može biti kodiran genetičkim kodom ili (ii) jedna u kojoj jedan ili više aminokiselinskih ostataka uključuje supstituentsku skupinu ili (iii) jedna u kojoj je zreli peptid spojen s drugim spojem, kao što je spoj koji povećava poluzivot peptida (na primjer, polietilenglikol) ili (iv) jedna u kojoj su dodatne aminokiseline spojene na zreli peptid kao što je vodeća ili izlučna sekvenca ili sekvenca koja je korištena za pročišćavanje zrelog peptida. Inačice se mogu načiniti tehnikama mutageneze, uključujući one primjenjene na nukleinske kiseline, aminokiseline, stanice ili organizme, ili mogu biti načinjene uz pomoć rekombinacije. Za sve ove inačice određene gore se smatra da su unutar raspona onima iskusnim u području od učenja ovdje i iz područja.

Izraz "biološka aktivnost" kako se koristi ovdje se odnosi na urođena svojstva specifične molekule, na primjer aktiviranja određenih stanica ili vezivanja na određene receptore. Definicija, kako je korištena ovdje, je prvenstveno kvalitativna rađe nego kvantitativna.

## **I. Modifikacije superantigena**

Sadašnji izum je zamišljen tako da modificira superantigene snižavanjem njihove imunogenosti smanjivanjem njihove seroreaktivnosti. Netko iskusan u području prepoznaje da se seroreaktivnost odnosi na reakciju molekula ili antigena s neutralizirajućim antitijelima u serum. Specifično sadašnji izum je zamišljen da konjugat obuhvaća bakterijski superantigen i neko antitijelo, gdje je superantigen superantigen niskog titra koji obuhvaća područja A do E, koje područje A je mjesto vezivanja TCR, a područja B do E određuju vezivanje MHC molekula klase II; i aminokiselinska sekvenca superantigena je supstituirana tako da nije više od 15 aminokiselinskih ostataka u području A zamjenjeno s različitim aminokiselinama, tako da supstituirani superantigen ima smanjenu seroreaktivnost u usporedbi sa superantigenom iz kojeg je dobiven; i gdje je antitijelo antitijelo pune dužine ili bilo koja druga molekula koja veže aktivni fragment antitijela, koji je upućen prema strukturi površine stanice povezane s rakom.

### **A. Superantigeni**

Bakterijski superantigeni koji su predviđeni za korištenje u sadašnjem izumu uključuju, ali nisu ograničeni na stafilokokni enterotoksin (SE), *Streptococcus pyogenes* egzotoksin (SPE), *Staphylococcus aureus* toksin povezan sa toksičnim šokom (TSST-1), streptokokni mitogeni egzotoksin (SME) i streptokokni superantigen (SSA). Netko iskusan u području shvaća da se trodimenzionalne strukture gore izlistanih superantigena mogu dobiti od Proteinske banke podataka (PDB, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Još dalje, netko iskusan u području može dobiti sekvence nukleinskih kiselina i sekvence aminokiselina gore izlistanih superantigena i ostalih superantigena od Banke gena (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>).

U specifičnim izvedbama, superantigen je superantigen niskog titra. Poznato je i razumljivo od onih iskusnih u području da serumi ljudi normalno sadržava visoki titar antitijela prema superantigenima. Za stafilokokne superantigene, na primjer, relativni titri su TSST-1 > SEB > SEC-1 > SEC-2 > SEA > SED > SEE. Netko iskusan u području shvaća da ovi relativni titri ukazuju na imunogene probleme i probleme sa seroreaktivnosti ili probleme s neutralizirajućim antitijelima. Stoga sadašnji izum uzima korištenje superantigena niskog titra, kao što su SEA ili SEE radi izbjegavanja seroreaktivnosti parenteralno danih superantigena.

Još dalje, jasno je poznato i shvaćeno da su sekvence proteina i imunološka krosreaktivnost superantigena ili stafilokoknih enterotoksina podijeljeni u dvije povezane skupine. Jedna skupina se sastoji od SEA, SEE, SED i SEH. Druga skupina je SPEA, SEC, SEB i SSA. Stoga sadašnji izum također razmatra korištenje superantigena s malim titrom za smanjenje ili uklanjanje kros reaktivnosti sadašnjeg izuma s visokim titrom ili endogenim antitijelima prema stafilokoknim enterotoksinima.

### **B. Inačice superantigena**

Inačice aminokiselnih sekvence proteina superantigena mogu biti supstitucijske, umetajuće ili poništavajuće inačice. Ove inačice se mogu pročistiti prema poznatim načinima, kao što je taloženje (na primjer, amonijev sulfat), HPLC, kromatografija ionske izmjene, afinitetna kromatografija (uključujući imunoafinitetnu kromatografiju) ili različita odijeljivanja po veličini (taloženje, gel elektroforeza, gel filtriranje).

Inačice supstitucije ili inačice zamjenjivanja tipično sadržavaju izmjenu jedne aminokiseline za drugu kod jednog ili više mjesta unutar proteina. Supstitucija može biti konzervativna, što znači, jedna aminokiselina je zamijenjena s jednom sličnog oblika i naboja. Konzervativne supstitucije su dobro poznate u području i uključuju, na primjer, izmjene: alanina sa serinom; arginina s lizinom; asparagina s glutaminom ili histidinom; aspartat s glutamatom; cistein sa serinom; glutamin s asparaginom; glutamat s aspartatom; glicin s prolinom; histidin s asparaginom ili glutaminom; izoleucin s leucinom ili valinom; leucin s valinom ili izoleucinom; lizin s argininom; metionin s leucinom ili izoleucinom; fenilalanin s tirozinom, leucinom ili metioninom; serin s treoninom; treonin sa serinom; triptofan s tirozinom; tirozin s triptofanom ili fenilalaninom i valin s izoleucinom ili leucinom.

Stoga su izumitelji razmatrali da se različite promjene mogu načiniti u sekvencama DNK ili genima bez značajnog gubitka biološke korisnosti ili aktivnosti proteina, kako je raspravljeno niže. Aktivnost je indukcija odgovorima T-stanice koja rezultira u citotoksičnosti tumorskih stanica. Još dalje, afinitet superantigena za MHC molekule klase II je smanjen s minimalnim učinkom na citotoksičnost superantigena.

U činjenju takvih promjena, hidropatski indeks aminokiseline se može razmatrati. Važnost hidropatskog indeksa aminokiseline u doprinosu interaktivnoj biološkoj funkciji proteina je općenito razumljiv u području (Kyte i Doolittle, 1982.). Prihvaćeno je da relativni hidropatski karakter aminokiseline doprinosi sekundarnoj strukturi rezultirajućeg proteina, koji u okretu određuje međudjelovanje proteina s drugim molekulama, na primjer, enzimima, supstratima, receptore, DNK, antitijela, antigene i slično.

Svakoj aminokiselini je dodijeljen hidropatski indeks na temelju njene hidrofobnosti i naboju (Kyte i Doolittle, 1982.), koje su: izoleucin (+4,5); valin (+4,2); leucin (+3,8); fenilalanin (+2,8); cistein/cistin (+2,5); metionin (+1,9); alanin (+1,8); glicin (-0,4); treonin (-0,7); serin (-0,8); triptofan (-0,9); tirozin (-1,3); prolin (-1,6); histidin (-3,2); glutamat (-3,5); glutamin (-3,5); aspartat (-3,5); asparagin (-3,5); lizin (-3,9) i arginin (-4,5).

Poznato je u području da određene aminokiseline mogu biti supstituirane s drugim aminokiselinama koje imaju slični hidropatski indeks ili omjer i još rezultiraju u proteinu sa sličnom biološkom aktivnošću, to jest, još dobivaju biološko funkcionalni ekvivalentni protein. Kada se rade takve promjene, supstitucija aminokiseline čije su hidropatske razlike unutar  $\pm 2$  su poželjne, one čije su unutar  $\pm 1$  su posebno poželjne, a one unutar  $\pm 0,5$  su čak još poželjnije.

Također je raumljivo u području da se supstitucija sličnih aminokiseline može načiniti djelotvorno na temelju hidrofilitnosti. U.S. Patent 4,554,101, uključen ovdje pozivanjem na njega, tvrdi da najveći lokalni prosjek hidrofilitnosti proteina, uzrokovan s hidrofilitnošću njegovih susjednih aminokiseline, korelira s biološkim vlasništvom proteina. Kako je detaljnije u US Patent 4,554,101, slijedeće vrijednosti hidrofilitnosti su označene za aminokiselinske ostatke: arginin (+3,0); lizin (+3,0); aspartat (+3,0  $\pm$  1); glutamat (+3,0  $\pm$  1); serin (+0,3); asparagin (+0,2); glutamin (+0,2); glicin (0); treonin (-0,4); prolin (-0,5  $\pm$  1); alanin (-0,5); histidin (-0,5); cistein (-1,0); metionin (-1,3); valin (-1,5); leucin (-1,8); izoleucin (-1,8); tirozin (-2,3); fenilalanin (-2,5); triptofan (-3,4).

**[0064]** Razumljivo je da aminokiselina može biti supstituirana za drugu koja ima sličnu hidrofilitnu vrijednost i još uvijek dobivati biološki i imunološki ekvivalentan protein. Kod takvih promjena, supstitucija aminokiseline čija je hidrofilitna vrijednost unutar  $\pm 2$  je poželjna, one koje su unutar  $\pm 1$  su posebno poželjne, a one unutar  $\pm 0,5$  su čak još više poželjne.

### C. Fuzijski proteini

Specijalizirana vrsta umetajuće inačice je fuzijski protein. Ova molekula općenito ima sve ili bitne dijelove prirodne molekule, vezane na N- ili C-kraj, na sve ili dio drugog polipeptida. Na primjer, fuzijski protein sadašnjeg izuma uključuje dodatak imunološki aktivne domene, kao što je fragment antitijela, na ciljane specifične tumorske stanice.

**[0066]** Još dalje, uključivanje mjesta cijepanja kod ili blizu mjesta fuzije će olakšati uklanjanje tuđeg polipeptida nakon pročišćavanja. Ostale korisne fuzije uključuju vezivanje funkcijskih domena, kao što su aktivna mjesta iz enzima, glikozilacijskih domena, ostalih staničnih ciljajućih signala ili transmembranskih područja.

### D. Promjena domene

Zanimljiva serija inačica se može stvoriti supstituiranjem homolognih područja različitih proteina. To je poznato, u određenom kontekstu, kao "promjena domene".

Promjena domene uključuje generaciju kimernih molekula koristeći različite ali, u ovom slučaju, povezane polipeptide. Uspoređujući različite SAg proteine, netko može se pretpostaviti kao za funkcionalno značajna područja ovih molekula. Moguće je tada promijeniti povezane domene ovih molekula u pokušaj određivanja kritičnosti ovih područja prema SAg



funkciji. Ove molekule mogu imati dodatne vrijednosti u tome što se ovi "kimeri" mogu razlikovati od prirodnih molekula s mogućnosti osiguranja iste funkcije.

## E. Pročišćavanje proteina

5

Bit će poželjno pročitati SAg ili njegove inačice. Tehnike pročišćavanja proteina su dobro poznate onima iskusnima u području. Ove tehnike uključuju, na jednoj razini, sirovo frakcioniranje staničnog okruženje u peptidne i nepeptidne frakcije. Nakon što imamo odijeljen protein od drugih proteina, protein koji nas zanima se može dalje čistiti kromatografijom i elektroforezom radi postizanja djelomičnog ili potpunog pročišćavanja (ili pročišćavanja do homogenosti). Analitičke metode posebno odgovarajuće za pripremu čistog peptida su kromatografija ionskom izmjenom, ekskluzijska kromatografija, poliakrilamidna elektroforeza; izoelektrično fokusiranje. Posebno djelotvoran način pročišćavanja peptida je brza proteinska tekuća kromatografija ili čak HPLC.

10

Određeni aspekti sadašnjeg izuma tiču se pročišćavanja, i u posebnim izvedbama, bitno pročišćavanje, nekog kodiranog proteina ili peptida. Izraz "pročišćeni protein ili peptid" kako se koristi ovdje, namjeravan je da se odnosi na smjesu, koja se može izolirati od ostalih komponenata, gdje je protein ili peptid pročišćen do bilo kojeg stupnja relativno prema svom stanju koje se prirodno može dobiti. Pročišćeni protein ili peptid se stoga također odnosi na protein ili peptid, slobodan od okruženja u kojem se prirodno pojavljuje.

15

Općenito, "pročišćen" će se odnositi na smjesu proteina ili peptida koja je bila podvrgnuta frakcioniranju radi uklanjanja različitih drugih komponenata, i koja smjesa bitno zadržava svoju ekspresiranu biološku aktivnost. Gdje se koristi izraz "bitno pročišćen", ova oznaka će se odnositi na smjesu u kojoj protein ili peptid čine većinu komponenti u smjesi, kao što je učešće oko 50%, oko 60%, oko 70%, oko 80%, oko 90%, oko 95% ili više proteina u smjesi.

20

Razni načini za kvantificiranje stupnja čistoće proteina ili peptida će biti poznati onima iskusnim u području u svjetlu današnjeg otkrića. Oni uključuju, na primjer, određivanje specifične aktivnosti aktivne frakcije ili određivanje količine polipeptida unutar frakcije s SDS/PAGE analizom. Poželjan način utvrđivanja čistoće frakcije je izračunati specifičnu aktivnost frakcije, usporediti je sa specifičnom aktivnosti početnog ekstrakta i prema tome izračunati stupanj čistoće, ovdje određena s "umnožak broja pročišćavanja". Aktualne jedinice korištene za predstavljanje količine aktivnosti će naravno biti ovisne o pojedinačnoj tehnici odabranoj da slijedi pročišćavanje i da li ili ne ekspresirani protein ili peptid pokazuju aktivnost koja se može detektirati.

25

30

Različite tehnike pogodne za uporabu u pročišćavanju proteina bit će dobro poznate onima iskusnim u području. One uključuju, na primjer, taloženje s amonijevim sulfatom, PEG, antitijelima i sličnim ili denaturiranje zagrijavanjem, nakon čega slijedi centrifugiranje; kromatografski stupnjevi kao što je ionska izmjena, gel filtriranje, reverzna faza i afinitetna kromatografija; izoelektrično fokusiranje; gel elektroforeza; i kombinacije takvih i drugih tehnika. Kako je općenito poznato u području, vjeruje se da redoslijed vođenja različitih stunjeva pročišćavanja mogu promijeniti, ili da se neki stupnjevi mogu ispustiti, i još rezultirati u pogodnom načinu pripreme bitno pročišćenog proteina ili peptida.

35

Poznato je da migracija polipeptida može odstupati, ponekad značajno, s različitim stanjima SDS/PAGE (Capaldi i ostali, 1977.). Stoga će se cijeniti da uz različita stanja elektroforeze, neke molekulske težine pročišćenih ili djelomično pročišćenih produkata ekspresije mogu odstupati.

40

Tekućinska kromatografija visokog učinka (HPLC) je karakterizirana s vrlo brzim odijeljivanjem s izvanrednom rezolucijom pikova. To je postignuto korištenjem vrlo finih čestica i visokim tlakom radi postizanja odgovarajuće brzine protoka. Odijeljivanje može biti okončano u minutama, ili najviše jedan sat. Štoviše, samo vrlo mali volumen uzorka je potreban, jer su čestice toliko male i gusto pakirane te je prazan volumen vrlo mala frakcija ukupnog volumena. Također nije potrebno da koncentracija uzorka bude jako visoka, jer su vrpce toliko uske tako da postoji vrlo malo razrijeđenje uzorka.

45

50

Gel kromatografija ili kromatografija molekularnih sita, je posebna vrsta particijske kromatografije koja je temeljena na veličini molekule. Teorija koja stoji iza gel kromatografije je ta da stupac, koji je pripremljen sa sićušnim česticama inertne tvari koja sadrži male pore, odvaja veće molekule od manjih molekula kako one prolaze kroz ili oko pora, ovisno o njihovoj veličini. Tako dugo dok tvar od kojeg su načinjene čestice ne apsorbira molekule, jedini čimbenik određivanja brzine protoka je veličina. Molekule se eluiraju sa stupca prema smanjujućoj veličini, tako dugo dok je oblik relativno stalan. Gel kromatografija je nezaobilazna za odijeljivanje molekula različitih veličina zato jer je odijeljivanje neovisno od svih ostalih čimbenika, kao što su pH, ionska jakost, temperatura itd. Također praktički nema apsorpcije, manje širenje zone i zapremnina elucije je povezana samo s molekulskom masom.

55

Afinitetna kromatografija je kromatografski postupak koji počiva na posebnom afinitetu između tvari koja će se izolirati i molekule koja se može specifično vezati na nju. To je receptor-ligand tip međudjelovanja. Tvar za stupac je sintetizirana kovalentnim vezanjem jednog od vezivajućih partnera na netopivi nosač. Tvar za stupac je tada sposobna specifično apsorbirati tvar iz otopine. Eluiranje se pojavljuje promjenom uvjeta u one u kojima se vezivanje neće pojaviti (promjena pH, ionske jakosti, temperature itd.).

## F. Mutageniza inačica

Sadašnji izum predviđa da modifikacija afiniteta superantigena za NHC molekule klase II može smanjiti otrovnost superantigena. Stoga, smanjeni afinitet za MHC molekule klase II rezultira u smanjenoj seroreaktivnosti ili smanjenoj reakciji s neutralizirajućim antitijelima ili endogenim ili prije nastalim antitijelima.

U specifičnim izvedbama će se mutageniza koristiti za modifikaciju područja superantigena koje određuje vezivanje na MHC klase II molekula. Mutageniza će se provesti različitim standardnim mutagenim postupcima. Mutacija je postupak gdje se promjene pojavljuju u količini ili strukturi nekog organizma. Mutacija može uključivati modifikaciju sekvence nukleotida pojedinog gena, bloka gena ili cijelog kromosoma. Promjene u pojedinom genu mogu biti posljedica mutacije na određenom mjestu, što uključuje uklanjanje, dodavanje ili supstituciju jedne nukleotidne baze unutar DNK sekvence, ili one mogu biti posljedica promjena koje uključuju umetanje ili unuštavanje velikog broja nukleotida.

Jedna posebno korisna tehnika mutagenize je mutageniza skeniranja alanina u kojoj je određen broj ostataka supstituiran pojedinačno s aminokiselinom alaninom tako da mogu biti određeni učinci gubitka pokrajnjih lanaca i njihovih interakcija, istovremeno minimalizirajući rizik perturbacija proteinske konformacije na velikoj skali (Cunningham i ostali, 1989.).

Prethodnih godina su se razvile tehnike za utvrđivanje konstante ravnoteže za vezanje liganda korištenjem vrlo malih količina proteina (U.S. Patent 5,221,605 i 5,238,808). Sposobnost izvedbe funkcijskih testova s malim količinama materijala se može iskoristavati za razvoj visoko učinkovitih, in vitro metodologija za zasićenu mutagenizu antitijela. Izumitelji su preskočili stupnjeve kloniranja kombiniranjem PCR mutagenize sa sparenom in vitro transkripcijom/translatacijom za visoko učinkovitu generaciju proteinskih mutanata. Ovdje su PCR produkti korišteni izravno kao templat za in vitro transkripciju/translataciju mutanta jednolančanih antitijela. Radi visoke učinkovitosti s kojom svih 19 aminokiselinskih supstitucija može biti generirano i analizirano na ovaj način, sada je moguće izvesti mutagenizu zasićenja na brojnim ostacima koji nas zanimaju, postupak koji može biti opisan kao in vitro skenirajuća zasićena mutageniza (Burke i ostali, 1997.).

In vitro skenirajuća zasićenja mutageniza osigurava brzi način za dobivanje velike količine informacija o strukturi-funkciji koja uključuje: (i) identifikaciju ostataka koji moduliraju specifičnost vezivanja liganda, (ii) bolje razumijevanje vezivanja liganda temeljeno na identifikaciji onih aminokiselina koje zadržavaju aktivnost i onih koje odbacuju aktivnost na danoj lokaciji, (iii) evaluaciju potpune plastičnosti nekog aktivnog mjesta ili proteinske subdomene, (iv) identifikaciju aminokiselinskih supstitucija koje rezultiraju u povećanom vezivanju.

Strukturom vođena, po mjestu specifična, mutageniza predstavlja moćni alat za izrezivanje i inženjstvo interakcija protein-ligand (Wells, 1996., Braisted i ostali, 1996.). Tehnika osigurava pripremu i ispitivanje inačica sekvence uvođenjem jedne ili više promjena sekvence nukleotida u odabranu DNK.

Po mjestu specifična mutageniza koristi specifičnu oligonukleotidnu sekvencu koja kodira DNK sekvencu željene mutacije, kao i dovoljan broj susjednih, nemođificiranih nukleotida. Na taj način je osigurana sekvenca početnika s dovoljnom veličinom i kompleksnošću da načini stabilan dupleks na obje strane mjesta spajanja koje je premošteno. Početnik od oko 17 do 25 nukleotida u dužini je poželjan, s oko 5 do 10 ostataka na obje strane mjesta spajanja sekvence koja je zamjenjena.

Tehnika tipično koristi vektor bakteriofaga koji postoji i u jednolančanom i dvolančanom obliku. Vektori korisni u mutagenizi usmjerenoj na mjesto uključuju vektore kao što su M13 fag. Ovi fag vektori su trgovački dostupni i njihovo korištenje je općenito dobro poznato onima iskusnima u području. Dvolančani plazmidi se također rutinski koriste u mutagenizi usmjerenoj na mjesto, što isključuje stupanj prijenosa gena koji nas zanima od faga u plazmid.

Općenito se prvo dobiva jednolančani vektor, ili se rastale dva lanca dvolančanog vektora, koji uključuje unutar svoje sekvence DNK sekvencu koja kodira željeni protein ili genetski element. Neki oligonukleotidni početnik koji nosi željenu mutiranu sekvencu, sintetski pripremljenu, je tada staljen s jednolančanim DNK pripravkom, uzimajući u obzir stupanj neslaganja kada se odabiru uvjeti hibridizacije. Hibridizirani produkt je podvrgnut DNK polimerizirajućem enzimu kao što je *E. coli* polimeraza I (Klenov fragment) s ciljem upotpunjavanja sinteze lanca koja nosi mutaciju. Tako

je nastao heterodupleks, gdje jedan lanac kodira originalnu nemutiranu sekvencu, a drugi lanac nosi željenu mutaciju. Ovaj heterodupleksni vektor je tada korišten za transformaciju odgovarajućih stanica domaćina, kao što su stanice *E. coli*, i klonovi su odabrani da uključuju rekombinantne vektore koji nose mutiranu sekvencu.

5 Opsežna obavijest o funkcionalnom značenju i sadržaj obavijesti danog ostatka proteina može se najbolje dobiti mutagenezom zasićenja u kojoj su ispitane supstitucije svih 19 animokiselina. Nedostatak ovog pristupa je taj što je podrška multistataka mutageneze zasićenja obeshrabrujuća (Warren i ostali, 1996.; Brown i ostali, 1996.; Zeng i ostali, 1996.; Burton i Barbas, 1994.; Yelton i ostali, 1995.; Jackson i ostali, 1995.; Short i ostali, 1995.; Wong i ostali, 1996.; Hilton i ostali, 1996.). Moraju se proučiti stotine, a moguće i tisuće po mjestu specifičnih mutanata. Međutim, poboljšane tehnike čine produkciju i brzi pregled mutanata mnogo jednostavnijom. Vidi također U.S. patente 5,798,208 i 5,830,650, za opis šetnje (walk-through) mutagenezom.

Ostali načini mutageneze usmjerene na mjesto su otkriveni u U.S. patentima 5,220,007; 5,284,760; 5,354,670; 5,366,878; 5,389,514; 5,635,377 i 5,789,166.

15 Dodatno biološki funkcionalnim ekvivalentima koji su proizvedeni korištenjem tehnika mutageneze raspravljenih gore, sadašnji izumitelji razmatraju također da strukturno slični spojevi mogu nastati imitacijom ključnih dijelova superantigena ili konjugata sadašnjeg izuma. Takvi spojevi, koji mogu biti nazvani peptidomimetici, se mogu koristiti na iste načine kao konjugati iz izuma i, stoga su također funkcionalni ekvivalenti.

20 Neki mimetici koji imitiraju elemente proteinske sekundarne i tercijarne strukture su opisani kod Johnson i ostali (1993). Razlog uporabe peptidnih mimetika je to što peptidna okosnica proteina postoji uglavnom radi orijentiranja aminokiselinskih pokrajnjih lanaca na takav način da olakšaju molekulska međudjelovanja, kao što su ona antitijelo i/ili antigen. Mimetik peptida je stoga dizajniran da dozvoljava molekulska međudjelovanja slična prirodnoj molekuli.

25 Neke uspješne primjene koncepta peptidnih mimetika su se usredotočile na mimetiku  $\beta$ -okreta unutar proteina, koji je poznat kao jako antigenski. Vjerovatno se struktura  $\beta$ -okreta unutar polipeptida može predvidjeti algoritmima temeljenim na računalu, kako je raspravljeno ovdje. Jedanput kada je određena komponenta okreta aminokiselina, mimetici se mogu konstruirati da postignu sličnu prostornu orijentaciju bitnih elemenata aminokiselinskih pokrajnjih lanaca.

30 Ostali pristupi su se usredotočili na korištenje malih proteina koji sadržavaju više disulfida, kao privlačnog strukturnog predloška za produkciju biološki aktivnih konformacija koji imitiraju vezajuća mjesta velikih proteina. Vita i ostali (1998.). Strukturni motiv koji je evolucijski konzerviran u određenim otrovima je mali (30-40 aminokiselina), stabilan i visoko dopuštajući za mutaciju. Ovaj motiv je sastavljen od beta površine i nekog alfa heliksa premoštenog u unutrašnjoj jezgri s tri disulfida.

35 Beta II okreti su mimicirani uspješno uporabom cikličkog L-pentapeptida i onih s D-aminokiselinama (Weisshoff i ostali, 1999.). Također su Johannesson i ostali (1999.) izvjestili o bicikličkim tripeptidima sa svojstvom induciranja obrnutog okreta.

40 Načini generiranja specifičnih struktura su otkriveni u području. Na primjer, mimetici alfa-heliksa su otriveni u U.S. patentima 5,446,128; 5,710,245; 5,840,833 i 5,859,184. Ove strukture zadržavaju peptid ili protein više termalno stabilnim, također povećavaju otpornost na proteolitičku razgradnju. Otkrivene su šest-, sedam-, jedanaest-, dvanaest-, trinaest- i četrnaest-eročlane prstenaste strukture.

45 Načini generiranja konformacijski ograničenih beta okreta i beta izbočina su opisani, na primjer, u U.S. patentima 5,440,013; 5,618,914 i 5,670,155. Beta okreti dozvoljavaju promjene pokrajnjih supstituenata bez promjena u odgovarajućim konformacijama okosnice, i imaju odgovarajući kraj za ugradnju u peptide standardnim sintetskim postupcima. Ostale vrste mimetičkih okreta uključuju obrnute i gama okrete. Obrnuti okreti su otkriveni u U.S. patentima 5,475,085 i 5,929,237, a mimetici gama okreta su opisani u US patentima 5,672,681 i 5,674,976.

## G. Ekspresija superantigena

55 Sadašnji izum također uključuje korištenje vektora ekspresije i stanice domaćina. Ovi vektori ekspresije, koji su genetskim inženjeringom načinjeni da sadrže sekvencu nukleinskih kiselina konjugata, su uvedeni ili transformirani u stanice domaćina radi produkcije konjugata iz sadašnjeg izuma.

60 Stanice domaćina mogu genetskim inženjeringom ugrađivati sekvence nukleinskih kiselina i ekspresirati peptide iz sadašnjeg izuma. Uvođenje sekvence nukleinskih kiselina u stanicu domaćina može se postići s transfekcijom s

kalcijevim fosfatom, DEAE-dekstran uzrokovanom transfekcijom, transvekcijom, mikroinjektiranjem, transfekcijom uzrokovanom kationskim lipidima, elektroporacijom, transdukcijom, tankim namazivanjem, balističkim uvođenjem, zarazom ili na ostale načine. Takvi načini su opisani u mnogim standardnim laboratorijskim priručnicima, kao što je Davis i ostali, TEMELJNI NAČINI U MOLEKULSKOJ BIOLOGIJI (1986) i Sambrook i ostali, MOLEKULSKO KOLONIRANJE: LABORATORIJSKI PRIRUČNIK, drugo izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Reprezentativni primjeri odgovarajućih stanica domaćina uključuju bakterijske stanice, kao što su stanice streptokoka, stafilokoka, *E. coli*, streptomiceta i stanice *Bacillus subtilis*; gljivične stanice, kao što su stanice kvasca i stanice aspergillus; stanice kukaca kao što su stanice *Drosophila S2* i *Spodoptera Sf9*; životinjske stanice kao što su CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293 i Bowes melanoma stanice.

## **II. Tretiranje raka**

U sadašnjem izumu, superantigen je konjugiran na antitijelo ili fragment antitijela zbog lociranja i uništavanja stanica raka. Primjeri raka uključuju, ali nisu ograničeni na, rak pluća, dojke, debelog crijeva, bubrega, gušterače, jajnika, želuca, grlića maternice i prostate.

U jednom aspektu sadašnjeg izuma, tumorske stanice moraju nositi neki marker koji je odgovoran za ciljanje, to jest, nije nazočan na većini ostalih stanica. Mnogi tumorski markeri postoje i bilo koji od njih može biti pogodan za ciljanje u kontekstu sadašnjeg izuma. Specifični ciljevi sadašnjeg izuma uključuju antitijela. Antitijela koja se razmatraju u sadašnjem izumu uključuju, ali nisu ograničena na, Fab fragment. Primjeri Fab fragmenta uključuju C215Fab ili 5T4Fab. Kao dodatak Fab-u, drugi uobičajeni tumorski markeri uključuju karcinoembrionski antigen, specifični antigen prostate, antigen povezan s urinarnim tumorom, fetalni antigen, tirozinazu (p97), gp68, TAG-72, HMFG, sialični Lewisov antigen, MucA, MucB, PLAP, receptor estrogena, receptor laminina, erb B i p155.

Jedan drugi aspekt sadašnjeg izuma je korištenje neke imunostimulirajuće molekule kao sredstva, ili još poželjnije u konjukciji s drugim sredstvom, kao što su na primjer, citokini kao na primjer IL-2, IL-4, IL-12. GM-CSF, tumorski nekrozni faktor; interferoni alfa, beta i gama; F42K i ostali analozi citokina; kemokin kao što je na primjer MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES, IL-8; ili faktor rasta kao što je na primjer FLT3 ligand. Stimulirajuća molekula može biti konjugirana na konjugat sadašnjeg izuma ili davana kao neki adjuvant u kombinaciji s konjugatom sadašnjeg izuma.

Jedan određeni citokin razmatran za korištenje u sadašnjem izumu je IL2 ili njegov derivat koji ima bitno istu biološku aktivnost prirodnog IL2. Interleukin-2 (IL-2), originalno označen faktor I rasta T-stanice, je visoko učinkovit u indukciji proliferacije T-stanica i faktor rasta za sve suppopulacije T-limfocita. IL-2 je antigen neovisni faktor proliferacije koji inducira napredak staničnog ciklusa u odmarajućim stanicama i stoga dozvoljava klonalnu ekspanziju aktiviranih T-limfocita. S obzirom da svježe izolirane stanice leukemije također izlučuju IL2 i odgovor na njega, IL2 može djelovati kao neki autokrini modulator rasta za te stanice sposobne pogoršati ATL. IL2 također potiče proliferaciju aktiviranih B-stanica iako to zahtjeva nazočnost dodatnih čimbenika, na primjer, IL4. *In vitro* IL2 također stimulira rast oligodendroglijalnih stanica. Radi svojih učinaka na T-stanice i B-stanice IL2 je središnji regulator imunih odgovora. On također igra ulogu u protuupalnim reakcijama, kod hematopoeze i kod tumora. IL-2 stimulira sintezu IFN- $\gamma$  kod perifernih leukocita i također inducira izlučivanje IL-1, TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$ . Poticanje izlučivanja tumoricidalnih citokina, neovisno o aktivnosti u ekspresiji LAK stanica, (limfokin-aktivirane stanice ubojice) su vjerovatno glavni čimbenici odgovorni za antitumorsku aktivnost IL2.

Razmatrano je da se sadašnji izum može davati pacijentu koji pati od raka ili proliferativnog oboljenja. Količina koja se daje pacijentu je terapijski učinkovita količina ili neka količina koja rezultira u tretiranju raka ili oboljenja. Davanje konjugata može biti posebno alimentirano. Primjerno alimentarno davanje uključuje, ali nije ograničeno na, oralno, rektalno, podjezično ili kroz usta. Primjerno parenteralno davanje uključuje, ali nije ograničeno na, u potrbušnicu, u venu, potkožno, u mišić, u kožu, u tumor i u žilu.

## **III. Farmaceutski pripravci**

Spojevi iz sadašnjeg izuma se mogu koristiti sami ili konjugirano s ostalim spojevima, kao što su terapijski spojevi.

Farmaceutski oblici pogodni za injektiranje uključuju sterilne vodene otopine i/ili disperzije; pripravci uključuju sezamovo ulje, kikirikijevo ulje i/ili vodeni propilen glikol; i/ili sterilne praške za nepripremljeni pripravak sterilne injektibilne otopine i/ili disperzije. U svim slučajevima oblik mora biti sterilan i/ili mora biti tekući tako da se lako uvuče u špricu. Mora biti stabilan pod uvjetima proizvodnje i/ili skladištenja i/ili mora biti konzerviran protiv zagađenja mikroorganizmima, kao što su bakterije i/ili gljivice.

Otopine aktivnih komponenata kao slobodne baze i/ili farmakološki prihvatljivih soli se mogu pripremiti u vodi pogodno pomiješanoj sa površinski aktivnom tvari, kao što je hidroksipropilceluloza. Disperzije se također mogu pripremiti u glicerolu, tekućim polietilen glikolima, ili njihovim smjesama i/ili u uljima. Pod uobičajenim uvjetima skladištenje i/ili uporabe, ovi pripravci sadrže konzervansi radi sprječavanja rasta mikroorganizama.

Konjugat sadašnjeg izuma može biti pripremljen u smjesu u neutralnom obliku i/ili kao sol. Farmaceutski prihvatljive soli uključuju kiselinske adicijske soli ( nastale sa slobodnim amino skupinama proteina) i/ili koje su nastale s anorganskim solima kao što su, na primjer, kloridna i/ili fosforna kiselina, i/ili takve organske kiseline kao što su octena, oksalna, vinska, bademova i/ili slične. Soli nastale sa slobodnim karboksilnim skupinama se također mogu dobiti iz anorganskih baza kao što su, na primjer, natrijev, kalijev, amonijev, kalcijev i/ili željezo hidroksid, i/ili takvih organskih baza kao što su izopropilamin, trimetilamin, histidin, prokain i/ili slične. U uvjetima korištenja peptidnih terapeutika kao aktivnih sastojaka, mogu se koristiti tehnologije U.S. patenata 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792 i/ili 4,578,770, svaki od njih je uključen ovdje pozivanjem na njega.

Nosač također može biti otapalo i/ili disperzijski medij koji sadržava, na primjer, vodu, etanol, poliol (na primjer, glicerol, propilen glikol i/ili tekući polietilen glikol i/ili slično), njihove pogodne mješavine i/ili biljna ulja. Odgovarajuća žitkost se može održavati, na primjer, korištenjem prevlakača, kao što je lecitin, održavanjem tražene veličine čestice u slučaju disperzije i/ili korištenjem površinski aktivnih tvari. Sprječavanje djelovanja mikroorganizama se može postići različitim antibakterijskim i/ili antigljivičnim sredstvima, na primjer, parabenima, klorbutanolom, fenolom, sorbičnom kiselinom, timerosalom i/ili sličnim. U mnogo slučajeva će biti poželjno uključiti izotonična sredstva, na primjer, šećere i/ili natrijev klorid. Produžena apsorpcija injektibilnih pripravaka se može dobiti korištenjem u pripravcima sredstava koja odgađaju apsorpciju, na primjer, aluminij monostearat i/ili želatina.

Sterilne injektivne otopine su pripravljene ugrađivanjem aktivnih spojeva u traženoj količini u odgovarajuće otapalo s raznim drugim sastojcima nabrojanim gore, kako se traži, nakon čega slijedi sterilizacija filtriranjem. Općenito, disperzije su pripravljene ugrađivanjem raznih steriliziranih aktivnih sastojaka u sterilno sredstvo koje sadrži temeljni disperzijski medij i/ili tražene ostale sastojke od onih nabrojanih gore. U slučaju sterilnih prašaka za pripremu sterilnih injektibilnih otopina, poželjni načini pripreme su sušenje u vakuumu i/ili liofilizacija koja daje prah aktivnog sastojka i bilo koji dodatni sastojak od njihovih prije sterilno filtriranih otopina. Također je razmatrana priprema više i/ili visoko koncentriranih otopina za izravno injektiranje, gdje je uporaba DMSO kao otapala vidljivo rezultirala u krajnje brzom prodiranju, isporučujući visoku koncentraciju aktivnih sredstava na malu površinu.

Nakon pripreme će se otopine davati na način kompatibilan s dozom pripravka i/ili u takvoj količini koja je terapijski učinkovita. Pripravci su lako davani u različitim oblicima doza, kao što su vrste injektibilnih otopina opisanih gore, ali se također mogu primijeniti i kapsule koje otpuštaju lijek i/ili slično.

Za parenteralno davanje u vodenoj otopini, na primjer, otopina treba biti pogodno puferirana ukoliko je neophodno i/ili razrijeđenoj tekućini prvo zadržati izotoničnost s dovoljno zasićene otopine soli i/ili glukoze. Ove posebne vodene otopine su osobito pogodne za davanje u venu, u mišić, potkožno i/ili u trbuh. Povezano s tim, sterilni vodeni medij koji se može primijeniti bit će poznat onima iskusnim u području u svjetlu sadašnjeg otkrića. Na primjer, jedna doza može biti otopljena u 1 mL izotonične NaCl otopine i/ili dodana u 1000 mL u hipodermoklzične tekućine i/ili injektirana na predloženo mjesto infuzije (vidi na primjer, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15. izdanje, str. 1035-1038 i/ili 1570-1580). Neke inačice u doziranju će se neophodno pojaviti ovisno o stanju subjekta koji se tretira. Osoba odgovorna za davanje će, u svakom slučaju, odrediti odgovarajuću dozu za pojedinca.

Aktivni konjugat i/ili sredstva mogu se pripraviti unutar terapijske smjese da obuhvaćaju oko 0,0001 do 1,0 miligrama i/ili oko 0,001 do 0,1 miligrama i/ili oko 0,1 do 1,0 i/ili čak oko 10 miligrama po dozi i/ili tako. Mogu se također davati umnožene doze.

Dodatno spojevima pripremljenim za izvorno davanje, kao što je injektiranje u venu, u zglobov i/ili u mišić, ostali farmaceutski prihvatljivi oblici uključuju, na primjer tablete i/ili ostale krutine za davanje kroz usta; liposomalne pripravke; kapsule koje s vremenom otpuštaju i/ili bilo koji oblik trenutno u uporabi, uključujući kreme.

Netko također može koristiti nazalne otopine i/ili raspršivače, aerosole i/ili inhalatore u sadašnjem izumu. Nazalne otopine su obično vodene otopine predviđene za davanje kroz nazalne prolaze u kapljicama i/ili raspršivačima. Nazalne otopine su pripravljene tako da su slične u mnogim pogledima nazalnim izlučevinama, tako da se održava normalno cilijarno djelovanje. Stoga su vodene nazalne otopine obično izotonične i/ili lagano puferirane radi održavanja pH od 5,5 do 6,5. Dodatno se u pripravak mogu uključiti antimikrobijski konzervansi, slični onima koji se koriste u očnim

pripravcima i/ili odgovarajući stabilizatori lijekova, ukoliko se traži. Poznati su različiti trgovački nazalni pripravci i/ili uključuju, na primjer, antibiotike i/ili antihistamine i/ili se koriste za profilaksu astme.

5 Dodatni pripravci koji su pogodni za druge načine davanja uključuju vaginalne supozitorije (čepiće) i/ili pesare. Također se mogu koristiti rektalni pesari i/ili čepići. Čepići su kruti oblici doze različitih težina i/ili oblika, obično namjenjeni za umetanje u rektum, vaginu i/ili mokraćni kanal. Nakon ulaganja, čepići omekšaju, rastope se i/ili otope u tekućinama otvora. Općenito, za čepiće, tradicionalna veziva i/ii nosači mogu uključiti, na primjer, polialkilen glikole i/ili trigliceride; takvi čepići se mogu načiniti iz mješavina koje sadrže aktivni sastojak u rasponu od 0,5% do 10%, poželjno 1%-2%.

10 Oralni pripravci uključuju takve normalno korištene dodatke kao što su, na primjer, farmaceutski stupnjevi manitola, laktoze, škroba, magnezijevog stearata, natrijevog saharina, celuloze, magnezijevog karbonata i/ili slično. Ove smjese uzimaju oblik otopina, suspenzija, tableta, pilula, kapsula, pripravaka sa zadržanim otpuštanjem i/ili praškove. U nekim određenim izvedbama, oralne farmaceutske smjese će obuhvaćati neki inertni razrjeđivač i/ili asimilirajući nosač  
15 pogodan za jelo i/ili one mogu biti zatvorene u čvrste i/ili mekane kapsule želatine i/ili mogu biti stlačene u tablete i/ili mogu biti izravno ugrađene s hranom u prehrani. Za oralno terapijsko davanje, aktivni spojevi mogu biti ugrađeni s dodacima i/ili korišteni u obliku probavljivih tableta, tableta za usta, pastila, kapsula, eliksira, suspenzija, sirupa, hostija i/ili slično. Takve smjese i/ili pripravci trebaju sadržavati najmanje 0,1% aktivnog spoja. Postotak smjese i/ili pripravaka može, naravno, odstupati i/ili može uobičajeno biti između oko 2 do oko 75% težine jedinice i/ili poželjno između 25-  
20 60%. Količina aktivnih spojeva u takvim terapijski korisnim smjesama je takva da će se dobiti pogodna doza.

Tablete, pastile, pilule, kapsule i/ili slično također mogu sadržavati: vezivo, kao guma tragakant, akacija, kukuruzni škrob i/ili želatina; dodatke, kao što je dikalcijev fosfat; sredstvo za raspadanje, kao što je kukuruzni škrob, krumpirov škrob, alginska kiselina i/ili slično; podmazivač, kao što je magnezijev stearat i/ili sredstvo za slađenje, kao što je saharoza, laktoza i/ili saharin mogu se dodati i/ili sredstvo za aromu, kao što je pepermint, ulje zimzelena i/ili aromu po  
25 višnji. Kada je oblik jedinične doze kapsula, ona može sadržavati, dodatno tvarima gornje vrste, tekući nosač. Različiti drugi materijali mogu biti nazočni kao prevlakači i/ili drugačije modificirani fizikalni oblik jedinične doze. Na primjer, tablete, pilule i/ili kapsule mogu biti prevučene sa šelakom, šećerom i/ili s oboje. Sirup eliksira može sadržavati aktivne spojeve kao što je saharoza kao sladilo, metil i/ili propilparabene kao konzervative, boju i/ili aromu, kao što je aroma  
30 višnje ili naranče.

U nekim izvedbama je razmatrana uporaba lipidnih pripravaka i/ili nanokapsula za uvođenje konjugata i/ili sredstava, i/ili vektora genske terapije, uključujući oba, i divlju vrstu i/ili antisens vektore, u stanice domaćina.

35 Nanokapsule mogu općenito uhvatiti spojeve na stabilan i/ili reproducibilan način. Radi sprječavanja pokrajnjih učinaka zbog intracelularnog polimernog prepunjenja, takve ultrafine čestice (veličine oko 0,1  $\mu\text{m}$ ) bi trebale biti načinjene korištenjem polimera sposobnog da se raspadne in vivo. Bioraspadajuće polialkil-cijanoakrilatne nanočestice koje zadovoljavaju ove zahtjeva su razmatrane za uporabu u sadašnjem izumu, i/ili takve se čestice mogu lako načiniti.

40 U nekoj izvedbi izuma, konjugat može biti povezan s lipidom. Konjugat povezan s lipidom može biti kapsuliran u vodenoj unutrašnjosti liposoma, razasut unutar lipidnog dvosloja liposoma, prikvačen na liposom peko vezajuće molekule koja je povezana s oboje, i liposomom i oligonukleotidom, uhvaćen u liposom, kompleksiran s liposomom, disperziran u otopini koja sadrži lipid, smještan skupa s lipidom, kombiniran s lipidom, sadržan kao suspenzija u lipidu, sadržan ili kompleksiran s micelom, ili na drugi način povezan s lipidom. Lipid ili lipid/konjugat povezane smjese  
45 sadašnjeg izuma nisu ograničene na bilo koju pojedinačnu strukturu u otopini. Na primjer, oni mogu biti nazočni u dvoslojnoj strukturi, kao što su micelle, ili s urušenom strukturom. Oni također mogu jednostavno biti razasuti u otopini, moguće oblikovati agregate koji nisu jednoliki bilo po veličini, bilo po obliku.

Lipidi su masne tvari koje mogu prirodni ili sintetski lipidi. Na primjer, lipidi uključuju masne kapljice koje se prirodno  
50 pojavljuju u citoplazmi isto tako kao i klasa spojeva koji su dobro poznati onima iskusnim u području, koji sadrže alifatske ugljikovodike i njihove derivate, kao što su masne kiseline, alkoholi, amini, amino alkoholi i aldehidi.

Fosfolipidi se mogu koristiti za pripremu liposoma prema sadašnjem izumu i mogu nositi pozitivni, negativni ili neutralni naboj. Diacetil fosfat se može koristiti da doprinese negativnom naboju na liposomima, a stearilamin se može koristiti da  
55 doprinese pozitivnog naboja na liposomima. Liposomi mogu biti načinjeni od jednog ili više fosfolipida.

Neutralno nabijeni lipidi mogu obuhvatiti lipid bez naboja, bitno nenabijeni lipid, ili smjesu lipida s jednakim brojem pozitivnih i negativnih naboja. Pogodni fosfolipidi uključuju fosfatidil koline i ostale koji su dobro poznati onima  
60 iskusnim u području.

Lipidi koji su pogodni za korištenje prema sadašnjem izumu mogu se dobiti iz trgovačkih izvora. Na primjer, dimiristol fosfatidilkolin ("DMPC") se može dobiti od Sigma Chemical Co., diacetil fosfat ("DCP") je dobiven iz K & K Laboratories (Plainview, NY); kolesterol ("Chol") je dobiven od Calbiochem-Behring; dimiristol fosfatidilglicerol ("DMPG") i ostali lipidi se mogu dobiti od Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). Standardna otopina lipida u kloroformu ili kloroform/metanolu se može skladištiti kod oko -20°C. Poželjno, kloroform se koristi kao jedino otapalo jer se puno lakše uparava od metanola.

Fosfolipidi iz prirodnih izvora, kao što su fosfatidilkolin iz jaja ili soje, fosfatidna kiselina iz mozga, fosfatidilinosite iz mozga ili biljke, kardiolipin iz srca i biljni ili bakterijski fosfatidiletanolamin se poželjno ne koriste kao primarni fosfatidi, to jest, čineći 50% ili više od ukupne fosfatidne smjese, zbog nestabilnosti i curenja rezultirajućih liposoma.

Fosfolipidi mogu oblikovati brojne strukture različite od liposoma kada se dispergiraju u vodi, ovisno o molarnom odnosu lipida prema vodi. Kod niskih odnosa je liposom poželjna struktura. Fizikalne osobine liposoma ovise o pH, ionskoj jakosti i/ili nazočnosti divalentnih kationa. Liposomi mogu pokazivati nisku propusnost prema ionskim i/ili polarnim tvarima, ali kod povišenih temperatura prolaze fazni prijelaz koji značajno mijenja njihovu propusnost. Fazni prijelaz uključuje promjenu od blisko pakiranih, uređenih struktura, poznatih kao stanje gela, do slabo pakirane, manje uređene strukture, poznate kao tekuće stanje. To se pojavljuje kod karakteristične temperature faznog prijelaza i/ili rezultira u povećanju propusnosti prema ionima, šećerima i lijekovima.

Liposomi međusobno djeluju sa stanicama preko četiri različita mehanizma: Endocitozom fagocitiranih stanica retikuloendotelijalnih stanica kao što su makrofagi i/ili neutrofili; apsorpcijom na staničnu površinu, bilo nespecifičnim slabim hidrofobnim i/ili elektrostatskim silama, i/ili specifičnim međudjelovanjima s komponentama površine stanice; fuzijom s plazmom stanične membrane umetanjem lipidnog dvosloja liposoma u plazmatsku membranu, s istovremenim otpuštanjem liposomalnog sadržaja u citoplazmu; i/ili prijenosom liposomalnih lipida u stanične i/ili podstanične membrane, i/ili obrnuto, bez bilo kakve asocijacije sadržaja liposoma. Mijenjajući pripravak liposoma može se promijeniti mehanizam koji djeluje, premda više od jednog može djelovati u isto vrijeme.

S liposomom povezana dostava oligonukleotida i ekspresija strane DNK *in vitro* je bila jako uspješna. Wong i ostali (1980.) su pokazali isplativost s liposomom povezane dostave i ekspresiju strane DNK u uzgojenom pilećem embriju, HeLa i hepatomskim stanicama. Nicolau i ostali (1987.) su postigli uspješnu s liposomom povezan prijelaz gena kod štakora nakon intravenoznog injektiranja.

Kod nekih izvedbi izuma, lipid može biti povezan s hemaglutinirajućim virusom (HVJ). Pokazano je da to olakšava fuziju sa staničnom membranom i promovira stanični ulaz u liposomu kapsulirane DNK (Kaneda i ostali, 1989.). U ostalim izvedbama, lipid može biti kompleksiran ili uključen u konjukciju s nuklearnim ne histonskim kromosomalnim proteinima (HMG-1) (Kato i ostali, 1991.). U još daljim izvedbama, lipid može biti kompleksiran ili uključen u konjukciju s oba i HVJ i HMG-1. U tome takvi vektori ekspresije su uspješno korišteni u prijenosu i ekspresiji oligonukleotida *in vitro* i *in vivo*, tada su oni primjenjivi za sadašnji izum. Kada je uključen bakterijski promotor u DNK konstrukciji, također će biti poželjno uključiti unutar liposoma odgovarajuću bakterijsku polimerazu.

Liposomi korišteni prema sadašnjem izumu mogu se načiniti na različite načine. Veličine liposoma odstupaju ovisno o načinu sinteze. Liposom suspendiran u vodenoj otopini je općenito u obliku sferične čestice, i ima jedan ili više koncentričnih slojeva lipidnih dvoslojnih molekula. Svaki sloj se sastoji od usporednih molekula predstavljenih formulom XY, gdje je X hidrofilna skupina i Y je hidrofobna skupina. U vodenoj suspenziji, koncentrični slojevi su postavljeni tako da hidrofilni dijelovi nastoje ostati u dodiru s vodenim slojem, a hidrofobna područja se nastoje sama povezati. Na primjer, kada je nazočan vodeni dio unutar kao i bez liposoma, lipidne molekule mogu oblikovati dvosloj, poznat kao lamela uređenja XY-YX. Agregati lipida mogu nastati kada hidrofilni i hidrofobni dijelovi više nego jedne lipidne molekule postanu povezani jedni sa drugima. Veličina i oblik ovih agregata će ovisiti o mnogo različitih varijabli, kao što su priroda otapala i nazočnost drugih spojeva u otopini.

Liposomi unutar raspona sadašnjeg izuma se mogu pripremiti u skladu s poznatim laboratorijskim tehnikama. U jednoj poželjnoj izvedbi, liposomi su pripremljeni miješanjem liposomalnih lipida, u otapalu u spremniku, na primjer, staklenoj, kruškolikoj tikvici. Spremnik bi trebao imati zapreminu deset puta veću od zapremine očekivane suspenzije liposoma. Korištenjem rotacijskog uparivača, otapalo je uklonjeno kod približno 40°C uz negativni tlak. Otapalo je normalno uklonjeno unutar oko 5 minuta do 2 sata, ovisno o željenomj zapremini liposoma. Smjesa se može dalje sušiti u eksikatoru pod vakuumom. Osušeni lipidi se općenito bacaju nakon oko 1 tjedan radi sklonosti deterioracije s vremenom.

Sušeni lipidi se mogu hidratirati kod približno 25-50 mM fosfolipida u sterilnoj, apirogenoj vodi treskanjem dok se sav lipidni film ne resuspendira. Vodeni liposomi se tada mogu odijeliti u alikvote, od kojih se svaki smješta u bočicu, liofilizira i začepi uz vakuum.

- 5 U drugom načinu, liposomi se mogu pripremiti u skladu s drugim poznatim laboratorijskim postupcima: način Bangham i ostalih, (1965), čiji načini su ovdje uključeni pozivanjem na njih, način Gregoriadisa, kako je opisan u NOSAČI LIJEKOVA U BIOLOGIJI I MEDICINI, G. Gregoriadis izdavač (1979) str. 287-341, sadržaj kojeg je ovdje uključen pozivanjem na njega; i način uparavanja reverznom fazom kako su opisali Szoka i Papahadjopoulos (1978). Ranije spomenuti načini se razlikuju u njihovim sposobnostima hvatanja vodene tvari i njihovih odnosa vodenih prostora prema lipidu.

10 Sušeni lipidi ili liofilizirani liposomi pripremljeni kako je gore opisano mogu se dehidrirati ili rekonstruirati u otopini inhibitornog peptida i razrijediti na odgovarajuću koncentraciju s pogodnim otapalom, na primjer, DPBS. Miješavina se tada jako treska u vortex mikseru. Nekapsulirane nukleinske kiseline se uklone centrifugiranjem kod 29,000 x g i liposomalni peleti se isperu. Isprani liposomi su ponovno suspendirani kod neke odgovarajuće ukupne koncentracije fosfolipida, na primjer, oko 50-200 mM. Količina kapsuliranih nukleinskih kiselina se može odrediti u skladu sa standardnim načinima. Nakon određivanja količine kapsuliranih nukleinskih kiselina u pripravku liposoma, liposomi se mogu razrijediti do odgovarajuće koncentracije i držati kod 4°C do korištenja.

- 20 Farmaceutski pripravak koji obuhvaća liposome će uobičajeno uključivati sterilni, farmaceutski prihvatljiv nosač ili razrjeđivač, kao što je voda ili zasićena otopina soli.

#### IV PRIMJERI

- 25 **[0136]** Slijedeći primjeri su uključeni da bi pokazali poželjne izvedbe izuma. Netko iskusan u području bi trebao cijeniti što otkrivene tehnike u primjerima koji slijede predstavljaju tehnike otkrivene od izumitelja, koje funkcioniraju dobro u primjeni izuma i stoga se mogu smatrati da čine poželjni način za njegovu primjenu. Međutim, oni iskusni u području, u svjetlu sadašnjeg otkrića, cijene što mnoge promjene mogu biti načinjene u specifičnim izvedbama koje su otkrivene i još dobiti rezultat sličan ili nalik bez udaljavanja od duha i raspona izuma.

30

##### **Primjer 1 Mutagenesa in vitro**

Različite inačice superantigena su načinjene korištenjem načina temeljenog na lančanoj reakciji polimeraze (PCR).

35

- Ukratko, PCR produkti sadržavaju dva jedinstvena mjesta restriktivnog enzima, jedno na svakom kraju. Za postupke podkloniranja je korišten pUC19, (GIBCO BRL Life Technologies, Middlesex, U.K.), pripremljen prema QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol-u (QIAGEN, Hilden, Njemačka). Točkaste mutacije koje ne djeluju na aminokiselinsku sekvencu su bile uključene za olakšavanje daljnjih analiza. PCR reakcija je izvedena na Perkin Elmer Gene Amp PCR sustavu 2400 s Taq DNK polimerazom i odgovarajućim PCR puferom koji je sadržavao 15 mM MgCl<sub>2</sub> (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Švicarska). PCR produkti i vektori su cijepani preko noći s odgovarajućim restriktivnim enzimima. Oni su pročišćeni korištenjem elektroforeze u 1%-tnom agaroznom gelu (GIBCO BRL Life Technologies) koji je sadržavao 0,5 µg/mL etidijum-bromida (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) u TAE puferu (Sigma-Aldrich). Fragment koji je sadržavao DNK je izrezan iz gela i ekstrahiran korištenjem CONSERT™ Rapid Gel Extraction sustava (GIBCO BRL Life Technologies). Vektor i umetak su ligatirani (T4 DNK ligaza, Roche Molecular Biochemicals) kod sobne temperature kroz 3-4 sata. Ligacijska smjesa je transformirana u DH5α lanac *Echerichia coli* (GIBCO BRL Life Technologies), prema priloženim uputstvima, uz stanice. Pozitivni klonovi su potvrđeni korištenjem DNK sekvencioniranja. Ispravne sekvence su skinute s RsrII/HindIII kod 37°C preko noći i ligatirani u ekspresijskom vektoru (Dohlsten i ostali, 1994.). Razni dijelovi Faba su promijenjeni za C215 da pristaju kućnim životinjskim modelima.
- 45
- 50 Konstrukcija je konačno elektroporirana u *Echerichia coli* K12 spoj UL635 (xyl-7, ara-14, T4R, ΔompT).

##### **Primjer 2 Identifikacija humanih anti-SEA vezivajućih područja**

- 55 Područja koja je prepoznao humani anti-SEA su identificirana iz pepsinom obrađenog SEA ili kimeričnom inačicom SEA ili SEE, SEA/E-18, ranije opisanom kao SEE/A-A (Antonsson i ostali, 1997.) sa supstitucijom D227A.

Svaki superantigen je inkubiran s 0,5%-tnim pepsinom 10 mM HCl, 150 mM NaCl (težinski) kroz 60 minuta kod 37°C. Peptidna smjesa je neutralizirana s 2M Tris-HCl pH 8,0 i nanešena na 1 mL HiTrap stupac (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska) s imobiliziranom ljudskom SEA. PBS, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl,

60



2,7 mM KCl, pH 7,3 su korišteni kao pufer za ispiranje i fragmenti koji vežu antitijela su eluirani korištenjem 0,1 M octene kiseline pH 3,0. Fragmenti su identificirani i prije i nakon pročišćavanja s HPLC povezanim s masenim spektrometru (MS) (Sl. 1). Kromatografija je provedena na C18 stupcu (2 x 250 mm) (VYDAC™, Hesperia, California, USA) korištenjem linearnog gradijenta od 10 do 60% acetonitrila u 0,1%-tnoj trifluorocetnoj kiselini kroz 30 minuta kod 40°C. Masena detekcija je provedena korištenjem MS (Finnigan LCQ, Termoquest, San Jose, California, USA). Fragmenti nađeni u enzimskom hidrolizatu kod istog retencijskog vremena i prije i nakon afinitetnog pročišćavanja su se smatrali pozitivnima (Sl. 2).

### Primjer 3

#### Molekulsko modeliranje

Kimerični superantigen SEA/E-18 je temeljen na SEE sekvenci osim za četiri aminokiselinska ostatka blizu N-kraja koje su bile od SEA i supstituciju u dijelu D227A C-kraja (Sl. 3 i Sl. 4)(Antonsson i ostali, 1997.).

Ukratko, trodimenzionalne strukture superantigena s mnogo višom identičnošću sekvence prema SEE koje su bile dostupne od PBD, su korištene kao templat za konstrukciju homolognog modela SEAE-18, to jest, SEA (1ESF, Shard i ostali, 1SXT, Sundstrom i ostali, 1996. A), SED (Sundstrom i ostali, 1996. B) i SEH (1ENF) (Hakansson i ostali, 2000.). SEA je bila najsljednija prema SEE sa identičnošću sekvence od 80%. SED je imala identičnost sekvence od 60% i SEH 50% prema SEE.

Konstrukcija modela je provedena korištenjem HOMOLOGNY modula i INSIGHTII softveru (MSI, San Diego). Strukture za tri superantigena SEA, SED i SEH su poravnate i određena su strukturno konzervirana područja (SCRs) (Sl. 3). Ova područja su tipično ucrtana u regularnoj sekundarnoj strukturi u molekulama. Sirova sekvenca za SEA/E-18 je upisana i proučen preko SCR od strukture SEA (Sl. 5) 1SXT koordinate za SEA su bile korištene osim za prvih devet ostataka na N-kraju gdje je korišten 1ESF. Područja između SCR su bila u najvećem broju slučajeva područja fleksibilne petlje i bile su ugrađene od SEA i SED. Najveći broj petlji su izgrađene od SEA osim za ostatke Gln19, Ile140, Asp141, Lys142, Ser189, Gly191, Asp200, Pro206, Asp207 i Leu224, koje su ugrađene od SED. Neke površine unutar SCR su pokazale veću sličnost sekvenci sa SED i stoga su bile ugrađene korištenjem SED kao strukturalnog templata (Ile37, Glu49, Asn50, Thr51, Leu52, Ser195 i Thr218)(Sl. 3).

Zahvaljujući činjenici da je SEA korišten kao strukturalni templat za većinu ostataka u SEA/E-18, nisu se pojavili problemi vezani s preklapanjem pokrajnjih lanaca. Povezne točke prije i poslije SCR su popravljene. Najprije su supstituirani pokrajnji lanci relaksirani i tada su minimalizacijom energija i molekularno dinamičkom simulacijom relaksirani svi pokrajnji lanci unutar SCR korištenjem standardnih protokola u HOMOLOGNY. Područja petlji su relaksirana jedna po jedna koristeći prvih 1000 stupnjeva minimalizacije energije nakon čega slijedi 1000 stupnjeva molekularne dinamike. Ovaj oplemenjeni protokol je primjenjen prvo na petlju pokrajnjih lanaca i tada na sve atome u petlji. Za sve simulacije je korišteno CVFF polje sile s konstantom sile od 100 kcal/Å<sup>2</sup> uporabom vremenskog razmaka od 2 fs.

Konačni model je testiran na loša područja korištenjem PROSTAT modula u INSIGHTII. Nisu otkrivena loša područja. Unutrašnjost proteina je pakirana u redu bez značajne razlike u usporedbi sa SEA. Svi ostaci su bili u dozvoljenim područjima u ramachandran dijagramu. Preklapanje 1SXT s modelom je rezultiralo s RMSD od 0,4Å kada su uspoređeni C $\alpha$  atomi. Glavna razlika između dviju struktura je viđena u petlji  $\beta$ 9- $\beta$ 10 (ostaci His187-Thr193)(Sl. 5).

Novi modeli novih inačica superantigena su konstruirani korištenjem SEA/E-18 modela kao templata. Specifični aminokiselinski ostaci su izmjenjeni izravno na modelu. Najpoželjnija konformacija pokrajnog lanca je odabrana korištenjem jednostavnim pretraživanjem steričke smetnje i nakon toga kratkom minimizacijom energije.

### Primjer 4

#### Uzgajanje i pročišćavanje

C215FabSEA/E kimere su ekspresirane kao fuzijski proteini u *E. coli* K12 lancu UL635 korištenjem plazmida s IPTG induciranim Lac UV-5 promotorom i genom otpornim na kanamicin.

Ukratko, bakterije iz smrznutih (-70°C) prethodno pripremljenih, 20%-tnih otopina u glicerolu su inkubirane kod 25°C kroz 22-24 sata u tikvici za trešenje koja je sadržavala (po litri) 2,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g natrijevog citrata, 1 g MgSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,05 g kanamicina, 12 g glukoza monohidrata i 1 mL otopine elemenata u tragovima, međutim bez Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O. Stanice su rasle do Abs<sub>620</sub> 2-3 i 10 mL uzgojnog medija je korišteno za inokulaciju fermentera od 1 L (Belach Bioteknik, Švedska) s početnom zapreminom od 800 mL. Medij u fermentoru je sadržavao (po litri) 2,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 9 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g natrijevog citrata, 1 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,05 g

kanamicina, 23,1 g glukoza monohidrata i 1 mL otopine elemenata u tragovima kao gore. pH je držan stalnim kod 7,0 titiranjem s 25%-tnim  $\text{NH}_3$ , aeracija je bila 1 litra/minuti i temperatura 25°C. Tijekom šaržne faze otopljeni  $\text{O}_2$  je održavan kod 30% reguliranjem okretanja od 400 okretaja u minuti do 2000 okretaja u minuti i tijekom šarže dodavanja reguliranjem dodavanja glukoze (60% težine/zapremnini). Nastajanje produkta je inducirano kada je Apsorbancija kod  
5 620 nm bila 45 dodavanjem 0,1 mM izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozida (IPTG). Nakon fermentacije su stanice uklonjene centrifugiranjem kod -20°C prije pročišćavanja.

Postupak pročišćavanja je podijeljen u tri stupnja. Prvo je uklonjena DNK iz supernatanta uzgoja s 0,19%-tnim polietileniminom (težinski/zapremnina) u 0,2 M NaCl, pH 7,4, korištenjem peristaltičke crpke s brzinom protoka od 12  
10 mL/minuti. Nakon centrifugiranja kod 7500 x g kroz 30 minuta, supernatant je ohlađen.

Nanešen je na 60 mL protein-G Sepharose 4, stupac s brzim protokom (Amersham Pharmacia Biotech) s brzinom protoka od 14 mL/minuti. Stupac je ispran korištenjem PBS i eluiranje je provedeno s 100 mM octenom kiselinom, 0,025% Tween 20, pH 3,0. Eluirani produkt je skupljen i pH je podešen na 1,5 jedinica ispod teorijske izoelektrične  
15 točke s 1 M NaOH, filtriran (0,2  $\mu\text{m}$ ) i razrijeđen četiri puta s 0,025%-tnim Tween 20. Raspadnute inačice su uklonjene korištenjem ionsko-izmjenjivačke kromatografije. Ionska jakost uzorka je podešena na 2 mS/cm i korišteni stupac je bio SP-Sepharose-HP, Hiloal 16/10 (Amersham Pharmacia Biotech). Eluiranje je provedeno s protokom 4,0 mL/minuti kroz 50 minuta korištenjem linearnog gradijenta od 0-55% pufera B, 100 mM NaAc, 400 mM NaCl, 0,025% Tween 20, pH 5,0 u puferu A, 10 mM NaAc, 0,025% Tween 20, pH 5,0.  
20

### **Primjer 5 Seroreaktivnost**

Reaktivnost između inačica superantigena i humanog anti-SEA je izmjerena u scintilacijskom testu srodstva (engl. Scintillation Proximity Assay) (SPA).  
25

U mikrotitarskoj ploči (OptiPlate, Packard Instruments) su inkubirane streptavidinom prevučena PVT zrnca, 150  $\mu\text{g}$  zrnaca/jažici (Amersham Pharmacia Biotech) sa biotin konjugiranim  $\text{F(ab)}_2$  fragmentima anti-mišjeg IgG, 3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  zrnaca kroz 30 minuta kod sobne temperature. Zrnca su predinkubirana s C215Fab konjugiranim superantigenima u 1:2  
30 razrijeđenoj seriji, gdje je najveća konačna koncentracija u jažicama bila 40 nM. Konačno su inkubirani s 1 nM 125I konjugiranim, afinitetno pročišćenim, humanim anti-SEA antitijelima i količina  $\square$ -scintilacije je izmjerena u Top-Counteru (Packard Instruments).

Reaktivnost humane anti-SEA za inačice superantigena je također izmjerena u enzim-povezanom imunosorbentskom testu, ELISA (Cavallin i ostali, 2000.). Rezultati su bili slični onima dobivenima u SPA.  
35

### **Primjer 6 Biološka funkcija**

Sposobnost induciranja o superantigen antitijelu ovisne stanične citotoksičnosti, SADCC i o superantigen ovisne o stanične citotoksičnosti, SDCC je uspoređen u standardnom 4h  $^{51}\text{Cr}$ -oslobađajućim testom.  
40

Ukratko, ciljevi koji su korišteni za SDCC su bile humane B-stanice limfoma Raji stanice i ciljevi za SADCC su bile humane stanice karcinoma debelog crijeva Colo205. Stanice su označene s  $^{51}\text{Cr}$  i razrijeđene na koncentraciju od 50000 stanica/mL u mikrotitarske jažice V-oblika. Kao efektorske stanice je korištena SEA reaktivna humana T-stanična linija kod nekog efektora prema omjeru ciljanja od 45:1 za SADCC i 30:1 za SDCC. Sag inačice su dodane u koncentraciji od  $10^{-9}$  –  $10^{-16}$  M za SADCC i od  $10^{-7}$  –  $10^{-14}$  M za SDCC. Supernatanti su skupljeni i oslobođeni od  $^{51}\text{Cr}$  je izmjeren u TopCount-u (Packard Instruments). Postotak specifične citotoksičnosti je izračunat kao  $100 \times [(\text{cpm eksperimentalno oslobađanje} - \text{cpm pozadinsko oslobađanje})/(\text{cpm ukupno oslobađanje} - \text{cpm pozadinsko oslobađanje})]$ .  
45  
50

### **Primjer 7 Identifikacija epitopa antitijela**

Kod pacijenata, ranije postojeća tijela prema superantigenima s zakomplicirala njihovu kliničku primjenu, zahtjevajući podešavanje njihovog doziranja u terapiji (Alpaugh i ostali, 1998.). Drugi pristup ograničenja utjecaja ranije nastalih antitijela je bio modificirati područje superantigena odgovornog za vezivanje T-staničnog receptora (Antonsson i ostali, 1997.). Međutim, sadašnji izum je dalje poboljšao terapijske mogućnosti superantigena korištenjem genetskog inženjeringa za uklanjanje epitopa antitijela superantigena.  
55

Nađeno je da SEE pokazuje jako smanjenje reaktivnosti antitijela u usporedbi prema SEA (Antonsson i ostali, 1997.). Na nesreću, s ovim smanjenjem je bilo i značajno smanjenje svojstva ubijanja tumora kada se spoji na tumor reaktivni Fab (Antonsson i ostali, 1997.). Stoga su proučene kimerične konstrukcije SEA i SEE. Kada su se uvodile odgovarajuće aminokiseline iz SEA u četiri položaja u TCR-vezujućem području SEE, dobivene su željene osobine. Ove supstitucije; Arg20Gly, Asn21Thr, Ser42Gly i Arg27Lys (područje A) kod SEE, rezultiralo je u kimeri SEA/E-18 (Sl. 4) (Antonsson i ostali, 1997.). Ova kimer je pokazivala više od 50% smanjenja reaktivnosti antitijela, kao kod SEE, dok je zadržavala djelotvornu razinu citotoksičnosti, kao kod SEA. Dodatno, radi smanjenja afiniteta između superantigena i MHC klase II, koja smanjuje SDCC i stoga poboljšava terapijski prozor, SEA/E-18 također sadrži supstituciju Asp227Ala (Abrahmsén i ostali, 1995.).

Za daljnje smanjenje sposobnosti humanog anti-SEA da prepozna SEA/E-18, određena su antitijela koja vežu epitope unutar superantigena. Peptidni fragmenti od djelomičnog pepsinskog hidrolizata bilo SEAwt ili SEA/E-18 su uhvaćeni korištenjem imobiliziranih anti-SEA antitijela. Nakon pročišćavanja, peptidna sekvenca je identificirana korištenjem LC-MS (Sl. 1). Stoga su moguća područja uključena u prepoznavanje antitijela lokalizirana u aminokiselinskoj sekvenci. Za zabilježiti je da je većina izoliranih peptida bila smještena oko područja poznatih da međudjeluju s MHC klasom II (Abrahmsén i ostali, 1995.) (Sl. 2 i Sl. 6). Trodimenzionalna struktura SEA (Schad i ostali, 1995.; Sundström i ostali, 1996.) i kompjutorski model SEA/E-18 (Sl. 5), temeljena na kristalnoj strukturi SEA (Schad i ostali, 1995.; Sundström i ostali, 1996. A) je korištena za lociranje na površinu izloženih ostataka unutar identificiranih peptida. Slijedeći ostaci su identificirani kao izloženi i mogući kandidati za epitope koji vežu antitijela: Glu34, Lys35, Glu39, Asn40, Lys41, Glu42, Asp44, Asp45, Glu 49, Lys74, Asp75, Asn78, Lys79, Lys81, Lys83, Lys84, Asp173, His187, Ser189, Glu190, Gln204, Lys217, Asn220, Glu222, Asn223, His225 i Asp227 (Tablica 1).

Ovi ostaci su nakon toga supstituirani da smanje vezanje na antitijela. Novi računalni modeli s daljnjim poboljšanjem Sag inačica su neprekidno rađeni da potvrde i usporede tražene rezultate s novijim. Specifični utjecaj pokrajnjih lanaca je proučavan i identificirane su promjene koje djeluju na stabilnost proteina.

### **Primjer 8 Modifikacija superantigena radi smanjenja seroreaktivnosti**

Razine vezanja antitijela identificiranih ostataka su početno karakterizirane s dvije do šest istovremenih supstitucija kod SEA/E-18. Stoga su dobivene Sag inačice SEA/E-62 (Lys217Thr, Asn220Ala, Glu222Thr, Asn223Ala, His225Ala) (područje E), SEA/E-63 (Ser189Asp, Glu190Ala) (područje D), SEA/E-64 (Glu34Lys, Glu35Lys, Glu39Lys, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys) (područje B), SEA/E-65 (Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Glu, Lys84Glu) (područje C), SEA/E-74 (Asp44Ala, Asp45Ala, Glu49Thr) (područje B) i SEA/E-75 (Lys74Thr, Asp75Ala, Asn78Ser) (područje C) (Tablica 1, Sl. 4).

Razvijen je scintilacijski test srodstva (SPA) za istraživanje da li anti-SEA antitijela iz humane IgG rezerve (izvora) mogu prepoznati različite Sag inačice. Modificirane inačice su sve prepoznate u manjem obimu u usporedbi prema SEA/E-18 (Tablica 1). Najbitnije smanjenje u vezivanju je uzrokovano supstitucijama načinjenim u SEA/E-65. U SPA analizi je opaženo smanjenje od više od 40% (Sl. 7). Međutim, mnoge zamjene također generiraju smanjenje u razini produkcije *E. coli* i dodatno, biološka aktivnost je isto tako povremeno smanjena. Pregledavanjem zamjena mi možemo identificirati odgovorne ostatke unutar svake inačice i isključiti ih ili modificirati da bi dobili bolja svojstva. Općenito, razina produkcije je povećana hidrofobnim zamjenama u usporedbi s onima više hidrofobnim.

Smanjenje vezanja antitijela je sinergistički povećano kada su inačice kombinirane, kao kod SEA/E-91 koju čini SEA/E-63, SEA/E-65 i modificirani SEA/E-74 (s divljom vrstom Asp45) (Tablica 1). Inačica s najboljim rezultatom u SPA analizi sa smanjenjem vezivanja blizu 70% u usporedbi prema SEA/E-18 je bila SEA/E-110, kombinacija SEA/E-63, SEA/E-75 i modificiranog SEA/E-62 (SEA/E-97), SEA/E-64 (SEA/E-108), SEA/E-65 (SEA/E-84) i SEA/E-74 (wt Asp45) (Sl. 7, Tablica 1). Modifikacije odgovorne za najviše smanjenja u vezivanju antitijela su bile unutar SEA/E-109 (Glu34Ser, Glu39Ser, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys, Asp44Ala, Glu49Thr, Lys74Thr, Asp75Ala, Asn78Ser, Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Ser, Lys84Ser) kombinacije SEA/E-75 i modificirane SEA/E-64 (SEA/E-108), SEA/E-65 (SEA/E-84) i SEA/E-74 (wt Asp45). To je zbog toga što inačice superantigena koje sadrže ove supstitucije, sve pokazuju dobro smanjenje u SPA analizi.

Stoga su ostaci supstituirani u SEA/E-62, SEA/E-64, SEA/E-65 i SEA/E-74 rezultirali u između 20 i 40% smanjenja vezivanja antitijela u usporedbi s SEA/E-18 (Tablica 1).

### **Primjer 9 Zamjene koje utječu na razine produkcije**

Kako je naznačeno gore, neke od supstitucija na površini superantigena su rezultirale u smanjenju razina produkcije kod *E. coli*. Mnoge kombinacije takvih zamjena nije čak bilo moguće proizvesti. Stoga je odlučeno istražiti alternativne modifikacije onih ostataka koji očito uzrokuju smanjenje u iskorištenju. Supstitucije koje djeluju na iskorištenje bez smanjenja vezivanja na antitijela nisu dalje istraživane. Umjesto toga su korišteni ostaci divlje vrste.

5 U početnom paketu inačica superantigena, ostatak Lys35 u SEA/E-64 je djelovao na razinu ekspresije negativno. Kada se koristio ostatak divlje vrste na položaju 35 skupa sa serinskim supstitucijama Glu34 i Glu39, koji je rezultirao u SAg inačici SEA/E-108, nađeno je povećanje u iskorištenju od 23 mg/L na 30 mg/L. Smanjenje reaktivnosti antitijela je međutim zadržano. Kada su se uvodile supstitucije glutaminske kiseline ostataka Lys79, Lys81, Lys83 i Lys84 u SEA/E-10  
65, to je rezultiralo u razini produkcije od samo 1,5 mg/L. Radi činjenice što je učinak kod reaktivnosti antitijela smanjen s 43% u usporedbi prema SEA/E-18, načinjen je napor za identifikacijom boljih zamjena. Najbolja kombinacija, s obzirom i na iskorištenje i na smanjenu reaktivnost antitijela, koja je nađena je bila SEA/E-84 sa serinskim ostacima na položaju 83 i 84 i sačuvanom glutaminskom kiselinom na položaju 79 i 81 (Tablica 1). Razina produkcije je povećana deset puta i reaktivnost antitijela je smanjena s 41% u usporedbi prema SEA/E-18 (Tablica 1).  
15 Razina produkcije je također smanjena više od deset puta sa zamjenama Lys217Thr, Asn220Ala, Glu222Thr, Asn223Ala, His225Ala i Asp227Ala u SEA/E-62, na 0,1 mg/L. Međutim, zamjenjujući alaninske supstitucije za serinske ostatke, rezultirajući u SEA/E-97, dobiveno je iskorištenje produkcije od 48 mg/L (Tablica 1).

Zanimljivo, kada se kombinira SEA/E-65 s više inačica, kao što su SEA/E-63 i modificiran SEA/E-74, kao kod SEA/E-91, niska razina produkcije je preokrenuta na 12 mg/L (Tablica 1). U drugu ruku postoji samo razina ekspresije inačice superantigena SEA/E-110 od 0,5 mg/L, odnosno 14 mg/L. Razina produkcije SEA/E-110 je međutim povećana na 30 mg/L kada su se uklonile supstitucije Asp174Ala, His87Ala, Ser188Thr, Ser189Asp, Glu190Ala i Gln 204Thr stvarajući SEA/E-120 (Tablica 1).

25 Uvođenje velikog broja supstitucija unutar superantigena može dovesti do problema s ekspresijom *E. coli*. Postoje najmanje tri različita mehanizma za to; smanjena termodinamičnost, uništen prirodni ciklus savijanja ili novo uvedena proteolitička mjesta. Premda je cilj ovog proučavanja bio ukloniti antigenske epitope na površini, koji najvjerojatnije ne bi interferirali s bilo kojom strukturalnom okosnicom, postoji uvijek mogućnost da su nove strukture bile ovisne o drugim ostacima osim konstrukcije divlje vrste, za zadržavanje njihove stabilnosti. Stoga su novi računalni modeli stalno rađeni radi predviđanja ili potvrđivanja lokacije supstituiranih ostataka unutar nove strukture. Na taj način možemo  
30 identificirati odgovorne ostatke unutar ranih inačica superantigena koji uzrokuju probleme s, na primjer, razinama ekspresije i dobiti poboljšane inačice bilo s ostacima divlje vrste ili boljim supstitucijama (Tablica 1).

U zaključku, radi dovršenja bolje razine produkcije, slijedeći ostaci, Lys83, Lys84, Asn220, Asn223, His225 i Asp227, bi trebali biti supstituirani u serin, ne alanin. Dodatno, radi sprječavanja smanjenja u razinama ekspresije, ostaci Lys35, Asp173, His 187, Ser188, Ser189, Glu190 i Gln204 bi trebali biti sačuvani.

## Primjer 10

### Evaluacija biološke funkcije unutar različitih Sac inačica

40 Zbog toga što su superantigeni primarno bili određeni za terapiju tumora (Dohlsten i ostali, 1994.), bilo je važno spriječiti zamjene koje smanjuju na tumor usmjerenu citotoksičnost unutar novih inačica superantigena. Sposobnost utjecanja na tumor usmjerene citotoksičnosti je stoga bila mjerena za sve nove inačice superantigena SADCC testom (Sl. 3). Dodatno, učinkovitost superantigena da posreduju ubijanje T stanicama MHC klase II ekspresirajućih stanica je  
45 rezultiralo u sustavnoj citotoksičnosti koja može uzrokovati pokrajnje učinke mjerene u SDCC testu (Sl. 3). Za kliničku uporabu SDCC bi morao biti nizak da poveća terapijski prozor.

Većina od početnog paketa SAg inačica ima istu razinu specifične citotoksične potencije kao SEA/E-18 (Tablica 1). Iznimke su SEA/E-75 sa zamjenama Lys74Thr, Asp75Ala i Asn78Ser koji je bio smanjen deset puta i SEA/E-64 sa zamjenama Glu34Lys, Lys35Glu, Gly39Lys, Asn40Ser, Lys41Glu i Glu42Lys, koji je smanjen pet puta u usporedbi prema SEA/E-18 (Tablica 1). Zanimljivo, smanjena aktivnost kod SEA/E-75 je opažena samo u ovoj inačici, u kombinaciji s daljnjim supstitucijama, na primjer, u SEA/E-109 detektirana je puna aktivnost (Tablica 1). Dodatno je SDCC aktivnost bila nepromijenjena u SEA/E-75 u usporedbi prema SEA/E-18. Supstitucije Lys74Thr, Asp75Ala i Asn78Ser su stoga vjerojatno poremetile interrekcije važne za samu citotoksičnost ovisnu o antitijelu.

55 SEA/E-ećina inačica superantigena opisanih ovdje je pokazala jasno smanjenje kod SDCC. Slabo smanjenje u SDCC je opaženo za početne inačice SEA/E-62, SEA/E-63, SEA/E-64, SEA/E-65 i SEA/E-74 u usporedbi sa SEA/E-18.

Sve su inačice superantigena sadržavale supstituirani ostatak Asp227Ala ili Ser. Ova supstitucija je bila poznata da smanjuje afinitet prema MHC klase II 100 puta i stoga i SDCC aktivnost (Abrahamsén i ostali, 1995.).

Međutim, zbog toga što je inačica SAg SEA/E-109, s N-terminalnim supstitucijama, pokazala veće smanjenje u usporedbi sa SEA/E-18 nego SEA/E-113, s C-terminalnim supstitucijama, to je ukazivalo da su se unutar SEA/E-109 dodatni ostaci promijenili što je važno za SDCC i najvjerojatnije vezanje na MHC klasu II (Sl. 8).

- 5 Stoga su ostaci koji su uzrokovali najveće smanjenje bili Lys79Ser i Lys81Ser kod SEA/E-83 i supstitucija Asp45Ala kod SEA/E-74. Većina ovih supstitucija je locirana oko ostataka za koje je ranije pokazano da međusobno djeluju s MHC klase II (Abrahmsén i ostali, 1995.).

### Primjer 11

#### 10 Dizajniranje nove inačice superantigena

S ciljem dizajniranja optimalne inačice superantigena, kombinirane su sve poželjne supstitucije vodeći prema superiornom SEA/E-120 (Sl.4 i Sl. 9).

- 15 Prvo, sve poželjne modifikacije na C-kraju, to jest, Asp173Ala, Ser189Thr, Glu190Ala, Lys217Thr, Asn220Ser, Glu222Thr, Asn223Ser, His225Ser i Asp227Ser skupa s Gln204Thr su sastavljene čineći SAg inačicu SEA/E-113. Ova inačica pokazuje očekivano smanjenje u anti-SEA reaktivnosti i prihvatljive razine ekspresije ali s nešto smanjenom biološkom aktivnosti (Tablica 1, Sl. 7 i Sl. 8A i Sl. 8B). Sve poželjne supstitucije na N-kraju, to jest, ostaci Glu34Ser, Glu39Ser, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys, Asp44Ala, Glu49Thr, Lys74Thr, Asn78Ser, Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Ser  
20 i Lys84Ser su sastavljene u SEA/E-109. Značajno smanjenje anti-SEA reaktivnosti je opaženo za ovu inačicu superantigena skupa s visokom razinom ekspresije i čak poboljšanim biološkim profilom (Tablica 1, Sl. 7 i Sl. 8A i Sl. 8B). Međutim, kod stvaranja kombinacije ovih dviju inačica SEA/E-113 i SEA/E-109 u SEA/E-110, dogodio se dramatični gubitak i iskorištenja i biološke funkcije (Tablica 1). Biološka potencija je potpuno vraćena kada su ostaci divlje vrste Ser189, Glu190 i Gln204 ponovno korišteni u SEA/E-115 (Tablica 1), ali razine produkcije su još bile na  
25 niskoj razini. Molekulsko modeliranje ove inačice je sugeriralo da bi ostaci Asp173, His187 i Ser188 mogli biti važni za stabilizaciju savijanja i stoga rezultirajući u višim iskorištenjima.

- Nekoliko različitih kombinacija je načinjeno radi evaluacije ovih ostataka, rezultirajući u SEA/E-118, SEA/E-119, SEA/E-120, SEA/E-121 i SEA/E-122 (Tablica 1). Najbolja produkcija je dobivena s SEA/E-120 s ostacima divlje vrste  
30 na sva tri položaja. Skupa s ranije načinjenim SEA/E-21, SEA/E-74, SEA/E-97, SEA/E-108 i SEA/E-109, to su bile jedine SAg inačice koje su dostigle razine ekspresije više od 20 mg/L (Tablica 1). Nisu opažene nikakve bitne razlike s obzirom na biološku aktivnost ili reaktivnost antitijela između inačica.

#### Dizajn novog konjugata

- 35 SEA/E-120 je genetski fuzirana na Fab dio tumor reaktivnog antitijela, što je 5T4 (Dohlsten i ostali, 1994.). (Sl. 10).

- 5T4 antigen je ekspresiran na mnoštvu različitih tumora, kao što su ne-male stanice raka pluća, raka dojke, renalnih stanica raka, raka gušterače, raka jajovoda i raka debelog crijeva. Supstitucije u sekvenci divlje vrste 5T4 su također  
40 načinjene radi postizanja viših iskorištenja. U teškom lancu; His41Pro, Ser44Gly, Ile69Thr i Val113Gly i u lakom lancu; Phe10Ser, Thr45Lys, Ile63Ser, Phe73Leu, Thr77Ser, Leu78Val i Leu83Ala.

- Premda su sadašnji izum i njegove prednosti opisani detaljno, treba biti razumljivo da različite promjene, supstitucije i alteracije mogu biti načinjene bez napuštanja duha i raspona izuma kako je određen u pridodanim zahtjevima. Štoviše,  
45 namjera raspona sadašnje prijave nije da bude ograničena na pojedinačne izvedbe postupka, stroja, proizvodnje, smjese tvari, sredstava, načina i stupnjeva opisanih u specifikaciji. Kao netko uobičajeno iskusan u području će lako procijeniti iz otkrića sadašnjeg izuma, postupke, strojeve, proizvodnju, smjesu tvari, sredstva, načine ili stupnjeve, sada postojeće ili koji će se kasnije otkriti da provode bitno istu funkciju ili postižu bitno isti rezultat kao odgovarajuće izvedbe ovdje opisane, mogu biti iskorištene prema sadašnjem izumu. Prema tome, pridodanim zahtjevima je namjera uključiti unutar  
50 njihovog raspona takve postupke, strojeve, proizvodnju, smjesu tvari, sredstva, načine ili stupnjeve.

- Netko iskusan u području odmah cijeni što je sadašnji izum dobro podešen za provedbu spomenutih ciljeva i dobivenih krajeva i prednosti kao i onih tamo svojstvenih. Pripravci, načini, postupci i tehnike opisane ovdje su sadašnji  
55 predstavnici poželjnih izvedbi i namjera im je da budu primjeri i nije im namjera da budu ograničenja raspona. Promjene u njima i ostala korištenja će se pojaviti onima iskusnima u području koja su okružena unutar duha izuma ili određena s rasponom pridodanih zahtjeva.



## PATENTNI ZAHTJEVI

- 5 1. Konjugat koji obuhvaća bakterijski superantigen i dio antitijela, u kojem je superantigen Stafilokokni enterotoksin E (SEE), u kojem aminokiselinska sekvenca superantigena obuhvaća područja A do E, koje je područje A unutar TCR vezujućeg mjesta i određuje vezivanje na TCR, a područja B do E određuju vezivanje na MHC molekule klase II, **naznačen time**, što su sljedeće zamjene aminokiselinskih ostataka uvedene u područje C: K79E, K81E, K83S, K84S, i što su sljedeće zamjene aminokiselinskih ostataka uvedene u područje A: R20G, N21T, S24G, R27K, i što su po izboru aminokiseline na položaju 173 i/ili na položaju 204 unutar područja A također bile zamijenjene, i što je unutar područja E uvedena zamjena D227S (ili A), i što su najmanje jedan ili više aminokiselinskih ostataka na položajima 34, 35, 39, 40, 41, 42, 44, 45 i 49 unutar područja B i/ili na položajima 74, 75, 78 unutar područja C i/ili na položajima 187, 188, 189, 190 unutar područja D, i/ili na položajima 217, 220, 222, 223, 225 unutar područja E zamijenjeni, tako da je supstituirani superantigen smanjio seroreaktivnost u usporedbi sa superantigenom iz kojeg je dobiven, i u kojem je antitijelo pune dužine, ili bilo koji drugi aktivni dio antitijela koji vezuje antigen, koji je usmjeren prema strukturi na površini stanica raka.
- 10 2. Konjugat prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što superantigen ima aminokiselinsku sekvencu opisanu u SEQ ID NO: 2 (SEA/E-120).
3. Konjugat prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačen time**, što je antitijelo fragment Fab-a.
- 20 4. Konjugat prema zahtjevu 3, **naznačen time**, što je antitijelo C215Fab.
5. Konjugat prema zahtjevu 3, **naznačen time**, što je antitijelo 5T4Fab.
6. Konjugat prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što ima aminokiselinsku sekvencu opisanu u SEQ ID NO: 1.
7. Konjugat prema bilo kojem od prethodnih zahtjeva, **naznačen time**, što se koristi u tretiranju raka.
8. Konjugat kako je zahtjevan u zahtjevu 7, **naznačen time**, što je rak odabran od skupine koja se sastoji od raka pluća, dojke, debelog crijeva, bubrega, gušterače, jajnika, želuca, grlića maternice i prostate.
- 25 9. Konjugat prema bilo kojem od zahtjeva 1 do 6, **naznačen time**, što se koristi za proizvodnju medikamenata za tretiranje raka.
10. Medikament prema zahtjevu 9, **naznačen time**, što se koristi za intravenozno davanje.
- 30 11. Farmaceutski pripravak, **naznačen time**, što obuhvaća kao aktivni sastojak, terapijski učinkovitu količinu konjugata prema bilo kojem od zahtjeva 1 do 6.

## CITIRANE REFERENCE

- [0181] Svi patenti i publikacije spomenute u specifikacijama su indikativna razina onima iskusnima u području i kojima izum pripada. Svi patenti i publikacije su ovdje uključeni pozivanjem na njih u istom opsegu kao i ako je svaka pojedinačna publikacija bila specifično i pojedinačno naznačena da će biti uključena pozivanjem na nju.
- 5 U.S. patent 4,554,101  
 U.S. patent 5,221,605  
 U.S. patent 5,238,808  
 10 U.S. patent 5,798,208  
 U.S. patent 5,830,650  
 U.S. patent 5,220,007  
 U.S. patent 5,284,760  
 U.S. patent 5,354,670  
 15 U.S. patent 5,366,878  
 U.S. patent 5,389,514  
 U.S. patent 5,635,377  
 U.S. patent 5,789,166  
 U.S. patent 5,446,128  
 20 U.S. patent 5,710,245  
 U.S. patent 5,840,833  
 U.S. patent 5,859,184  
 U.S. patenti 5,440,013  
 U.S. patent 5,618,914  
 25 U.S. patent 5,670,155  
 U.S. patent 5,475,085  
 U.S. patent 5,929,237  
 U.S. patent 5,672,681  
 U.S. patent 5,674,976  
 30 U.S. patenti 4,608,251  
 U.S. patent 4,601,903  
 U.S. patent 4,599,231  
 U.S. patent 4,599,230  
 U.S. patent 4,596,792  
 35 U.S. patent 4,578,770
- Abrahmsén L., i ostali, *EMBO J.* 14:2978-86, 1995.  
 Alpaugh R.K., i ostali, *Clin. Cancer Res.* 4:1903-14, 1998.  
 Antonsson P., i ostali, *J. Immunol* 158:4245-51, 1997.  
 Bangham i ostali, *J. Mol. Biol.*, 13:238-252, 1965.  
 40 Bird i ostali, *Science.* 242:423-6, 1988.  
 Braisted i ostali, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93(12) : 5688-92, 1996.  
 Burks i ostali, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94 (2) : 412-7, 1997.  
 Capaldi i ostali, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977.  
 Cavallin A., i ostali, *J. Biol. Chem.*, 275:1665-72, 2000.  
 45 Cunningham i ostali, *Science.* 244 (4908) : 1081-5, 1989.  
 Davis i ostali, *Basic Methods in Molecular Biology*, 1986.  
 Dohlsten M., i ostali, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91:8945-9, 1994.  
 DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE, G. Gregoriadis izdavač (1979) str. 287-341.  
 Hakansson, M. i ostali, *J. Mol. Biol.*, 302:527-37, 2000.  
 50 Harlow i ostali, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988.  
 Johannesson i ostali, *J. Med. Chem.*, 42:601-608, 1999.  
 Kaneda i ostali, *J. Biol. Chem.*, 264(21) : 12126-12129, 1989.  
 Kato i ostali, *J. Biol. Chem.*, 266(6) :3361-3364, 1991.  
 Nicolau i ostali, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.  
 55 Papageorgiou A. C. i ostali, *Trends in Microbiology*, 8: 369-375, 2000.  
 Remington's Pharmaceutical Sciences, 15. izdanje, poglavlje 61, str. 1035-1038 i 1570-1580.  
 Sambrook i ostali, u: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. izdanje, 1989.  
 Shad E. M., i ostali *EMBO J.*, 14:3292-3301, 1995.  
 Short i ostali, *J. Biol. Chem.*, 270(48) : 28541-50, 1995.  
 60 Sundstrom M., i ostali *EMBO J.*,15:6832-40, 1996 A.



- Sundstrom M., i ostali, *J. Biol. Chem.*, 271: 32212-16, 1996 B.
- Szoka i Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75:4194-4198, 1978.
- Vita i ostali, *Biopolymers*, 47:93-100, 1998.
- Warren i ostali, *Biochemistry* 35(27) :8855-62, 1996.
- 5 Weisshoff i ostali, *Eur. J. Biochem.*, 259:776-788, 1999.
- Wells i ostali, *Methods*. 10(1) :126-34, 1996.
- Wong i ostali, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Yelton i ostali, *J. Immunol.*, 155(4) :1994-2004, 1995.

WO 03/002143

PCI/SE02/01188

1

## IZLIST SEKVENCE

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

<120> NOVO PROIZVEDEN SUPERANTIGEN ZA HUMANU TERAPIJU

<130> P02188US0;10104199

<140> TBA

<141> 2001-06-20

<160> 7

<170> PatentIn verzija 3.0

<210> 1

<211> 672

<212> PRT

<213> umjetna sekvenca

<220>

<221> peptid

<222> (1),,(672)

<223> konjugirani protein

<400> 1

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

WO 03/002143

PCI/SE02/01188

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val<sup>2</sup> Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190  
 Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala  
 195 200 205  
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Ser Gly Gly  
 210 215 220  
 Pro Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr  
 245 250 255  
 Tyr Asn Ser Lys Ala Ile Thr Ser Ser Glu Lys Ser Ala Asp Gln Phe  
 260 265 270  
 Leu Thr Asn Thr Leu Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Gly His Pro Trp  
 275 280 285  
 Tyr Asn Asp Leu Leu Val Asp Leu Gly Ser Thr Ala Ala Thr Ser Glu  
 290 295 300  
 Tyr Glu Gly Ser Ser Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln  
 305 310 315 320  
 Cys Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val  
 325 330 335  
 Thr Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile  
 340 345 350  
 Asn Leu Trp Ile Asp Gly Lys Gln Thr Thr Val Pro Ile Asp Lys Val  
 355 360 365  
 Lys Thr Ser Lys Lys Glu Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala  
 370 375 380  
 Arg His Tyr Leu His Gly Lys Phe Gly Leu Tyr Asn Ser Asp Ser Phe  
 385 390 395 400  
 Gly Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Ser Ser Glu Gly  
 405 410 415  
 Ser Thr Val Ser Tyr Asp Leu Phe Asp Ala Gln Gly Gln Tyr Pro Asp  
 420 425 430  
 Thr Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Thr Thr Ile Ser Ser Thr Ser  
 435 440 445  
 Leu Ser Ile Ser Leu Tyr Leu Tyr Thr Thr Ser Ile Val Met Thr Gln  
 450 455 460

WO 03/002143

PCT/SE02/01188

3

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

<210> 2

<211> 233

<212> PRT

<213> **umjetna sekvenca**

<220>

<221> **peptid**

<222> (1)..(233)<223> **kimerni protein**

<400> 2

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

WO 03/002143

PCI/SE02/01188

4

Thr Asn Thr Leu Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Gly His Pro Trp Tyr  
 50 55 60

---

Asn Asp Leu Leu Val Asp Leu Gly Ser Thr Ala Ala Thr Ser Glu Tyr  
 65 70 80

Glu Gly Ser Ser Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr  
 100 105 110

Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn  
 115 120 125

Leu Trp Ile Asp Gly Lys Gln Thr Thr Val Pro Ile Asp Lys Val Lys  
 130 135 140

Thr Ser Lys Lys Glu Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg  
 145 150 155 160

His Tyr Leu His Gly Lys Phe Gly Leu Tyr Asn Ser Asp Ser Phe Gly  
 165 170 175

Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Ser Ser Glu Gly Ser  
 180 185 190

Thr Val Ser Tyr Asp Leu Phe Asp Ala Gln Gly Gln Tyr Pro Asp Thr  
 195 200 205

Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Thr Thr Ile Ser Ser Thr Ser Leu  
 210 215 220

Ser Ile Ser Leu Tyr Leu Tyr Thr Thr  
 225 230

- <210> 3
- <211> 233
- <212> PRT
- <213> umjetna sekvenca
- <220>
- <221> peptid
- <222> (1) .. (233)
- <223> kimerni protein

<400> 3

Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser  
 1 5 10 15

Glu Leu Gln Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr  
 20 25 30

Asn Glu Lys Ala Ile Thr Glu Asn Lys Glu Ser Asp Asp Gln Phe Leu  
 35 40 45

WO 03/002143

PCT/SE02/01188

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

<210> 4

<211> 233

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 4

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

WO 03/002143

PCT/SE02/01188

Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys<sup>6</sup> Met Tyr Gly Gly Val Thr  
 100 105 110  
 Leu His Asp Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn  
 115 120 125  
 Leu Trp Leu Asp Gly Lys Gln Asn Thr Val Pro Leu Glu Thr Val Lys  
 130 135 140  
 Thr Asn Lys Lys Asn Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg  
 145 150 155 160  
 Arg Tyr Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Ser Asp Val Phe Asp  
 165 170 175  
 Gly Lys Val Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Thr Ser Thr Glu Pro  
 180 185 190  
 Ser Val Asn Tyr Asp Leu Phe Gly Ala Gln Gly Gln Tyr Ser Asn Thr  
 195 200 205  
 Leu Leu Arg Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn Met  
 210 215 220  
 His Ile Asp Ile Tyr Leu Tyr Thr Ser  
 225 230

<210> 5  
 <211> 203  
 <212> PRT  
 <213> staphylococcus sp.

<400> 5

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

WO 03/002143

PCT/SE02/01188

7

Ala Ser Lys Val Ser Tyr Asp Leu Phe Asp Val Ala Gly Asp Phe Pro  
 165 170 175

Glu Lys Gln Leu Arg Ile Tyr Ser Asp Asn Lys Thr Leu Ser Thr Glu  
 180 185 190

His Leu His Ile Asp Ile Tyr Leu Tyr Glu Ala  
 195 200

<210> 6

<211> 217

<212> PRT

<213> staphylococcus sp.

<400> 6

Glu Asp Leu His Asp Lys Ser Glu Leu Thr Asp Leu Ala Leu Ala Asn  
 1 5 10 15

Ala Tyr Gly Gln Tyr Asn His Pro Phe Ile Lys Glu Asn Ile Lys Ser  
 20 25 30

Asp Glu Ile Ser Gly Glu Lys Asp Leu Ile Phe Arg Asn Gln Gly Asp  
 35 40 45

Ser Gly Asn Asp Leu Arg Val Lys Phe Ala Thr Ala Asp Leu Ala Gln  
 50 55 60

Lys Phe Lys Asn Lys Asn Val Asp Ile Tyr Gly Ala Ser Phe Tyr Tyr  
 65 70 75 80

Lys Cys Glu Lys Ile Ser Glu Asn Ile Ser Glu Cys Leu Tyr Gly Gly  
 85 90 95

Thr Thr Leu Asn Ser Glu Lys Leu Ala Gln Glu Arg Val Ile Gly Ala  
 100 105 110

Asn Val Trp Val Asp Gly Ile Gln Lys Glu Thr Glu Leu Ile Arg Thr  
 115 120 125

Asn Lys Lys Asn Val Thr Leu Gln Glu Leu Asp Ile Lys Ile Arg Lys  
 130 135 140

Ile Leu Ser Asp Lys Tyr Lys Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Glu Ile Ser  
 145 150 155 160

Lys Gly Leu Ile Glu Phe Asp Met Lys Thr Pro Arg Asp Tyr Ser Phe  
 165 170 175

Asp Ile Tyr Asp Leu Lys Gly Glu Asn Asp Tyr Glu Ile Asp Lys Ile  
 180 185 190

Tyr Glu Asp Asn Lys Thr Leu Lys Ser Asp Asp Ile Ser His Ile Asp  
 195 200 205

Val Asn Leu Tyr Thr Lys Lys Lys Val  
 210 215

<210> 7



WO 03/002143

PCT/SE02/01188

8

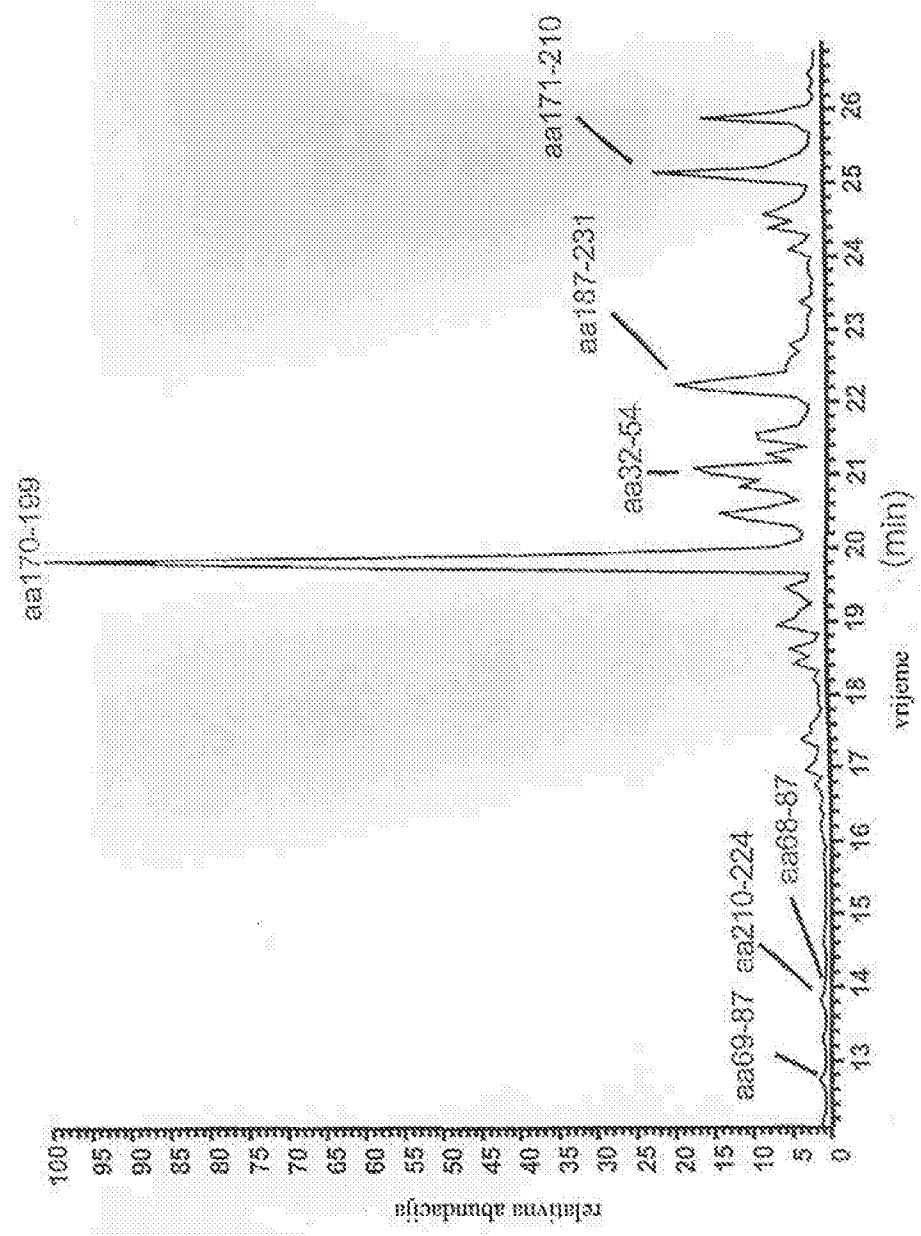
&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; staphylococcus sp.

&lt;400&gt; 7

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



vrijeme (min)

SLIKA 1

1 6 11 16 21 26 31 36 41 46

SEQ ID NO: 2 1-50 SEKSEEINEKDLRKKSELOQTALGNLKOIYYINSKAIFSSSEKSA DQFLIN

51-100 TLLFKGFFTGHFWINDLLVDLGS TAATSEYEGSSVDLYGAYIGYQCAGGT

101-150 PNKTACMYGGVTLHDNRRITERRKKVPI NLWIDGKQTFVPI DKVKTSKKEY

151-200 TVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSEFGGKVQ RGLIVFHSSESSTVSYDLFD

201-233 AQQQYPTLLRIYRDNFTISSSTLSLSI SLYLYTF

SLIKA 2

SEQ ID NO: 3 SEAE18 : SEKSEIENEKILREKSELOGTALGNLKEIYYN---EKAITENKESDDQF  
 SEQ ID NO: 4 SEA : SEKSEIENEKILREKSELOGTALGNLKEIYYN---EKAKTENKESHQDF  
 SEQ ID NO: 5 SED : ALHKKSELSSTALNNKKEWADA---APLICANKKSTGDF  
 SEQ ID NO: 6 SEH : KDLNKRSELDLALANAYGQNEPFLMNIKSEIISEKDL

SEAE18 : LENTLFGGFTGHPWYNDLIVDLSKDAJNKYKGGKVDLYGAYGYOQA  
 SEA : LQHFILFKGFEFDHSMWNDLIVDFSEDIYVKYNGKKVDLYGAYGYOQA  
 SED : LENTLLYKAF---LLINENSAEMAQREKSNVDVYAIRIAAAC  
 SEH : LERWQDSC-----NHRVKEATADLAQEKKNKVDLYGASFYKQF

SEAE18 : GGTPNKYACMIGGVFLHDNWLTEKKVPIINLWIDGKQIVVHDKVTKSK  
 SEA : GGTPNKYACMIGGVFLHDNWLTEKKVPIINLWIDGKQNVV---VTVKINK  
 SED : ---RTACTYGGVTPAGNALKAKKIPILNLWILIGVQKEVSLKVKQIDK  
 SEH : KISENISECLYGSTILM-SKLAQEVVIGANVVDGLQKLEF---LIRUNK

SEAE18 : KEVTVQELDLOARHYLHGKFCGLYNSDSFGGKQVQGLIVFHSSESSVYSYD  
 SEA : KNVTVQELDLOARHYLQEKYINLYNSDVFSGKVQGLIVFHTSTEPSVYD  
 SED : KNVTVQELDLOARHYLQKDKLYN-----ALQKGLKLEDSMAASKVSYD  
 SEH : KNVTVQELDPIKIRKILSDKTKIYY---KSELSKGLLEFDKMTPEPQYSTD

SEAE18 : LFDAGQCYZDFLELRYDRNKTINSEN-LEHIALYLYYT  
 SEA : LFDAGQCYZDFLELRYDRNKTINSEN-LEHIDYLYYS  
 SED : LFDVACDPEKQRIYSONKTLSTEH-LEHIDYLYYA  
 SEH : IYDLKGENDYETIKIYEDNKYLSDDLEHIVNLLTKKV

SLIKA 3

SEQ ID NO: 2 SEA/E-120  
SEQ ID NO: 3 SEA/E-18  
SEQ ID NO: 7 SEE  
SEQ ID NO: 4 SEA

SEA/E-120  
SEA/E-18  
SEE  
SEA

SEA/E-120  
SEA/E-18  
SEE  
SEA

SEA/E-120  
SEA/E-18  
SEE  
SEA

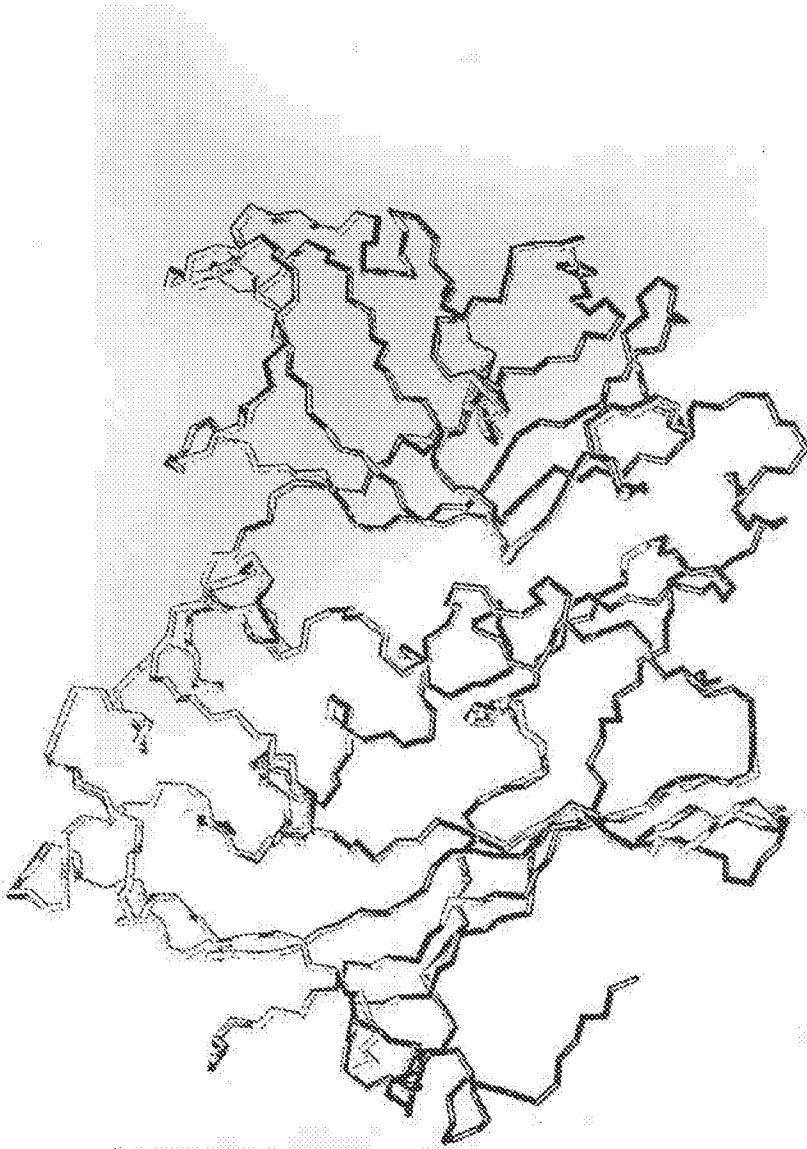
A  
B  
SEKSEINEKDLRKKSELOQTALGNLKOIYYINSEKAITSEKSDAOFINTLLFKGFFTG 60  
SEKSEINEKDLRKKSELOQTALGNLKOIYYINSEKAITENKESDDQFLENTLLEKGFYTG 60  
SEKSEINEKDLRKKSELOQTALGNLKOIYYINSEKAITENKESDDQFLENTLLEKGFYTG 60  
SEKSEINEKDLRKKSELOQTALGNLKOIYYINSEKAITENKESDDQFLENTLLEKGFYTG 60  
SEKSEINEKDLRKKSELOQTALGNLKOIYYINSEKAITENKESDDQFLENTLLEKGFYTG 60  
\*\*\*\*\*

C  
HPWYNDLLVDLGSRTAATSEYEGSSVCLYGAYGYQCAGGTENKACMYGCVTLHDNNRLT 120  
HPWYNDLLVDLGSKDATNKYKCKVLDLYGAYGYQCAGGTENKACMYGCVTLHDNNRLT 120  
HPWYNDLLVDLGSKDATNKYKCKVLDLYGAYGYQCAGGTENKACMYGCVTLHDNNRLT 120  
HSWYNDLLVDLGSKDIVDKYNKGVLDLYGAYGYQCAGGTENKACMYGCVTLHDNNRLT 120  
\*\*\*\*\*

EKKVPINIMIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGELYNSDSFGGKVO 180  
EKKVPINIMIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGELYNSDSFGGKVO 180  
EKKVPINIMIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGELYNSDSFGGKVO 180  
EKKVPINIMIDGKQTTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGELYNSDSFGGKVO 180  
\*\*\*\*\*

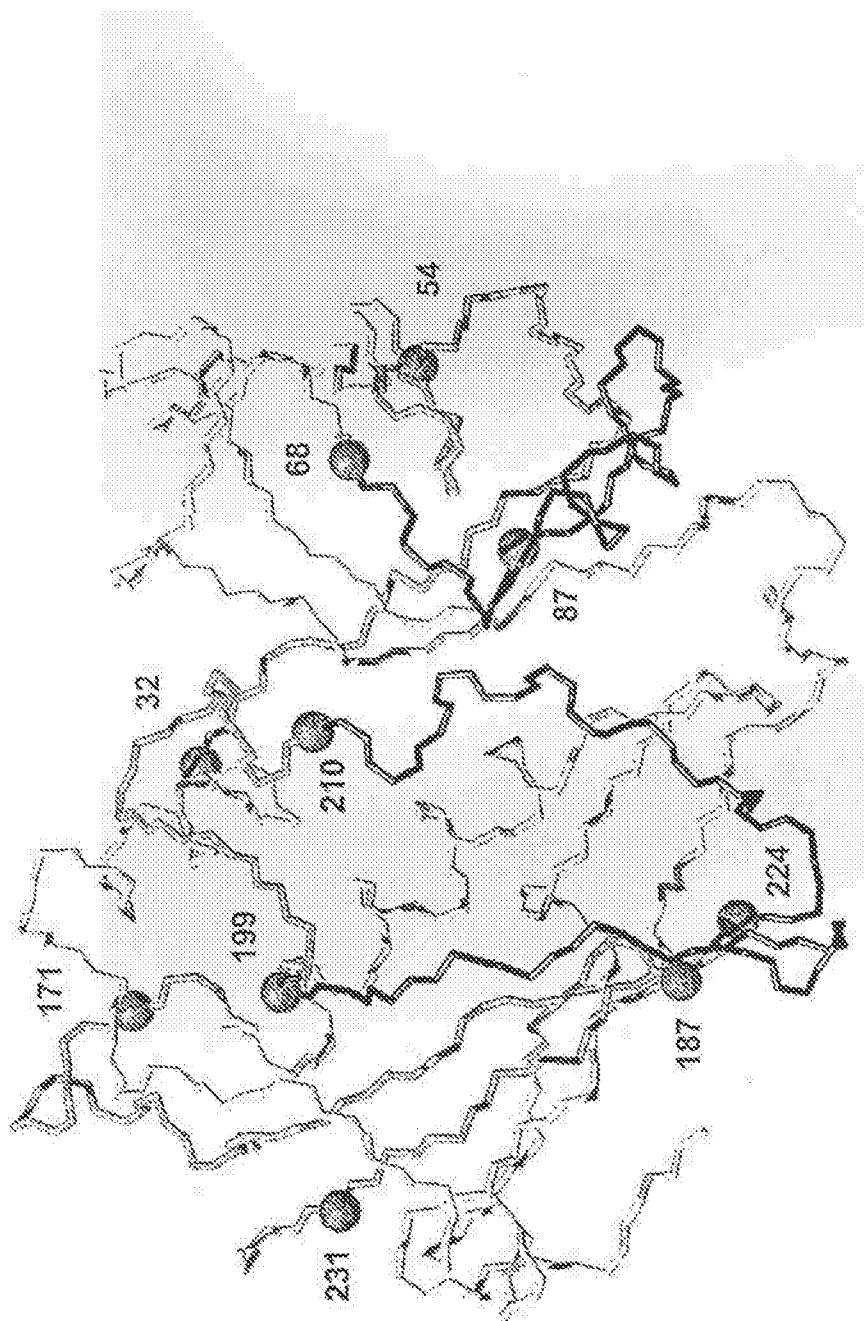
D  
E  
RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAGQGPDELLRIYRKNVTTISSTLSLSILLYTT 233  
RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAGQGPDELLRIYRKNVTTINSENHLIALYLYTT 233  
RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAGQGPDELLRIYRKNVTTINSENHLIDLYLYTT 233  
RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAGQGPDELLRIYRKNVTTINSENHLIDLYLYTT 233  
\*\*\*\*\*

SLIKA 4



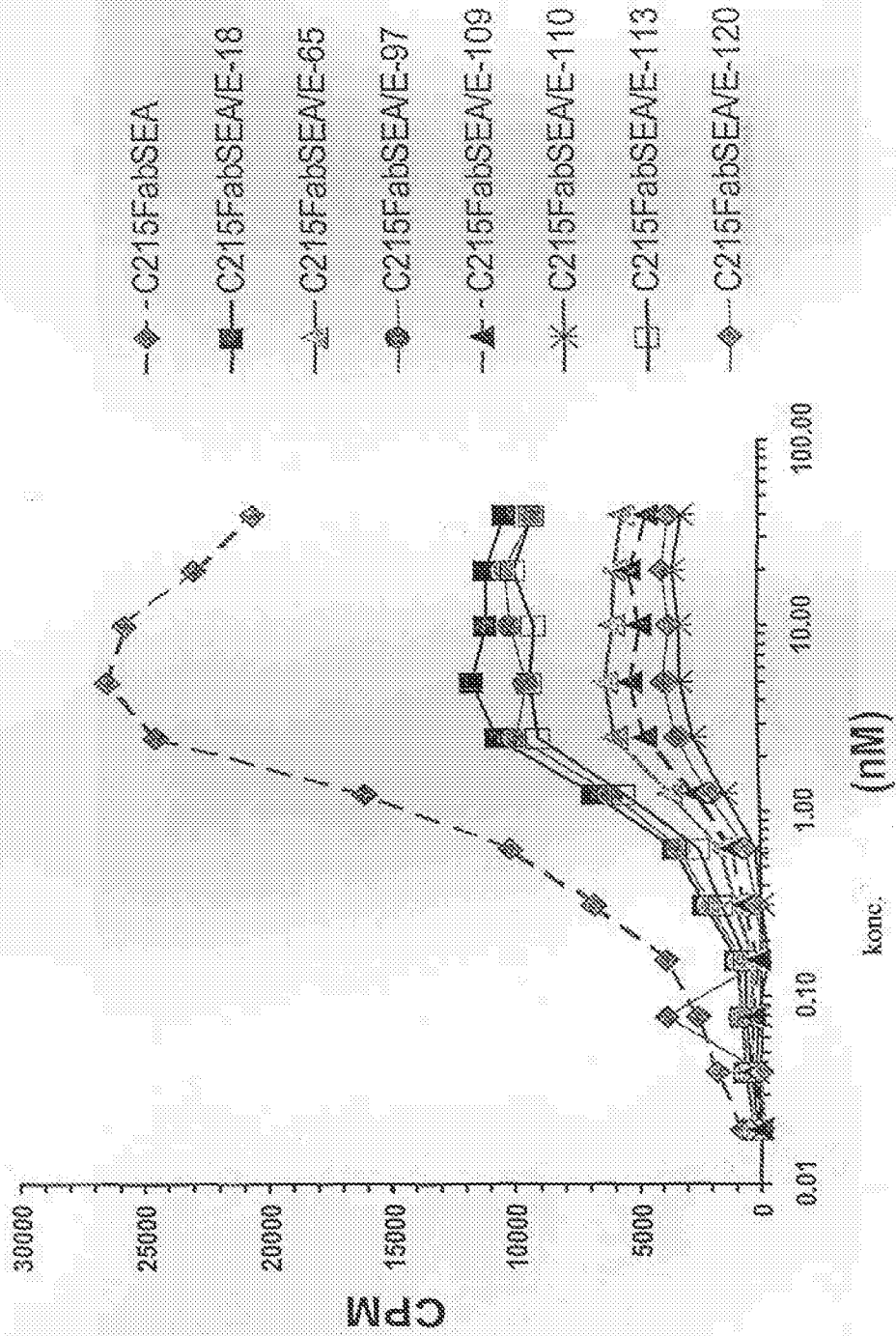
SLIKA 5

6/11



SLIKA 6

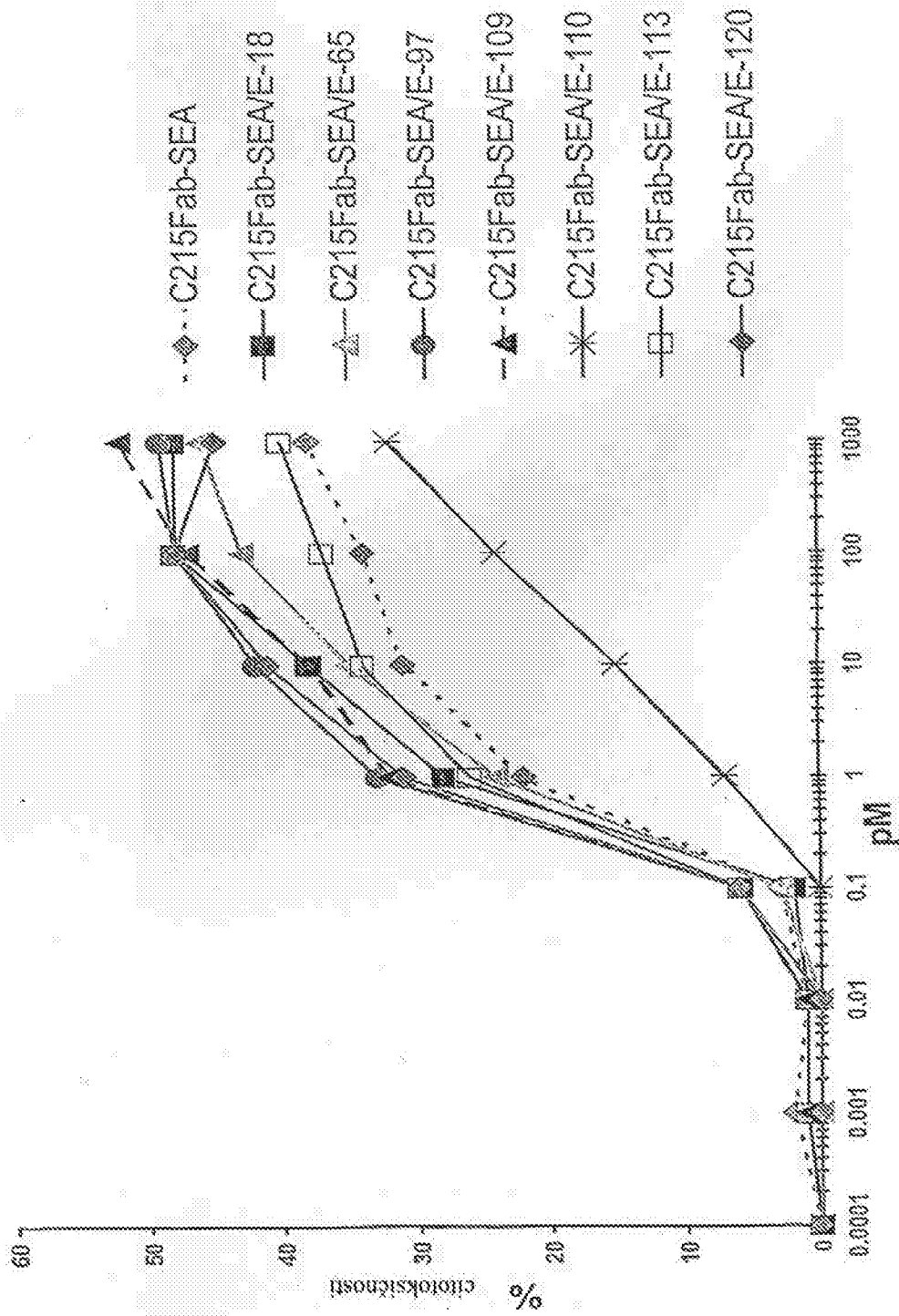
7/11



SLIKA 7

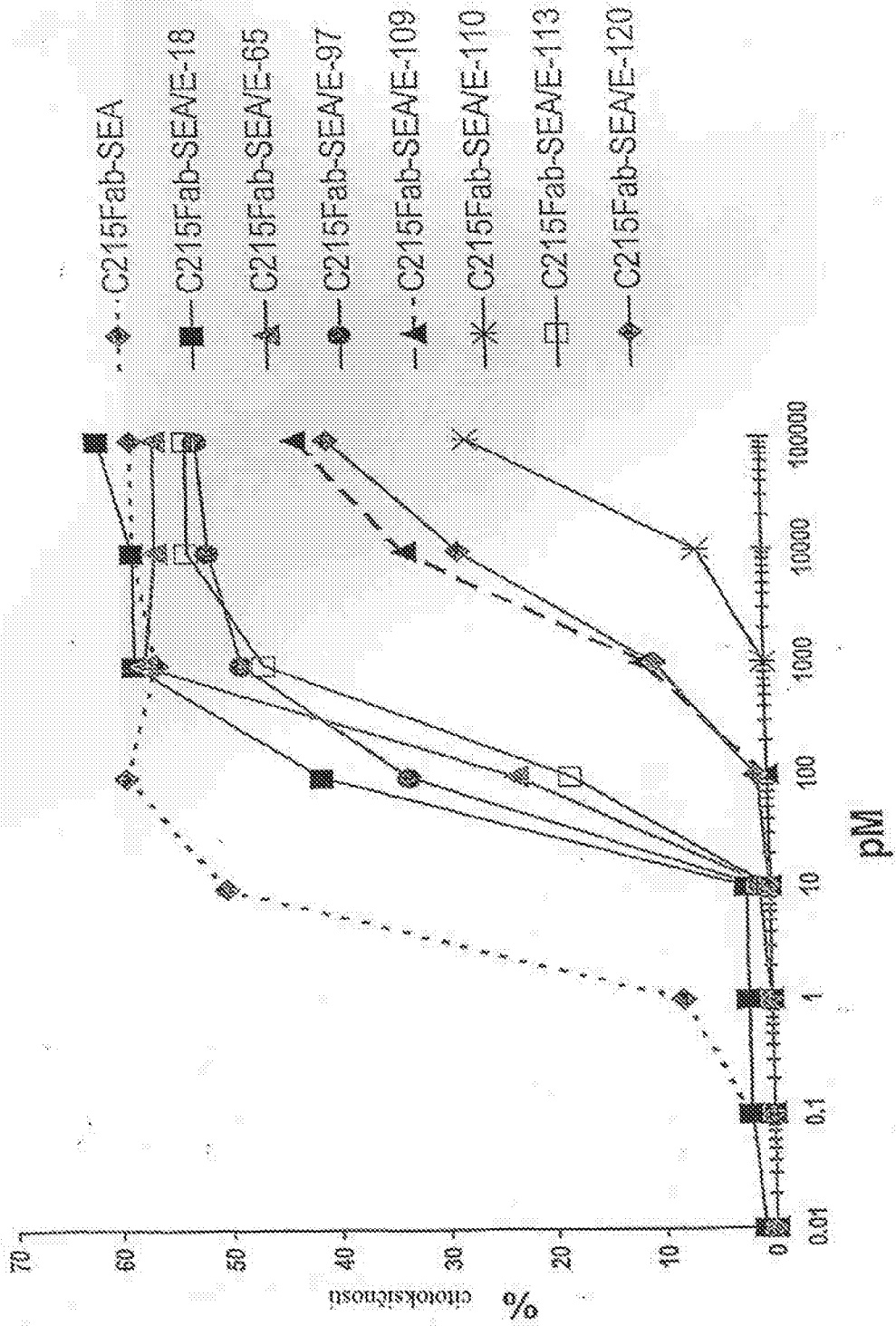


8/11



SLIKA 8A

9/11



SLIKA 8B



11/1

514 promjenivi teski lanak  
 EVQJQ QSGED LVKPG ASVKI SXKAS GYFFT GYDMM WVKQS FQKGL EWIGR  
 INPNN GVTLY NQKFK DKATL TVDKS STEAY MBLRS LSEED SAVYY CARST  
 C742 konstantni teski lanak  
 MIINY VMDYR GQGIS VIVSS AKTTP FSVYP LAPGS AAOEN SMVTL GCLVK  
 GYFFB FVTYF WNSGS LSSGV HHPRA VLOSD LYTLE SSVTY PSSTW PSEIV  
 SEAYE-120  
 TCNVA HFASS TKVDR KIVPR DSGGF SEKSE KIBEK DLKXK SBLQK TALGN  
 LKQIY YINBK AITSS EKSAD QFLTN YLDFK OFFIS HPKYN ULLVD LGSYA  
 APTSHY EGSSV DLYGA YUQYO CAGGT PKKUA CMYGG VILHD KRAHT HKKKV  
 PINLM IDGRQ TIVPI DKVKT SIKKIV TVOEL DLQAR HYLHG KEGLY NEDSF  
 GOKVQ NGLIV FHSSE GSIVS YLLEU AOSQY PDILL RIKRD NITIS STELS  
 514 promjenivi laki lanak  
 ISLTH YETSI VMQTF PUSLL VEAGD KVTIY CKASQ SVSND VAWYQ QKPGQ  
 SPKLL ISYTS SEYAG VPHBF SCSGY GINPT LCTSS VOARD AAVYF COODY  
 C742 konstantni laki lanak  
 NSPPT FQSGT KLEIK NADAA PIVSI FPESS BQJMS GZASV VCFIN NFIEX  
 DIRVK WKIDG SERQW GVINS WUDQD SKDST YEMSS TLAIT KDEYB RHMST  
 TCEAT HKST SPIVK SEWEN ES

SEQ ID NO: 1 1-50  
 51-100  
 101-150  
 151-200  
 201-250  
 251-300  
 301-350  
 351-400  
 401-450  
 451-500  
 501-550  
 551-600  
 601-650  
 651-672

SLIKA 10