

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 307 180

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **2003-3559**  
(22) Přihlášeno: **19.06.2002**  
(30) Právo přednosti: **28.06.2001 SE 2001 0102327**  
(40) Zveřejněno: **16.06.2004**  
**(Věstník č. 6/2004)**  
(47) Uděleno: **17.01.2018**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **28.02.2018**  
**(Věstník č. 9/2018)**  
(86) PCT číslo: **PCT/SE2002/001188**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2003/002143**

*C07K 19/00* (2006.01)  
*C07K 14/31* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)  
*A61K 47/48* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 39/085* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/39* (2006.01)  
*C07K 14/315* (2006.01)  
*C07K 14/705* (2006.01)  
*C07K 16/18* (2006.01)  
*H04L 12/58* (2006.01)  
*A61K 38/02* (2006.01)  
*C12N 15/09* (2006.01)  
*H04L 29/06* (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 99/04820; WO 97/36932; WO 96/01650; EP 1103268.

(73) Majitel patentu:  
ACTIVE BIOTECH AB, Lund, SE

SEQ ID NO: 2  
SEQ ID NO: 3  
SEQ ID NO: 4

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100

(72) Původce:  
Göran Forsberg, Eslöv, SE  
Eva Erlandsson, Dalby, SE  
Per Antonsson, Lund, SE  
Björn Walse, Lund, SE

SEQ ID NO: 1  
SEQ ID NO: 2  
SEQ ID NO: 3  
SEQ ID NO: 4

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100

(74) Zástupce:  
Společná advokátní kancelář  
Všetečka Zelený Švorčík Kalenský  
a partneři, JUDr. Pavel Zelený, Hálkova 2, 120 00  
Praha 2

SEQ ID NO: 1  
SEQ ID NO: 2  
SEQ ID NO: 3  
SEQ ID NO: 4

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100

(54) Název vynálezu:  
**Konjugát obsahující superantigen a protilátkovou skupinu, a farmaceutický prostředek s obsahem konjugátu**

(57) Anotace:  
Konjugát, který obsahuje bakteriální superantigen a protilátkovou skupinu, v němž superantigenem je stafylokokový enterotoxin E (SEE), kde aminokyselínová sekvence superantigenem obsahuje regiony A až E, přičemž region A je vazebné místo TCR a určuje vazbu na TCR, a regiony B až E určují vazbu na MHC molekuly třídy II, a protilátkovou skupinou je kompletní protilátka nebo jakýkoliv jiný aktivní fragment protilátky vázící antigen, který je namířen proti povrchové struktuře asociované s nádorovou buňkou. Je popsán také farmaceutický prostředek obsahující jako aktivní složku terapeuticky účinné množství uvedeného konjugátu, jakož i použití tohoto konjugátu pro výrobu léčiva pro léčbu zhoubných nádorů.

## **Konjugát obsahující superantigen a protilátkovou skupinu, a farmaceutický prostředek s obsahem konjugátu**

### 5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká oblasti imunologie a proliferativních onemocnění, jako jsou zhoubné nádory. Přesněji se týká konjugátu, jež obsahují superantigeny, které jsou modifikovány tak, že redukuje seroreaktivitu, a použití takových konjugátů pro léčbu zhoubných nádorů.

10

### Dosavadní stav techniky

15 Superantigeny (SAG) jsou tvořeny skupinou bakteriálních a virových proteinů, které jsou extrémně aktivní v aktivaci velké frakce populace T-lymfocytů. Superantigeny se přímo váží na hlavní histokompatibilní komplex (MHC) bez toho, že by byly zpracovány. Ve skutečnosti se superantigeny váží nezpracované mimo antigen-vazebnou drážku na MHC molekulách třídy II, což eliminuje většinu polymorfismu v konvenčních vazebných místech pro peptid. Mechanismus 20 vazby závisí na vazbě superantigenů na receptor T-lymfocyty (TCR) na VB řetězci, místo vazby na hypervariabilní smyčky receptoru T-lymfocyty (TCR).

Stafylokokové enterotoxiny (SE) jsou homologní skupinou superantigenů, jak z hlediska struktury, tak z hlediska funkce (Papageorgiou et al., 2000). Jsou známé jako hlavní příčina otravy z potravy a syndromu toxického šoku u člověka.

25

Nový terapeutický postup pro léčbu nádorů na bázi SAG se vyvinul pro adjuvantní léčbu solidních nádorů. Využívá obou hlavních ramen imunitního systému tím, že používá Fab část tumor-specifické monoklonální protilátky a SAG aktivující T-lymfocyty v jediném rekombinantním fúzním proteinu. Fab-SAG proteiny navázané na nádorové buňky mohou 30 aktivovat SAG-aktivované cytotoxické T-lymfocyty k zabíjení nádorových buněk přímo mechanismem buněčné cytotoxicity zprostředkované protilátkou k superantigenu, SADCC. Kromě toho aktivované T-lymfocyty produkují tumoricidní a prozánětlivé cytokiny, což řeší problémy spojené s heterogenitou nádoru a s vychytáváním makromolekul.

35

Protinádorové léky na bázi superantigenů mají určitou úspěšnost, avšak jedním klinickým problémem, který musí být vyřešen, je systémová aktivace imunitního systému. Fúzní proteiny s přirozeným SEA byly zkoumány v klinických studiích na kolorektálním karcinomu a na karcinomu pankreasu (Alpaugh et al., 1998). Byly sice pozorovány povzbudivé výsledky, ale také určitá omezení. Za prvé, přípravky byly velmi toxické. Za druhé, předem vytvořené 40 protilátky k superantigenům u pacienta způsobovaly obtíže při dávkování. Kromě toho byly přípravky imunogenní. Proto bylo opakování cyklů terapie možné pouze u omezeného počtu pacientů.

45

Do předkládaného vynálezu byla terapie na bázi SAG omezena z hlediska dávky. V předkládaném vynálezu je poprvé modifikován superantigenem, což vede ke snížení séroreakivity zachováním aktivity superantigenů; z tohoto důvodu předkládaný vynález je nový a není zřejmý.

Dosavadní stav techniky je blíže diskutován v dále uvedených dokumentech:

50

dokument WO 99/04 820 A2, který se týká způsobu deaktivace cílových buněk v přítomnosti T-lymfocytů přivedením těchto dvou typů buněk do kontaktu se superantigenem v přítomnosti modulátoru imunity, při kterém alespoň jeden ze superantigenů a modulátoru imunity je konjugát mezi "volným" superantigenem a částí zaměřující konjugát k cílovým buňkám;

55

dokument WO 97/36 932 A1, který se týká konjugátu mezi částí vyhledávací cíl a modifikovaným superantigenem přirozeného typu;

5 dokument WO 96/01 650 A1, jenž se týká konjugátu obsahujícího biospecifický protějšek, který se může vázat na předem stanovenou strukturu a peptid odvozený od superantigenů;

10 dokument WO 01/30 854 A2, který se týká protilátky nebo jejího derivátu nebo jejího fragmentu, s vazebnou strukturou pro cílovou strukturu, jehož protilátka je zobrazena v lidských gastro-intestinálních epiteliálních tumorových buňkách a na povrchu jeho buněk, a v subpopulaci normálních lidských gastrointestinálních epiteliálních buněk, a který zahrnuje specifické sekvence;

15 Griggs N. D. et al.: "Mapping of multiple binding domains of the superantigen staphylococcal enterotoxin A for HLA", Journal of Immunology, sv. 148, č. 8, 1992, str. 2516 – 2521, popisuje rozmanité regiony SEA, které jsou zodpovědné za vázání k HLA Ag na buňkách Raji a doporučuje, aby vázání superantigenů SEA na MHC molekuly zahrnovalo několik N-terminálních regionů na SEA, stejně jako další interní domény;

20 Hansson J. et al.: "Genetically engineered superantigens as tolerable antitumor agents", Proc. Nati. Acad. Sci. USA, sv. 94, březen 1997 (1997–03), str. 2489 – 2494, který zveřejňuje použití superantigenů vázaných k majoritnímu histokompatibilnímu komplexu (MHC) při aktivaci T-lymfocytových buněk, a specifického superantigenů, kterým je fúzovaný protein C215Fab a SEA, s bodovou mutací D227A;

25 dokument WO 01/36486 A2, který se týká použití ScFv Ab (ScFv Ab) schopného rozpoznat molekulu asociovanou s chorobou (DAM) při výrobě léku pro prevenci a/nebo léčbě chorobného stavu spojeného s DAM;

30 Rosendahl A. et al.: "Long-term survival and complete cures of B16 melanoma-carrying animals after therapy with tumor-targeted IL-2 and sea", Int. J. Cancer, sv. 81, 1999, str. 156 – 163, který prokazuje, že Fab-SEA imunoterapie je silně zesílena společným podáváním Fab-IL-2;

35 Sogaard M. et al.: "Antibody-targeted superantigens in cancer immunotherapy", Immunotechnology, sv. 2, 1996, str. 151 – 162, co je přehled, ve kterém se popisuje rakovinná imunoterapie, při které se superantigeny zaměřují na tumor pomocí genetické fúze na fragment Fab monoklonální protilátky specifické pro tumor;

40 EP 1 103 268 A1 popisuje velmi obecné okolnosti použití stafylokokového enterotoxinu (SE) nebo jeho homologu, fragmentu, fúzního proteinu, nebo jeho derivátu, pro výrobu léčiva pro podávání pacientovi infuzí pro léčbu rakoviny; přičemž léčba zhoubných nádorů exprimujících MHC molekulu třídy II je vyloučena; a

45 dokument WO 91/10 680 A1, který současně se souvisejícím dokumentem EP 1 103 268, je zaměřen na léčbu rakoviny a účinky enterotoxinů umrtvujících zhoubný nádor a příbuzných sloučenin, a který diskutuje obecné podmínky týkající se enterotoxinů Staphylococcus aureus.

#### Podstata vynálezu

50 Nyní budou popsány spíše povšechně rysy a technické výhody předmětného vynálezu pro dosažení podrobného popisu vynálezu, kterému může být tak lépe porozuměno. Také další znaky a výhody vynálezu, které tvoří předmět patentových nároků zaměřených na tento vynález, budou zde dále popsány. Nové rysy, o kterých se předpokládá, že jsou charakteristické pro předkládaný vynález, jak z hlediska organizace, tak z hlediska provedení, společně s dalšími předměty

a výhodami vynálezu, budou pochopitelnější z následujícího podrobného popisu a připojených výkresů.

5 Předkládaný vynález poskytuje konjugát tvořený bakteriálním superantigenem a protilátkovou skupinou, kde superantigenem je stafylokokový enterotoxin (SEE), kde aminokyselinová sekvence superantigenů obsahuje regiony A až E, přičemž region A je vazebné místo TCR a určuje vazbu na TCR, a regiony B až E určují vazbu na MHC molekuly třídy II,

10 kde náhrady dále uvedených aminokyselinových zbytků jsou zavedeny do regionu C: K79E, K81E, K83S, K84S a

15 kde náhrady dále uvedených aminokyselinových zbytků jsou zavedeny do regionu A: R20G, N21T, S24G, R27K, a kde je nebo jsou nahrazeny popřípadě také aminokyseliny v poloze 173 a/nebo v poloze 204 v regionu A, a

kde náhrada D227S(nebo A) je zavedena do regionu E, a

20 kde je nebo jsou dále nahrazen(y) jeden nebo více aminokyselinový(ch) zbytek (zbytky) v polohách 34, 35, 39, 40, 41, 42, 44, 45 a 49 v regionu B a/nebo v polohách 74, 75, 78 v regionu C a/nebo v polohách 187, 188, 189, 190 v regionu D a/nebo v polohách 217, 220, 222, 223, 225 v regionu E,

25 tak, že substituovaný superantigen má redukovanou séroreaktivitu ve srovnání se superantigenem, od kterého je odvozen,

30 a kde protilátkovou skupinou je kompletní protilátka nebo jakýkoliv jiný aktivní fragment protilátky vážící antigen, který je namířen proti povrchové struktuře asociované s nádorovou buňkou.

35 Ve zvláštních provedeních superantigen v konjugátu má aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEQ ID NO: 2 (SEA/E-120).

V dalších provedeních protilátková skupina konjugátu je fragment Fab. Mezi zvláštní fragmenty Fab se zahrnuje C215Fab nebo 5T4Fab.

40 Ve zvláštních provedeních konjugát má aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEQ ID NO: 1.

Jiné provedení se týká konjugátu vysvětleného výše pro použití v léčbě zhoubných nádorů. Zhoubný nádor může být vybrán ze skupiny zahrnující karcinom plic, prsu, tlustého střeva, ledviny, slinivky břišní, vaječníku, žaludku, čípku děložního a prostaty.

Jiné provedení se týká použití konjugátu vysvětleného výše pro výrobu léku pro léčbu zhoubných nádorů. Lék může být určen pro použití intravenózním podáváním pro léčbu zhoubného nádoru.

45 Jiná zvláštní použití poskytují farmaceutický prostředek, který obsahuje terapeuticky účinné množství konjugátu vysvětleného výše.

#### Objasnění výkresů

50 Následující výkresy tvoří součást přítomného popisu a jsou zahrnuty pro další ilustrování některých aspektů předkládaného vynálezu. Vynálezu se může lépe porozumět s odkazem na alespoň jeden z těchto výkresů v kombinaci s podrobným popisem zde uvedených zvláštních provedení.

55

Obr. 1 ukazuje peptidové fragmenty rozpoznávané lidskými anti-SEA, které byly identifikovány z pepsinového trávení SEA/E-18 eluovaného z anti-SEA kolony. Fragmenty se identifikovaly před a po přečištění za použití HPLC s reverzní fází sprážené s hmotovým spektrometrem (MS). Fragmenty zjištěné ve tráveném přípravku při stejném retenčním čase před a po afinitním přečištění se považovaly za pozitivní.

Obr. 2 ukazuje sedm různých identifikovaných peptidů, které jsou uvedeny jako čáry nad aminokyselinovou sekvencí pro SEA/E-120. Světle šedé znaky ukazují, které zbytky byly alterovány v SEA/E-120 ve srovnání s SEA/E-18.

Obr. 3 je strukturální srovnání sekvence SEA, SED a SEH použitých jako templáty pro přípravu komparativního počítačového modelu SEA/E-18. Strukturálně konzervované regiony jsou v černých rámečcích.

Obr. 4 je několikanásobné srovnání sekvencí SEA, SEE, SEA/E-18 a SEA/E-120. Jako čáry umístěné v uspořádání nahoře je označeno pět různých regionů A až E, ve kterých jsou prováděny všechny substituce v SEA/E-120.

Obr. 5 je SEA/E-18 model (černě) složený na SEA (1SXT, šedě).

Obr. 6 jsou regiony SEA/E-18, které korespondují s identifikovanými séroreaktivními peptidy.

Obr. 7 je test blízkosti scintilace (SPA), který měří specifickou vazbu <sup>125</sup>I lidské anti-SEA navázané na C215FabSEA, C215FabSEA/E-18, -65, -97, -109, -110, -113 nebo -120 na anti-myši F(ab)2 konjugovaný s biotinem na streptavidinových PVT korálkách.

Obr. 8A a obr.8B ilustruje schopnost zprostředkovat cytotoxicitu namířenou k zhoubnému nádoru. Obr. 8A ilustruje cytotoxicitu, jak je měřena v testu buněčné cytotoxicity závislé na protilátce proti superantigenů, SADCC. Obr. 8B ukazuje účinnost superantigenů ve zprostředkování zabíjení buněk exprimujících MHC antigeny třídy II T-lymfocyty, což může způsobovat vedlejší účinky v testu buněčné cytotoxicity závislé na superantigenu, SDCC. Všechny nové chiméry snižovaly jejich účinek v SDCC o alespoň jeden log a o až 3 log pro C215FabSEA/E-120.

Obr. 9 je sloupcový diagram SEA/E-120 modelu. Vedlejší řetězce zbytků G20, T21, G24 a K27 jsou znázorněny tmavošedě, vedlejší řetězce zbytků S34, S39, S40, E41, K42, A44, T49, T74, A75, S78, E79, E81, S83 a S84 jsou znázorněny šedě, vedlejší řetězce zbytků T217, S220, T222, S223, S225 jsou znázorněny černě a vedlejší řetězce zbytku S227 jsou znázorněny světle šedě.

Obr. 10 je aminokyselinová sekvence 5T4FabSEA/E-120 (SEQ ID NO: 1) s variabilními částmi z myši 5T4 protilátky a konstantními částmi z myši C242 protilátky. Pozice 1 až 458 je řetězec A a pozice 459 až 672 je řetězec B.

#### 45 Příklady uskutečnění vynálezu

Pokud se v tomto popisu používá podstatné jméno v jednotném čísle, může vyjadřovat totéž podstatné jméno i v čísle množném a naopak. Pokud se v patentovém nároku nebo patentových nárocích používá podstatné jméno ve spojení s výrazem "obsahující" nebo "zahrnující", použité podstatné jméno vyjadřuje jednotné nebo množné číslo. Pokud se zde používá výraz "jiný", znamená alespoň dva neboli více.

Termín "protilátka" jak je zde použit, označuje imunoglobulinovou molekulu, která je schopna se specificky vázat na specifický epitop na antigenu. Jak je zde použit, označuje termín protilátka jakékoliv imunologické vazebné činidlo, jako je IgG, IgM, IgA, IgD a IgE. Protilátkami mohou

jakýkoliv jiný fragment protilátky vážící molekulu, který je namířen proti struktuře asociované s povrchem nádorové buňky.

#### A. Superantigeny

5

Bakteriálním superantigenem používaným podle tohoto vynálezu je SEE. Mezi další bakteriální superantigeny, než byly použity při práci vedoucí k přítomnému vynálezu, patří jiné superantigeny: stafylokokový enterotoxin (SE), Streptococcus pyogenes exotoxin (SPE), toxin asociovaný se syndromem toxického šoku Staphylococcus aureus (TSST-1), streptokokový mitogenní exotoxin (SME) a streptokokový superantigen (SSA). Odborník v oboru je si vědom, že trojrozměrné struktury výše uvedených superantigenů mohou být získány z Protein Data Bank (PDB, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). Dále odborník v oboru může získat sekvence nukleové kyseliny a aminokyselinové sekvence výše uvedených superantigenů a jiných superantigenů z GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>).

15

Superantigenem SEE je nízko-titrový superantigen. Obecně je známo a odborníkem v oboru je chápáno, že lidská séra za normálních okolností obsahují vysoké titry protilátek proti superantigenům. Například pro stafylokokové superantigeny jsou relativní titry TSST-1 > SEB > SEC-1 > SEC-2 > SEA > SED > SEE. Odborník v oboru ví, že tyto relativní titry ukazují na problémy s imunogenicitou a problémy se séroreaktivitou nebo problémy s neutralizačními protilátkami. Proto předkládaný vynález předpokládá použití tohoto nízko-titrového superantigenu SEE, aby se zabránilo séroreaktivitě parenterálně aplikovaných superantigenů.

20

Dále je jasně známo a pochopeno, že proteinové sekvence a imunologická zkřížená reaktivita superantigenů nebo stafylokokových enterotoxinů se dělí do dvou příbuzných skupin. Jedna skupina sestává z SEA, SEE, SED a SEH. Do druhé skupiny patří SPEA, SEC, SEB a SSA. Tak předkládaný vynález také předpokládá použití tohoto nízko-titrového superantigenu SEE pro snížení nebo eliminaci zkřížené reaktivity superantigenů podle předkládaného vynálezu s endogenními protilátkami o vysokém titru proti stafylokokovým enterotoxinům.

25

#### B. Varianty superantigenů

Varianty aminokyselinové sekvence superantigenních proteinů mohou být substituční, inserční nebo deleční varianty. Tyto varianty mohou být přečištěny za použití známých metod, jako je srážení (například síranem amonným), HPLC, iontoměničová chromatografie, afinitní chromatografie (včetně imunoafinitní chromatografie) nebo technik separace podle různých velikostí (sedimentace, gelová elektroforesa, gelová filtrace).

30

Substituční varianty nebo varianty s náhradou jsou obvykle připraveny výměnou jedné aminokyseliny za jinou v jednom nebo více místech proteinu. Substituce mohou být konzervativní, což znamená, že jedna aminokyselina je nahrazena aminokyselinou podobného tvaru a náboje. Konzervativní substituce jsou dobře známé v oboru a patří mezi ně, například záměna: alaninu za serin; argininu za lysin; asparaginu za glutamin nebo histidin; aspartátu za glutamát; cysteinu za serin; glutaminu za asparagin; glutamátu za aspartát; glycinu za prolin; histidinu za asparagin nebo glutamin; isoleucinu za leucin nebo valin; leucinu za valin nebo isoleucin; lysinu za arginin; methioninu za leucin nebo isoleucin; fenylalaninu za tyrosin, leucin nebo methionin; serinu za threonin; threoninu za serin; tryptofanu za tyrosin; tyrosinu za tryptofan nebo fenylalanin; a valinu za isoleucin nebo leucin.

35

Původci tohoto vynálezu tak předpokládají, že v DNA sekvencích genů mohou být provedeny různé změny bez toho, že by došlo k významnější ztrátě biologické aktivity nebo použitelnosti proteinů, jak je popsáno dále. Aktivita je dosahována T-lymfocytárními reakcemi vedoucími k cytotoxicitě pro nádorové buňky. Ještě dále, afinita superantigenu pro MHC molekuly třídy II snížena za minimálního ovlivnění cytotoxicity superantigenu.

40

45

50

55

Při provádění takových změn musí být brán v úvahu hydropatický index aminokyselin. Důležitost hydropatického indexu aminokyselin je prokázána interaktivní biologickou funkcí na protein, jak je v oboru obecně známo (Kyte a Doolittle, 1982). Předpokládá se, že relativní hydropatický charakter aminokyselin ovlivňuje sekundární strukturu výsledného proteinu, která potom definuje interakci proteinu s jinými molekulami, například s enzymy, substráty, receptory, DNA, protilátkami, antigeny a podobně.

Každé aminokyselině může být přiřazen hydropatický index na základě její hydrofobicity a náboje (Kyte a Doolittle, 1982), a tyto indexy jsou: isoleucin (+4,5); valin (+4,2); leucin (+3,8); fenylalanin (+2,8); cystein/cystin (+2,5); methionin (+1,9); alanin (+1,8); glycin (-0,4); threonin (-0,7); serin (-0,8); tryptofan (-0,9); tyrosin (-1,3); prolin (-1,6); histidin (-3,2); glutamát (-3,5); glutamin (-3,5); aspartát (-3,5); asparagin (-3,5); lysin (-3,9); a arginin (-4,5).

V oboru je známo, že některé aminokyseliny mohou být substituovány jinými aminokyselinami majícími podobný hydropatický index nebo skóre a majícími stálý výsledek za zisku proteinu s podobnou biologickou aktivitou, tj. za zisku biologicky funkčně ekvivalentního proteinu. Při provádění takových změn jsou výhodné substituce aminokyselin, jejichž hydropatické indexy jsou výhodně  $\pm 2$ , zvláště výhodně  $\pm 1$  a nejlépe  $+ 0,5$ .

Také je v oboru známo, že substituce podobných aminokyselin může být provedena na základě hydrofilnosti. Patent US 4 554 101 uvádí, že největší lokální průměrná hydrofilnost proteinu, která je určena sousedními aminokyselinami, koreluje s biologickými vlastnostmi proteinu. Jak je podrobně uvedeno v patentu US 4 554 101, jsou aminokyselinovým zbytkům přiřazeny následující hodnoty hydrofilnosti: arginin (+3,0); lysin (+3,0); aspartát ( $+3,0 \pm 1$ ); glutamát ( $+3,0 \pm 1$ ); serin (+0,3); asparagin (+0,2); glutamin (+0,2); glycin (0); threonin (-0,4); prolin ( $-0,5 + 1$ ); alanin (-0,5); histidin (-0,5); cystein (-1,0); methionin (-1,3); valin (-1,5); leucin (-1,8); isoleucin (-1,8); tyrosin (-2,3); fenylalanin (-2,5); tryptofan (-3,4).

Je třeba si uvědomit, že aminokyselina může být substituována za jinou aminokyselinu mající podobnou hydrofilnost a přesto se získá biologicky a imunologicky ekvivalentní protein. Při takových záměnách jsou preferovány substituce aminokyselin, jejichž hodnoty hydrofilnosti jsou výhodně  $\pm 2$ , zvláště výhodně  $\pm 1$  a nejlépe  $\pm 0,5$ .

### C. Fúzní proteiny

Speciálním typem inserční varianty je fúzní protein. Tato molekula obvykle obsahuje všechny nebo významné části původní molekuly, které jsou navázané na N- nebo C-konec, na celý nebo na část druhého polypeptidu. Například fúzní protein podle předkládaného vynálezu obsahuje přidanou imunologicky aktivní doménu, jako je protilátkový fragment, pro zacílení nádorových buněk.

Dále, použití místa pro štěpení v místě nebo poblíž místa spojení fúzních částí usnadní odstranění cizího polypeptidu po přečištění. Dalšími výhodnými fúzemi je navázání funkčních domén, jako jsou aktivní místa pro enzymy, glykosylační domény nebo jiné buněčné zaměřovací signály nebo transmembránové regiony.

### D. Přesmyk domén

Zajímavá série variant může být vytvořena substituováním homologních regionů různých proteinů. Toto je známo – v určitém kontextu – jako "přesmyk domén".

Přesmyk domén zahrnuje tvorbu chimérické molekuly za použití odlišných, ale – v tomto případě – příbuzných polypeptidů. Porovnáním různých SAg proteinů je možné provést odhad toho, jak jsou tyto regiony molekuly funkčně významné. Potom je možné vyměnit příbuzné domény

molekul a určit vliv těchto domén na funkce SAg. Takové "chiméry" jsou dále výhodné v tom, že mohou být odlišeny od přirozených molekul a zároveň mají stejnou funkci.

#### E. Přečištění proteinů

5

Je žádoucí přečistit SAg nebo jeho varianty. Techniky pro přečištění proteinů jsou dobře známé odborníkům v oboru. Tyto techniky zahrnují, na jedné straně, surovou frakcionaci buněčné drtě na peptidové a nepeptidové frakce. Po separování proteinu od dalších proteinů může být vybraný protein dále přečištěn za použití chromatografických a elektroforetických technik, za dosažení

10 částečného nebo kompletního přečištění (nebo přečištění do homogenity). Analytickými metodami zejména vhodnými pro přípravu čistého peptidu jsou iontoměničová chromatografie, vylučovací chromatografie, elektroforesa na polyakrylamidovém gelu; isoelektrické fokusování. Zejména účinnou metodou pro přečištění peptidu je rychlá kapalinová chromatografie pro proteiny nebo HPLC.

15

Některé aspekty předkládaného vynálezu se týkají přečištění, a v některých aspektech významného přečištění, kódovaného proteinu nebo peptidu. Termín "přečištěný protein nebo peptid", jak je zde použit, označuje přípravek, izolovaný od jiných složek, ve kterém je protein nebo peptid přečištěný na jakýkoliv stupeň ve srovnání s jakýmkoliv stavem, ve kterém je možno

20 jej získat z přirozeného materiálu. Přečištěný protein nebo peptid je proto také protein nebo peptid, který je izolován z prostředí, ve kterém se obvykle vyskytuje.

Termín "přečištěný" označuje proteinový nebo peptidový přípravek, který byl zpracován frakcionací pro odstranění různých dalších složek, kde tento přípravek si v podstatě zachovává

25 svou biologickou aktivitu. Když je použit termín "významně přečištěný", tak tento termín označuje přípravek, ve kterém protein nebo peptid tvoří hlavní složku přípravku, například tvoří přibližně 50 %, přibližně 60 %, přibližně 70 %, přibližně 80 %, přibližně 90 %, přibližně 95 % nebo více proteinu v přípravku.

30 V oboru jsou známy různé metody pro kvantifikování stupně přečištění proteinu nebo peptidu. Mezi takové metody patří, například, stanovení specifické aktivity aktivní frakce nebo hodnocení množství polypeptidu ve frakci SDS/PAGE analýzou. Výhodnou metodou pro hodnocení čistoty frakce je vypočtení specifické aktivity frakce a srovnání této aktivity se specifickou aktivitou původního extraktu a podle tohoto srovnání se může určit stupeň čistoty, který je zde hodnocen

35 jako "násobek přečištění". Skutečné jednotky použité pro vyjádření aktivity budou samozřejmě závislé na vybrané testovací metodě a na tom, zda exprimovaný protein nebo peptid vykazuje detekovatelnou aktivitu.

Odborníkům v oboru budou známy různé techniky pro přečištění proteinů. Mezi takové techniky patří, například, srážení síranem amonným, PEG, protilátkami a podobně nebo tepelnou denaturací, po které následuje odstředění; chromatografické stupně, jako je iontová výměna, gelová filtrace, reversní fáze, hydroxyapatitová a afinitní chromatografie; iso-elektrické fokusování; gelová elektroforesa; a kombinace takových a dalších technik. V oboru je známo, že

40 pořadí jednotlivých stupňů přečišťování se může měnit, nebo že některé kroky mohou být vynechány, a stále se jedná o metodu vhodnou pro přípravu významně přečištěného proteinu nebo peptidu.

Je známo, že migrace polypeptidu může být různá, někdy značně, při použití různých podmínek SDS/PAGE (Capaldi et al., 1977). Proto je jasné, že za různých elektroforetických podmínek

50 mohou být zřetelné molekulové hmotnosti přečištěných nebo částečně přečištěných produktů exprese různé.

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) je charakterizována velmi rychlou separací s mimořádným rozlišením pík. Tohoto je dosaženo pomocí použití velmi jemných částic

55 a vysokého tlaku pro udržení adekvátního průtoku. Separace může být provedena v řádu minut



nebo maximálně několika hodin. Kromě toho je potřeba vzorek velmi malého objemu, protože částice jsou tak malé a těsně u sebe, že objem pórů je velmi malou frakcí objemu lože. Také koncentrace vzorku nemusí být příliš velká, protože proužky jsou tak úzké, že je potřeba velmi malé ředění vzorku.

5

Gelová chromatografie, nebo chromatografie s molekulovými sítí, je specifickým typem rozdělovací chromatografie, která je založena na molekulové velikosti. Teoretickým základem gelové chromatografie je to, že kolona, která je připravená s jemnými částicemi inertní substance, které obsahují malé póry, separuje větší molekuly od menších molekul při jejich průchodu póry, kde rychlost tohoto průchodu závisí na velikosti molekul. Protože materiál, ze kterého jsou částice připraveny, neabsorbuje molekuly, je jediným faktorem ovlivňujícím rychlost průchodu velikost molekul. Proto jsou molekuly eluovány z kolony s klesající velikostí, protože jejich tvar je relativně konstantní. Gelová chromatografie je nepřekonatelná pro separování molekul různých velikostí, protože separace je nezávislá na jiných faktorech, jako je pH, iontová síla, teplota atd. Při této metodě se také prakticky nevyskytuje žádná absorpce, je přítomno menší rozšíření zón a eluční objem je v přímém vztahu s molekulovou hmotností.

Afinní chromatografie je chromatografickou metodou, která spočívá ve specifické afinitě mezi substancí, která má být izolována, a molekulou, která se na ní může specificky vázat. Jedná se o interakci typu receptor–ligand. Materiál v koloně je připraven pomocí kovalentního navázání jednoho z vazebných partnerů na nerozpustnou matici. Materiál kolony je potom schopen specificky adsorbovat substancí z roztoku. Eluce probíhá změnou podmínek na takové, při kterých k vazbě nedochází (změna pH, iontové síly, teploty atd.).

#### 25 F. Mutagenese variant

Předkládaný vynález předpokládá, že modifikace afinity superantigeny pro MHC molekuly třídy II může snížit toxicitu superantigeny. Snížená afinita pro MHC molekuly třídy II má za výsledek sníženou séroreaktivitu nebo sníženou reakci s neutralizačními protilátkami nebo endogenními nebo dříve vytvořenými protilátkami.

V konkrétních provedeních je mutagenese použita pro modifikaci regionu superantigeny, který určuje vazbu na MHC molekulu třídy II. Mutagenese se může provést za použití některé ze standardních technik mutagenese. Mutace je proces, při kterém dochází ke změně v kvantitě nebo struktuře organismu. Mutací může být modifikace nukleotidové sekvence jediného genu, bloků genů nebo celého chromosomu. Změny v jednotlivých genech mohou být následkem bodových mutací, při kterých dochází k odstranění, přidání nebo substituci jediné nukleotidové báze v DNA sekvenci, nebo mohou být následkem změn, jako je inserce nebo delece většího počtu nukleotidů.

Jednou zejména výhodnou technikou mutagenese je alaninová skenovací mutagenese, při které je určitý počet zbytků substituován jednotlivě aminokyselinou alaninem tak, že mohou být určeny vlivy interakcí odstraněných vedlejších řetězců za minimalizace rizika větších změn v konformaci proteinu (Cunningham et al., 1989).

V posledních letech byly vyvinuty techniky pro hodnocení rovnovážné konstanty pro vazbu ligandu za použití malých množství proteinu (patenty US 5 221 605 a US 5 238 808). Schopnost provádět funkční testy za použití malých množství materiálu může být využita pro vysoce účinné in vitro techniky saturační mutagenese protilátek. Předkladatelé vynálezu obešli kroky klonování kombinací PCR mutagenese a in vitro transkripce/translace pro přípravu mutantních proteinů s vysokým výtěžkem. Zde jsou produkty PCR použity přímo jako templaty pro in vitro transkripce/translaci mutantní jednořetězcové protilátky. V důsledku vysoké účinnosti, se kterou může být nyní připraveno a analyzováno všech 19 aminokyselinových substitucí je nyní možné provést saturační mutagenesi mnoha zbytků a tento proces se označuje jako in vitro saturační skenovací mutagenese (Burks et al., 1997).

55

In vitro skenovací saturační mutagenese je rychlou metodou pro získání velkých množství informací o struktuře–funkci, včetně: (i) identifikace zbytků, které modulují specifitu vazby ligandu; (ii) lepší pochopení vazby ligandu podle identifikace těch aminokyselin, které zachovávají aktivitu a těch, které ruší aktivity v dané lokalizaci; (iii) hodnocení celkové plasticity aktivního místa nebo proteinové subdomény; (iv) identifikace aminokyselinových substitucí, které vedou ke zvýšené vazbě.

Strukturálně řízená místně cílená mutagenese představuje účinný nástroj pro zjištění a upravování interakcí protein–ligand (Wells, 1996, Braisted et al., 1996). Technika umožňuje přípravu a testování variant sekvence pomocí vkládání jedné nebo více změn nukleotidové sekvence do vybrané DNA.

Místně specifická mutagenese využívá specifické oligonukleotidové sekvence, které kódují DNA sekvence s požadovanou mutací, stejně jako dostatečný počet sousedních, nemodifikovaných nukleotidů. Tímto způsobem je poskytnuta průměrná sekvence dostatečně dlouhá a komplexní pro to, aby vytvářela stabilní dvojšroubovici na obou stranách delece, která má být spojena. Výhodné jsou primery délky přibližně 17 až 25 nukleotidů, s přibližně 5 až 10 zbytky na obou stranách sekvence, která je změněna.

Technika obvykle využívá bakteriofagový vektor, který existuje jak v jednořetězcové, tak ve dvouřetězcové formě. Vektory použitelné v místně cílené mutagenesi jsou vektory jako je M13 fág. Tyto fagové vektory jsou komerčně dostupné a jsou známé odborníkům v oboru. Dvouřetězcové plazmidy se také běžně používají v místně cílené mutagenesi. Což eliminuje krok přenosu vybraného genu z fágu do plazmidu.

Obecně, nejprve se připraví jednořetězcový vektor, nebo se rozvolní dva řetězce dvouřetězcového vektoru, který obsahuje ve své sekvenci DNA kódující požadovaný protein nebo genetický element. Oligonukleotidový primer nesoucí požadovanou mutovanou sekvenci, připravený synteticky, se potom tepelně zpracuje s přípravkem jednořetězcové DNA, přičemž se berou v úvahu počty chyb, které jsou dány výběrem podmínek hybridizace. Hybridizovaný produkt se potom zpracuje DNA polymerizujícími enzymy, jako je E. coli polymeráza I (Klenow fragment) pro dokončení syntézy řetězce nesoucího mutaci. Takto vznikne heteroduplex, ve kterém jeden řetězec kóduje původní nemutovanou sekvenci a druhý duplex nese požadovanou mutaci. Tento heteroduplexní vektor se potom použije pro transformaci vhodných hostitelských buněk, jako jsou E. coli buňky, a vyberou se klony, které obsahují rekombinantní vektory nesoucí mutovanou sekvenci.

Důkladná informace o funkčním významu a informačním obsahu daného zbytku se získá nejlépe saturační mutagenesí, při které se hodnotí všech 19 aminokyselinových substitucí. Nevýhodou této techniky je to, že logistika multizbytkové saturační mutagenese je sklíčující (Warren et al., 1996, Brown et al., 1996; Zeng et al., 1996; Burton a Barbas, 1994; Yelton et al., 1995; Jackson et al., 1995; Short et al., 1995; Wong et al., 1996; Hilton et al., 1996). Musí být studovány stovky a někdy i tisíce místně specifických mutantů. Nicméně, lepší techniky umožňují rychlejší a snadnější skrining mutantů. Viz též patenty US 5 796 208 a US 5 830 650, kde je popsána "walkthrough" mutagenese.

Další metody místně cílené mutagenese jsou popsány v patentech US 5 220 007; US 5 284 760; US 5 354 670; US 5 366 878; US 5 389 514; US 5 635 377; a US 5 789 166.

Kromě biologicky funkčních ekvivalentů, které jsou produkovány za použití technik mutagenese popsaných výše, původci tohoto vynálezu také předpokládají, že mohou být připraveny strukturálně podobné sloučeniny, které napodobují klíčové části superantigenu nebo konjugátu podle předkládaného vynálezu. Takové sloučeniny, které mohou být označovány jako peptidomimetika, mohou být použity stejným způsobem jako konjugáty podle předkládaného vynálezu a také jsou tedy funkčními ekvivalenty.

Některá mimetika, která napodobují některé rysy sekundární a terciární struktury proteinu, popsal Johnson et al. (1993). Podkladem pro použití peptidových mimetik je to, že peptidový skelet proteinu existuje proto, aby orientoval aminokyselinové vedlejší řetězce tak, aby byly usnadněny molekulové interakce, jako jsou interakce protilátky a/nebo antigenu. Peptidové mimetikum je proto navrženo tak, aby umožnilo molekulové interakce podobné interakcím původní molekuly.

Některé úspěšné aplikace konceptu peptidomimetik se zaměřily na napodobení  $\beta$ -smyček v proteinech, o kterých je známo, že jsou vysoce antigenní. Pravděpodobná  $\beta$ -struktura v polypeptidu může být předpovězena počítačovým algoritmem, jak je zde popsáno. Jakmile jsou určeny aminokyselinové složky smyčky, mohou být připravena mimetika mající podobnou prostorovou orientaci základních elementů aminokyselinových vedlejších řetězců.

Jiné přístupy se zaměřily na použití malých proteinů obsahujících mnoho disulfidových vazeb jako atraktivních strukturálních templátů pro produkci biologicky aktivní konformace, která napodobuje vazebné místo většího proteinu (Vita et al. (1998). Strukturální motiv, který se zdá být evolučně konzervovaný v některých toxinech, je malý (30 až 40 aminokyselin), stabilní a vysoce permissivní pro mutace. Tento motiv se skládá z beta listu a alfa šroubovice, která je přemostěna ve vnitřním jádru třemi disulfidovými vazbami.

Beta II smyčky byly úspěšně napodobeny za použití cyklických L-pentapeptidů a D-aminokyselin (Weisshoff et al., 1999). Též Johannesson et al. (1999) popsali bicyklické tripeptidy s vlastnostmi indukujícími reverzní smyčku.

V oboru jsou popsány způsoby pro generování specifických struktur. Například, alfa-helix mimetika jsou popsána v patentech US 5 446 128; US 5 710 245; US 5 840 833; a US 5 859 184. Tyto struktury činí peptid nebo protein více termálně stabilním a zvyšují rezistenci k proteolytické degradaci. Jsou popsány šesti, sedmi, jedenácti, dvanácti, třinácti a čtrnáctičlenné kruhové struktury.

Jsou popsány způsoby pro přípravu konformačně restrihovaných beta smyček a beta výčnělků, například, v patentech US 5 440 013; US 5 618 914; US 5 670 155. Beta-smyčky umožňují změnu vedlejších substituentů bez odpovídající změny skeletu a mají vhodné konce pro inkorporaci do peptidu pomocí standardních syntetických procesů. Mezi další typy mimetik patří reversní a gamma smyčky. Mimetika reverzní smyčky jsou popsána v patentech US 5 475 085 a US 5 929 237, a mimetika gamma smyčky jsou popsána v patentech US 5 672 681 a US 5 674 976.

#### G. Expres superantigenů

Předkládaný vynález také zahrnuje použití expresních vektorů a hostitelské buňky. Tyto expresní vektory, které byly geneticky upraveny tak, aby obsahovaly sekvence nukleové kyseliny konjugátu, jsou vloženy nebo transformovány do hostitelské buňky tak, aby došlo k produkci konjugátu podle předkládaného vynálezu.

Hostitelské buňky mohou být geneticky upraveny tak, aby inkorporovaly sekvence nukleové kyseliny a exprimovaly peptidy podle předkládaného vynálezu. Vložení sekvencí nukleové kyseliny do hostitelské buňky může být provedeno transfekcí fosforečnanem vápenatým, DEAE-dextranem zprostředkovanou transfekcí, transvekcí, mikroinjekcí, transfekcí zprostředkovanou kationtovými lipidy, elektroporací, transdukcí, vnesením pomocí nástroje, balistickým vnesením, infekcí nebo jinou technikou. Takové techniky jsou popsány v mnoha standardních laboratorních manuálech, jako je Davis, et al., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986) a Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Reprezentativními příklady vhodných hostitelských buněk jsou bakteriální buňky, jako jsou streptokoky, stafylokoky, *B. coli*, *Streptomyces* a *Bacillus subtilis*; houby, jako jsou kvasinky a aspergily; hmyzí buňky, jako jsou *Drosophila S2* a *Spodoptera Sf9* buňky; živočišné buňky, jako jsou CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293 a Bowes melanomové buňky.

5

## II. Protinádorová léčba

V předkládaném vynálezu je superantigen konjugován na protilátku nebo fragment protilátky pro zacílení a destrukci nádorových buněk. Příklady nádorů, na které však výčet není omezen, jsou nádory plic, prsu, tlustého střeva, ledvin, slinivky břišní, vaječníků, žaludku, čípku děložního a prostaty.

10

V jednom aspektu předkládaného vynálezu musí nádorové buňky nést nějaký marker, který je vhodný pro zaměření, není přítomný na většině dalších buněk. Existuje mnoho nádorových markerů a jakýkoliv z nich může být vhodný pro zaměření v kontextu předkládaného vynálezu. Specifickými cíli podle předkládaného vynálezu jsou protilátky. Protilátky, které jsou brány v úvahu v předkládaném vynálezu, jsou například Fab fragmenty; na ně však výčet není omezen. Příklady Fab fragmentů jsou C215Fab nebo ST4Fab. Kromě Fab patří mezi další obvyklé nádorové markery karcinoembryonální antigen, prostatický specifický antigen, antigen asociovaný s nádory močového traktu, fetální antigen, tyrosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, Sialyl Lewis antigen, MucA, MucB, PLAP, estrogenový receptor, lamininový receptor, erb B a p155.

15

20

Předpokládá se, že předmět podle předkládaného vynálezu může být aplikován na pacientovi trpícím nádorovým nebo proliferativním onemocněním. Dávkou podanou pacientovi je terapeuticky účinné množství nebo množství, které vede k léčbě nádoru nebo onemocnění. Podání konjugátu může být parenterální nebo alimentární cestou. Příklady alimentárních cest jsou orální, rektální, sublinguální a bukální podání, na které však výčet není omezen. Příklady parenterálních podání jsou, aniž by na ně byly omezeny, intraperitoneální, intravenózní, podkožní, intramuskulární, intradermální, intratumorální a intravaskulární podání.

25

30

## III. Farmaceutické prostředky

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou být použity samostatně nebo společně s dalšími sloučeninami, jako jsou terapeutické sloučeniny.

35

Mezi farmaceutické formy vhodné pro injekční použití patří sterilní vodné roztoky a/nebo disperze; prostředky obsahující sezamový olej, podzemnicový olej a/nebo vodný roztok propylenglykolu; a/nebo sterilní prášky pro okamžitou přípravu sterilních injekčních roztoků a/nebo disperzí. Ve všech případech musí být forma sterilní a/nebo musí být dostatečně tekutá pro to, aby jí bylo možné snadno podat injekční stříkačkou. Forma musí být stabilní za podmínek výroby a/nebo skladování a/nebo musí být chráněna před kontaminujícím účinkem mikroorganismů, jako jsou bakterie a/nebo houby.

40

Roztoky aktivní sloučeniny ve formě volné báze a/nebo farmakologicky přijatelné soli mohou být připraveny ve vodě vhodně smíšené se surfaktantem, jako je hydroxypropylcelulóza. Disperze mohou být připraveny v glycerolu, kapalném polyethylenglykolu, a/nebo jejich směsi a/nebo v oleji. Za běžných podmínek skladování a/nebo použití obsahují tyto přípravky konzervační činidla pro zabránění růstu mikroorganismů.

45

50

Konjugát podle předkládaného vynálezu může být použit v prostředku v neutrální formě a/nebo ve formě soli. Mezi farmaceuticky přijatelné soli patří adiční soli s kyselinami (tvořené s volnými aminoskupinami proteinu) a/nebo soli tvořené s anorganickými kyselinami, jako je například kyselina chlorovodíková a/nebo fosforečná, a/nebo s takovými organickými kyselinami, jako je kyselina octová, šťavelová, vinná, mandlová a podobně. Soli tvořené s volnými karboxylovými

55

skupinami mohou být také odvozeny od anorganických bází, jako jsou například hydroxid sodný, draselný, amonný, vápenatý a/nebo železitý, a/nebo od organických bází, jako je isopropylamin, trimethylamin, histidin, prokain a/nebo podobně. Pro použití peptidových terapeutik jako aktivních složek může být použita technologie z patentů US 4 608 251; US 4 601 903; 5 US 4 599 231; US 4 599 230; US 4 596 792; a/nebo 4 578 770.

Nosičem může být také rozpouštědlo a/nebo disperzní médium obsahující například vodu, ethanol, polyol (například glycerol, propylenglykol a/nebo kapalný polyethylenglykol a/nebo podobně), jejich vhodné směsi a/nebo rostlinné oleje. Správná tekutost může být udržována 10 například použitím potahu, jako je lecitin, dodržáním správné velikosti částic v případě disperzí a/nebo pomocí použití surfaktantů. Prevence růstu mikroorganismů může být dosažena přidáním různých antibakteriálních a/nebo antimykotických činidel, například parabenů, chlorbutanolu, fenolu, kyseliny sorbové, thimerosalu a/nebo podobně. V mnoha případech je vhodné přidat 15 činidlo upravující isotonicitu, například sacharidy a/nebo chlorid sodný. Prodloužené absorpce injekčních přípravků lze dosáhnout použitím činidel oddalujících absorpci, například monostearátu hlinitého a/nebo želatiny.

Sterilní injekční roztoky se připraví inkorporováním požadovaného množství aktivní sloučeniny do vhodného rozpouštědla s různými dalšími přísadami uvedenými výše, a potom se provede 20 sterilizace. Obecně, disperze se připraví inkorporováním různých sterilizovaných aktivních složek do sterilního vehikula, které obsahuje základní disperzní médium a/nebo vybrané další složky ze složek uvedených výše. V případě sterilních prášků pro přípravu sterilních injekčních roztoků je výhodným způsobem přípravy sušení ve vakuu a/nebo lyofilizace, které vedou k získu 25 prášku aktivní složky s jakoukoliv další přísadou z předem sterilně přefiltrovaného roztoku těchto složek. Příprava více, a/nebo vysoce, koncentrovaných roztoků pro přímou injekci je také možná a použije se při ní DMSO jako rozpouštědlo, protože se tak dosáhne extrémně rychlé penetrace, dodání vysokých koncentrací aktivních složek do malé oblasti.

Po přípravě prostředku se roztoky aplikují způsobem kompatibilním s formou přípravku a/nebo 30 v takovém množství, které je terapeuticky efektivní. Prostředky mohou být snadno podány v různých dávkových formách, jako typy injekčních roztoků popsané výše, ale mohou být také použity kapsle uvolňující léčivo a podobné formy.

Pro parenterální podání ve vodném roztoku by roztok měl být vhodně pufrovaný, pokud je to 35 nutné, a/nebo by měl být naředěný salinickým roztokem a/nebo glukózou, aby byl izotonický. Uvedené vodné roztoky jsou zejména vhodné pro intravenózní, intramuskulární, podkožní a/nebo intraperitoneální podání. Sterilní vodná média, která mohou být použita pro tento účel, jsou známá odborníkům v oboru. Například, jedna dávka může být rozpuštěna v 1 ml izotonického NaCl roztoku a/nebo může být přidána do 1000 ml hypodermoklyzační tekutiny a/nebo může být 40 injikována ve vybraném místě infuze (viz, například, Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, strany 1035–1038 a/nebo 1570–1580). V dávce se budou vyskytovat určité variace, v závislosti na stavu léčeného jedince. Osoba zodpovědná za aplikaci v každém případě určí dávku vhodnou pro konkrétního jedince.

45 Aktivní konjugát a/nebo činidla mohou být formulována v terapeutické směsi tak, že prostředek obsahuje přibližně 0,0001 až 1,0 mg, a/nebo přibližně 0,001 až 0,1 mg, a/nebo přibližně 0,1 až 1,0 a/nebo i přibližně 10 mg na dávku. Může být aplikováno více dávek.

Kromě sloučenin formulovaných pro parenterální podání, jako je intravenózní, intraartikulární 50 a/nebo intramuskulární injekce, patří mezi další farmaceuticky přijatelné formy například tablety a/nebo jiné pevné přípravky pro orální podání; liposomální přípravky; kapsle s načasovaným uvolňováním; a/nebo jakékoliv další v současnosti používané formy, včetně krémů.

55 V předkládaném vynálezu je také možno použít nasálních roztoků a/nebo sprayů, aerosolů a/nebo inhalačních přípravků. Nasální roztoky jsou obvykle vodné roztoky určené k podání do nosních

průduchů ve formě kapek a/nebo sprayů. Nasální přípravky jsou připraveny tak, že jsou v mnoha ohledem podobné nasálnímu sekretu, takže je zachována normální funkce řasinkového epitelu. Proto jsou nasální roztoky obvykle isotonické a/nebo mírně pufované tak, aby měly pH 5,5 až 6,5. Kromě toho mohou nasální prostředky obsahovat antimikrobiální konzervační látky, podobné, jako jsou látky používané v oftalmologických přípravcích. Jsou známé různé komerční nasální prostředky a patří mezi ně, například, antibiotika a/nebo antihistaminika a/nebo léčiva pro profylaxi astmatu.

Dalšími přípravky, které jsou vhodné pro jiné způsoby podání, jsou vaginální čípky a/nebo pesary. Také mohou být použity rektální čípky a/nebo pesary. Čípky jsou pevné dávkové formy různé hmotnosti a/nebo tvaru, které obvykle obsahují medikaci a které se zavádějí do rekta, vagíny a/nebo urethry. Po zavedení čípek měkne, taje a/nebo se rozpouští v dutině. Pro čípky mohou být použity tradiční pojiva a/nebo nosiče, jako jsou, například, polyalkylenglykoly a/nebo triglyceridy; takové čípky mohou být připraveny ze směsí obsahujících aktivní složku v množství 0,5 až 10 %, výhodně 1 až 2 %.

Orální prostředky obsahují běžně používané přísady, jako jsou, například, mannitol, laktóza, škrob, magnesium–stearát, natrium–sacharin, celulóza, uhličitan horečnatý a podobně, vše farmaceutické čistoty. Tyto prostředky mohou mít formu roztoků, suspenzí, tablet, pilulek, kapslí, prostředků se zpomaleným uvolňováním a/nebo prášků. V některých definovaných provedeních obsahuje orální farmaceutický prostředek inertní ředidlo a/nebo požitelný nosič, nebo mohou být prostředky obaleny v měkké nebo tuhé želatinové kapsli, lisovány do tablet, a/nebo mohou být přímo zapracovány do potravy. Pro orální terapeutické podání mohou být aktivní sloučeniny ve směsi s přísadami a/nebo mohou být použity ve formě požitelných tablet, bukálních tablet, pastilek, kapslí, elixírů, suspenzí, sirupů, oplátek a podobně. Takové prostředky a/nebo přípravky by měly obsahovat alespoň 0,1 % aktivní sloučeniny. Procentuální obsah v prostředku nebo přípravku může být různý, ale obvykle je v rozmezí od přibližně 2 do přibližně 75 % hmotnosti dávkové jednotky, nebo mezi 25 až 60 %. Množství aktivních sloučenin v takových terapeuticky použitelných přípravcích je takové, aby mohlo být dosaženo vhodné dávky.

Tablety, pastilky, pilulky, kapsle a podobně mohou také obsahovat následující složky: pojivo, jako je tragant, arabská klovatina, kukuřičný škrob a/nebo želatina; přísady, jako je fosforečnan vápenatý; činidlo podporující rozpadavost, jako je kukuřičný škrob, bramborový škrob, kyselina alginová a podobně; kluzné činidlo, jako je magnesium–stearát; a/nebo sladidlo, jako je sacharóza, laktóza a/nebo sacharin; a/nebo chuťové korigens, jako je pepermint, mátová silice a/nebo třešňová příchut'. Když je dávkovou jednotkou kapsle, tak může obsahovat kromě materiálů uvedených výše, kapalný nosič. Mohou být použity různé další materiály, ve formě potahů a/nebo jako materiály jinak modifikující fyzikální formu dávkové jednotky. Například tablety, pilulky a/nebo kapsle mohou být potaženy šelakem, sacharidem nebo oběma. Sirup nebo elixír může obsahovat kromě aktivní složky sacharózu jako sladidlo, methyl a/nebo propylparabeny jako konzervační činidlo, a barvivo a/nebo chuťové korigens, jako je třešňová a/nebo pomerančová příchut'.

V některých provedeních se předpokládá použití lipidových přípravků a/nebo nanokapslí pro podání konjugátu a/nebo činidel a/nebo vektorů pro genovou terapii, včetně přirozených a/nebo protismyslných vektorů, do hostitelské buňky.

Nanokapsle mohou obecně zachycovat sloučeninu stabilním a/nebo reprodukovatelným způsobem. Pro eliminaci vedlejších účinků způsobených nadměrným intracelulárním obsahem polymeru by měly být použity ultrajemné částice (velikosti okolo 0,1  $\mu\text{m}$ ) a měly by být použity polymery, které mohou být degradovány in vivo. Biodegradovatelné polyalkylkyanakrylátové nanočástice splňují tyto požadavky a mohou být použity v předkládaném vynálezu a/nebo mohou být takové částice snadno vyrobeny.

V jednom provedení předkládaného vynálezu může být konjugát asociován s lipidem. Konjugáty asociované s lipidy mohou být enkapsulované ve vodném nitru liposomu, v lipidové dvojvrstvě liposomu, mohou být navázány na liposom pomocí spojovací molekuly, která je asociovaná s liposomem i oligonukleotidem, mohou být zachyceny v liposomu, mohou být v komplexu s liposomem, mohou být dispergovány v roztoku obsahujícím lipid, mohou být ve směsi s lipidem, mohou být obsaženy jako suspenze v lipidu, mohou být obsaženy v komplexu s lipidem nebo mohou být jinak asociovány s lipidem. Lipidové nebo lipid/konjugát asociované prostředky podle předkládaného vynálezu nejsou omezeny na jakoukoliv strukturu v roztoku. Například mohou být ve formě dvouvrstvé struktury, ve formě micely nebo ve formě kolabované struktury. Mohou být také pouze volně uloženy v roztoku, což umožní tvorbu agregátů, které nemají uniformní tvar ani velikost.

Lipidy jsou mastné substance, a mohou být syntetické nebo přirozené. Lipidy jsou například mastné kapky, které se v přirozeném stavu vyskytují v cytoplazmě, stejně jako sloučeniny, které jsou dobře známé odborníkům v oboru a kterými jsou alifatické uhlovodíky s dlouhým řetězcem a jejich deriváty, jako jsou mastné kyseliny, alkoholy, aminy, aminoalkoholy a aldehydy.

Fosfolipidy mohou být použity pro přípravu liposomu podle předkládaného vynálezu a mohou mít pozitivní, negativní nebo neutrální elektrický náboj. Diacetylfosfát může být použit pro dosažení negativního náboje na liposomech a stearylamin může být použit pro dosažení pozitivního náboje na liposomech. Liposomy mohou být připraveny z jednoho nebo více fosfolipidů.

Neutrálně nabitým lipidem může být lipid bez náboje, lipid s malým nábojem nebo směs lipidů se stejným počtem pozitivních a negativních nábojů. Mezi fosfolipidy patří fosfatidylcholin a další lipidy známé odborníkům v oboru.

Lipidy vhodné pro použití v předkládaném vynálezu mohou být získány z komerčních zdrojů. Například, dimyristylfosfatidylcholin ("DMPC") může být získán od Sigma Chemical Co., dicetylfosfát ("DCP") může být získán od K and K Laboratories (Plainview, NY); cholesterol ("Chol") může být získán od Calbiochem-Behring; dimyristylfosfatidylglycerol ("DMPG") a další lipidy mohou být získány od Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). Zásobní roztoky lipidů v chloroformu nebo chloroformu/methanolu mohou být skladovány při přibližně  $-20^{\circ}\text{C}$ . Výhodně se jako jediné rozpouštědlo použije chloroform, protože je možno jej snadněji odpařit než methanol.

Fosfolipidy z přirozených zdrojů, jako jsou vaječné nebo sójové fosfolipidy, mozková kyselina fosfatidová, mozkový nebo rostlinný fosfatidylinositol, srdeční kardiolipin a rostlinný nebo bakteriální fosfatidylethanolamin, nejsou používány jako primární fosfatid, tj. tvoří 50 % nebo více celkových fosfatidů, protože jsou nestabilní a způsobují propustnost výsledných liposomů.

Fosfolipidy mohou vytvářet různé struktury jiné než liposomy, když jsou dispergovány ve vodě, v závislosti na molárním poměru lipidu a vody. Při nízkých poměrech je liposom výhodnou strukturou. Fyzikální charakteristiky liposomů závisí na pH, iontové síle a/nebo na přítomnosti divalentních kationtů. Liposomy mohou vykazovat nízkou permeabilitu pro iontové a/nebo polární substance, ale při zvýšené teplotě u nich může docházet k fázovému přechodu, který značně zvyšuje jejich permeabilitu. Fázovým přechodem je změna z pevně složené, pravidelné struktury, která se označuje jako gelový stav, na méně sbalenou, méně pravidelnou strukturu, která se označuje jako kapalný stav. K tomuto dochází při charakteristické teplotě fázového přechodu a výsledkem je zvýšení permeability pro ionty, sacharidy a/nebo léčiva.

Liposomy interagují s buňkami čtyřmi různými mechanismy: endocytosou fagocytárními buňkami retikuloendotelového systému, jako jsou makrofágy a/nebo neutrofil; adsorpcí na povrch buněk, zprostředkovanou buď nespecifickými slabými hydrofobními a/nebo elektrostatickými silami, nebo specifickými interakcemi se složkami buněčného povrchu; fúzí

s plazmatickou buněčnou membránou, která probíhá prostřednictvím inserce lipidové dvojvrstvy liposomu do plazmatické membrány, se simultánním uvolněním obsahu liposomu do cytoplazmy; a/nebo přenosem liposomálních lipidů do buněčných a/nebo subcelulárních membrán, a/nebo naopak, bez jakékoliv asociace obsahu liposomu. Podle změny složení liposomu se může měnit mechanismus interakce, ačkoliv tyto mechanismy mohou být souběžné.

Liposomy–zprostředkované podání oligonukleotidů a exprese cizorodé DNA in vitro byly velmi úspěšné. Wong et al., (1980) prokázali proveditelnost liposomy–zprostředkované aplikace a exprese cizorodé DNA v kultivovaných kuřecích embryích, HeLa a hepatomových buňkách. Nicolau et al., (1987) provedli úspěšný liposomy zprostředkovaný genový přenos u krys po intravenózní injekci.

V některých provedeních předkládaného vynálezu může být lipid asociovaný s hemaglutinačním virem (HVJ). Bylo prokázáno, že toto usnadňuje fúzi s buněčnou membránou a podporuje vstup DNA obalené v liposomu (Kaneda et al., 1989). V jiných provedeních může být lipid v komplexu nebo konjugovaný s non–histonovými chromosomálními proteiny (HMG–1) (Kato et al., 1991). V ještě dalších provedeních může být lipid v komplexu nebo konjugovaný s HVJ i HMG–1. Takové expresní vektory byly úspěšně použity pro přenos a expresi oligonukleotidů in vitro a in vivo a jsou tedy použitelné v předkládaném vynálezu. Když je v DNA konstruktu použit bakteriální promotor, tak je také žádoucí, aby byla obsažena v liposomu vhodná bakteriální polymeráza.

Liposomy použité podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny různými způsoby. Velikost liposomu závisí na způsobu jejich syntézy. Liposom suspendovaný ve vodném roztoku má obvykle sférický tvar a má jednu nebo více koncentrických vrstev molekul lipidové dvouvrstvy. Každá vrstva se skládá ze seskupení molekul reprezentovaných vzorcem XY, kde X je hydrofilní skupina a Y je hydrofobní skupina. Ve vodné suspenzi jsou koncentrické vrstvy uspořádány tak, že hydrofilní skupiny mají tendenci zůstat v kontaktu s vodnou fází a hydrofobní regiony mají tendenci k asociaci mezi sebou. Například, když jsou vodné fáze přítomny uvnitř i vně liposomu, tak mohou lipidové molekuly tvořit dvojvrstvu, která je označována jako lamela, uspořádání XY–YX. Agregáty lipidů se mohou tvořit tehdy, když se hydrofilní a hydrofobní části více než jedné lipidové molekuly asociují mezi sebou. Velikost a tvar těchto agregátů závisí na mnoha různých proměnných, jako je charakter rozpouštědla a přítomnost dalších sloučenin v roztoku.

Liposomy podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny za použití známých laboratorních technik. V jednom výhodném provedení jsou liposomy připraveny smísením liposomálních lipidů v rozpouštědle v zásobní nádobě, například ve skleněné baňce hruškovitého tvaru. Zásobní nádoba by měla mít objem 10krát větší než je předpokládaný objem suspenze liposomu. Pomocí rotační odparky se odstraní rozpouštědlo při přibližně 40 °C za podtlaku. Rozpouštědlo se normálně odstraní během přibližně 5 minut až 2 hodin, podle požadovaného objemu liposomu. Přípravek může být potom sušen v sušičce za vakua. Vysušené lipidy mohou být zlikvidovány po přibližně 1 týdnu, protože jejich kvalita má sklon s časem se zhoršovat.

Sušené lipidy mohou být hydratovány při přibližně 25 až 50 mM fosfolipidu ve sterilní, apyrogenní vodě tak, že se provádí třepání do té doby, než je veškerý lipidový film resuspendován. Vodný roztok liposomu může být potom rozdělen do podílů, které se umístí do fiol, lyofilizují a poté uzavřou pod vakuem.

Alternativně mohou být liposomy připraveny za použití jiných laboratorních metod: metodou, kterou popsal Bangham et al. (1965); metodou, kterou popsal Gregoriadis, jak je uvedeno v DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICÍNĚ, G. Gregoriadis ed. (1979) str. 287 až 341 a metodou odpaření reverzní fáze, jak popsal Szoka a Papahadjopoulos (1978). Výše uvedené metody se liší ve schopnosti zachycovat vodný materiál a v poměrech voda – lipid.



Sušené lipidy nebo lyofilizované liposomy připravené způsoby popsanými výše mohou být dehydratovány a rekonstituovány v roztoku inhibitorového peptidu a zředěny na vhodnou koncentraci vhodným rozpouštědlem, například DPBS. Směs se potom důkladně protřepe v mísicím zařízení vytvářejícím víření. Nezachycená nukleová kyselina se odstraní odstředěním při 29 000 x g a liposomální pelety se promyjí. Promyté liposomy se resuspendují při vhodné koncentraci celkových fosfolipidů, například při koncentraci přibližně 50 až 200mM. Množství enkapsulované nukleové kyseliny může být stanoveno pomocí standardních metod. Po stanovení množství nukleové kyseliny zachycené v liposomovém prostředí mohou být liposomy naředěny na vhodné koncentrace a uskladněny při teplotě 4 °C do použití.

Farmaceutický prostředek obsahující liposomy bude obvykle obsahovat sterilní, farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředidlo, jako je voda nebo salinický roztok.

### Příklady uskutečnění vynálezu

Následující příklady ukazují výhodná provedení předkládaného vynálezu. Odborníkovi v oboru bude jasné, že techniky popsané v následujících příkladech představují techniky, které dobře fungují při provádění předkládaného vynálezu, jak zjistili původci, a tak mohou být považovány za výhodné způsoby jeho provedení.

V příkladech uvedených dále se používají rozdílné superantigeny, avšak pouze konjugáty obsahující superantigen stafylokokový enterotoxin E (SEE) se souborem modifikací uvedeným v patentových nárocích je podle tohoto vynálezu, zatímco jiné superantigeny a konjugáty jsou zahrnuty pro ilustraci a kvůli důvodům srovnávacím.

#### Příklad 1: In vitro mutagenese

Různé varianty superantigenů byly připraveny metodami na bázi polymerázové řetězové reakce (PCR).

Uvedeno stručně, PCR produkty obsahovaly dvě jedinečná restrikční místa, každé na jedné straně. Pro subklonování se použil pUC19 (GIBCO BRL Life Technologies, Middlesex, U.K.), připravený za použití QIAprep Spin Miniprep Kit Protokolu (QIAGEN, Hilden, Germany). Byly vloženy bodové mutace neovlivňující aminokyselinovou sekvenci, které usnadňují další analýzu. PCR reakce byla provedena na Perkin Elmer Gene Amp PCP systému 2400 s Tag DNA polymerázou a vhodným PCR pufrem obsahujícím 15mM MgCl<sub>2</sub> (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland). PCR produkty a vektory se štěpily přes noc vhodnými restrikčními enzymy. Potom se provedlo přečištění za použití elektroforesy v 1% agarosovém gelu (GIBCO BRL Life Technologies) obsahujícím 0,5 (μg/ml ethidiumbromidu (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) v TAE pufu (Sigma–Aldrich). Fragment obsahující DNA se excidoval z gelu a extrahoval se za použití CONSERT™ Rapid Gel Extraction Systému (GIBCO BRL Life Technologies). Vektor a insert se ligovaly (T4 DNA ligasa, Roche Molecular Biochemicals) při teplotě místnosti během 3 až 4 hodin. Ligační směs se potom transformovala do Escherichia coli kmene DH5α (GIBCO BRL Life Technologies) podle návodu výrobce. Pozitivní klony se verifikovaly za použití DNA sekvenování. Správné sekvence se štěpily RsrII/HindIII při 37 °C přes noc a ligovaly se do expresního vektoru (Dohlsten et al., 1994). Variabilní části Fab se změnily na C215, aby byly vhodné pro dostupné zvířecí modely. Konstrukt se nakonec inkorporoval do Escherichia coli K12 kmene UL635 (xyl–7, ara–14, T4R, ΔompT).

## Příklad 2

## Identifikace lidských anti-SEA vazebných regionů

5

Regiony rozpoznávané lidskou anti-SEA protilátkou se identifikovaly z pepsinového trávení SEA nebo chimérické varianty SEA a SEE, SEA/E-18, dříve označované jako SEE/A-A (Antonsson et al., 1997) se substitucí D227A.

- 10 Každý superantigen se inkuboval s 0,5% pepsinem, 10mM HCl, 150mM NaCl (hmot./hmot.) po dobu 60 minut při 37 °C. Peptidová směs se neutralizovala 2M Tris-HCl, pH 8,0 a aplikovala se na 1 ml HiTrap kolonu (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) s imobilizovanou lidskou anti-SEA. PBS, 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, pH 7,3, se použil jako promývací pufr a protilátkové vazebné fragmenty se eluovaly za použití 0,1M
- 15 kyseliny octové, pH 3,0. Fragmenty se identifikovaly před a po přečištění za použití HPLC spřažené s hmotovým spektrometrem (MS) (obr. 1). Chromatografie se provedla na C18 koloně (2x250 mm) (VYDAC<sup>TM</sup>, Hesperia, California, USA) za použití lineárního gradientu od 10 do 60% acetonitrilu v 0,1% kyselině trifluorooctové během 30 minut při 40 °C. Hmotnostní spektrum se určilo za použití elektrosprejové MS (Finnigan LCQ, Thermoquest, San Jose, California,
- 20 USA). Fragmenty objevené ve tráveném produktu při stejném retenčním čase před a po afinitním přečištění se považovaly za pozitivní (obr. 2).

## Příklad 3: Molekulové modelování

25

Chimérický superantigen SEA/E-18 je na bázi SEE sekvence kromě čtyř aminokyselinových zbytků poblíž N-konce, které jsou ze SEA a jedné substituce v C-koncové části D227A (obr. 3 a obr. 4) (Antonsson et al., 1997).

- 30 Stručně, trojrozměrné struktury superantigenů s mnohem vyšší identitou sekvence se SEE, které byly dostupné z PBD, se použily jako templáty pro konstrukci homologického modelu SEAE-18, tj. SEA (1ESF, Shard et al, 1SXT, Sundstrom et al 1996 A), SED (Sundstrom et al., 1996 B) a SEH (1ENF) (Hakansson et al., 2000). SEA byl nejpodobnější SEE s identitou sekvence 80 %. SED měl identitu sekvence 60 % a SEH 50 % vzhledem k SEE.

35

- Konstrukce modelu se provedla za použití HOMOLOGY modulu v INSIGHTII softwaru (MSI, San Diego). Struktury tří superantigenů, SEA, SED a SEH, se porovnal a určily se strukturálně konzervované regiony (SCR) (obr. 3). Tyto regiony se obvykle mapovaly do pravidelných sekundárních struktur molekuly. Hrubé sekvence pro SEA/E-18 připravila za použití SCR ze
- 40 struktury SEA (obr. 5). Použily se 1SXT koordináty pro SEA, kromě prvních devíti zbytků na N-konci, kde se použilo 1ESF. Regiony mezi SCR byly ve většině případů flexibilní smyčky a byly připraveny z SEA a SED. Většina smyček byla připravena ze SEA, kromě zbytků Gln19, Ile140, Asp141, Lys142, Ser189, Gly191, Asp200, Pro206, Asp207 a Leu224, které byly použity ze SED. Některé oblasti v SCR vykazovaly větší podobnost sekvence se SED a byly proto
- 45 připraveny podle SED jako strukturálního templátu (Ile37, Glu49, Asn50, Thr51, Leu52, Ser195 a Thr218) (obr. 3).

- Protože byl jako strukturální templát pro většinu zbytků v SEA/E-18 použit SEA, nevyskytly se potíže s překrýváním vedlejších řetězců. Místa sestřihu před a za SCR se opravila. Nejprve se substituované vedlejší řetězce relaxovaly a potom se pomocí minimalizace energie a molekulární dynamiky relaxovaly všechny vedlejší řetězce v SCR za použití HOMOLOGY. Smyčky se relaxovaly jednou za použití prvních 1000 kroků minimalizace energie a 1000 kroků molekulární dynamiky. Tyto jemné úpravy se aplikovaly nejprve na vedlejší řetězce smyčky a potom na všechny atomy ve smyčce. Pro všechny simulace se použilo CVFF silové pole se silovou
- 55 konstantou 100 kcal/A2 za použití kroků 2 fs.

Konečný model se testoval na špatné regiony za použití PROSTAT modulu v INSIGHTII. Nebyly detekovány žádné špatné regiony. Vnitřek proteinu se balil dobře bez významných odlišností ve srovnání s SEA. Všechny zbytky spadaly do povolených regionů ramachandranova grafu. Superpozice 1SXT s modelem vedla k zisku RMSD 0,4 Å, když byly srovnávány C $\alpha$  atomy. Hlavní rozdíl mezi dvěma strukturami byl pozorován v ( $\beta$ 9– $\beta$ 10 smyčce (zbytky His187–Thr193) (obr. 5).

Nové modely nových variant superantigenů byly konstruovány za použití SEA/B–18 modelu jako templátu. Specifické aminokyselinové zbytky se změnilo přímo na tento model. Nejvýhodnější konformace vedlejšího řetězce byla vybrána za použití jednoduchých sterických omezení a krátké minimalizace energie.

#### 15 Příklad 4: kultivace a přečištění

C215FabSEA/E chiméry se exprimovaly jako fúzní proteiny v *E. coli* K12 kmeni UL635 za použití plazmidu s IPTG indukovaným Lac UV–5 promotorem a genem pro kanamycinovou rezistenci.

20 Stručně, bakterie ze zmrazeného ( $-70^{\circ}$ ) zásobního roztoku ve 20% glycerolu se inkubovaly při 25 °C po dobu 22 až 24 hodin v baňce obsahující (na litr) 2,5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g natrium–citrátu, 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g kanamycinu, 12 g monohydrátu glukózy a 1 ml roztoku stopových prvků, nicméně bez  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Buňky se kultivovaly do Abs<sub>620</sub> 2–3 a 10 ml kultivačního média se použilo pro naočkování 1 litrového fermentačního tanku (Belách Bioteknik, Sweden) s počátečním objemem 800 ml. Fermentační médium obsahovalo (na litr) 2,5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 9 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 6 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g natrium–citrátu, 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g kanamycinu, 23,1 g monohydrátu glukózy a 1 ml roztoku stopových prvků, jako výše. PH bylo udržováno na 7,0 titrací 25%  $\text{NH}_3$ , aerace 1 litr/minutu a teplota byla 25 °C. Během vsádkové fáze se procento rozpuštěného  $\text{O}_2$  udržovalo na 30 % tím, že se regulovala rychlost míšení od 400 rpm do 2000 rpm a během živné fáze tím, že se reguloval přívod glukózy (60% hmot./obj.). Tvorba produktu se indukovala tehdy, když byla absorbance při 620 nm 45 tím, že se přidal 0,1mM isopropyl– $\beta$ –D–thiogalaktopyranosid (IPTG). Po fermentaci se buňky odstranily odstředěním při  $-20^{\circ}\text{C}$  a potom se provedlo přečištění.

35 Proces přečištění se rozdělil do tří kroků. Nejprve se DNA odstranila ze supernatantu kultury pomocí 0,19 % polyethyleniminu (hmot./obj.) v 0,2M NaCl, pH 7,4, za použití peristaltické pumpy s průtokem 12 ml/min. Po odstředění při 7500 x g po dobu 30 minut se odebral supernatant.

40 Supernatant se aplikoval na 60 ml protein–G Sepharose 4, kolonu s rychlým průtokem (Amersham Pharmacia Biotech) s průtokem 14 ml/min. Kolona se promyla za použití PBS a eluce se provedla se 100mM kyselinou octovou, 0,025% Tween 20, pH 3,0. Eluovaný produkt se odebral a pH se upravilo na hodnotu o 1,5 jednotek nižší než je teoretický izoelektrický bod s 1M NaOH, produkt se přefiltroval (0,2  $\mu\text{m}$ ) a naředil se čtyřikrát 0,025% Tween 20. Degradované varianty se odstranily za použití iontoměničové chromatografie. Iontová síla vzorku se upravila na 2 mS/cm a použitou kolonou byla SP–Sepharose–HP, Hiloal 16/10 (Amersham Pharmacia Biotech). Eluce se provedla s průtokem 4,0 ml/min během 50 minut za použití lineárního gradientu od 0 až 55% pufru B, 100mM NaAc, 400 mM NaCl, 0, 025% Tween 20, pH 5,0 v pufru A, 10mM NaAc, 0,025% Tween 20, pH 5,0.

## Příklad 5: Séroreaktivita

5 Reaktivita mezi varianty superantigenů a lidským anti-SEA se měřila ve Scintillation Proximity Assay (SPA).

10 V mikrotitrační plotně (OptiPlate, Packard Instruments) se streptavidinem potažené PVT korálky, 150  $\mu\text{g}$  korálků/jamku (Amersham Pharmacia Biotech) inkubovaly po dobu 30 minut s  $\text{F(ab)}_2$  fragmenty anti-myšího IgG konjugovanými s biotinem, 3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  korálků. Korálky se preinkubovaly s C215Fab konjugovanými superantigeny sérii ředění 1:2, kde nejvyšší konečné koncentrace v jamkách byly 40nM. Nakonec se korálky inkubovaly s 1nM afinitně přečištěné lidské anti-SEA protilátky konjugované s  $^{125}\text{I}$  a velikost scintilace se měřila v Top-Counter (Packard Instruments).

15 Lidská anti-SEA reaktivita pro varianty superantigenů se měřila v enzymovém imunosorbentním testu, ELISA (Cavallin et al., 2000). Výsledky byly podobné jako výsledky získané v SPA.

## Příklad 6: Biologické funkce

20 Schopnost indukovat buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách k superantigenu, SADCC, a buněčnou cytotoxicitu závislou na superantigenu, SDCC, se srovnávala ve standardním 4 hodinovém testu uvolňování  $^{51}\text{Cr}$ .

25 Stručně, cíle, které se použily pro SDCC, byly lidské Raji buňky B-lymfomu, a cíle, které se použily pro SADCC, byly Colo205 buňky lidského kolorektálního karcinomu. Buňky se označily  $^{51}\text{Cr}$  a naředily se na koncentrace 50 000 buněk/ml a aplikovaly se do mikrotitračních jamek tvaru písmena V. Efektorové buňky, SEA-reaktivní T-lymfocytární linie, se použily v poměru efektorových a cílových buněk 45:1 pro SADCC a 30:1 pro SDCC. Sag varianty se přidaly v koncentracích od  $10^{-9}$  do  $10^{-16}\text{M}$  pro SADCC a od  $10^{-7}$  do  $10^{-14}\text{M}$  pro SDCC. Supernatanty se odebraly a uvolňování  $^{51}\text{Cr}$  se měřilo v TopCount (Packard Instruments). Procento specifické cytotoxicity se vypočetlo jako  $100 \times [(\text{cpm} - \text{uvolnění v pokusu} - \text{cpm spontánní uvolnění}) / (\text{cpm celkové uvolnění} - \text{cpm spontánní uvolnění})]$ .

35 Příklad 7: Identifikace protilátkových epitopů

40 U pacientů komplikují preexistující protilátky proti superantigenům jejich klinické použití a často je nutná úprava dávkování (Alpaugh et al., 1998). Jedním způsobem, jak omezit vliv předem vytvořených protilátek, je modifikace regionu superantigenů odpovědného za vazbu na T-lymfocytární receptor (Antonsson, et al., 1997). Předkládaný vynález však zlepšuje terapeutický potenciál superantigenů tím, že využívá genového inženýrství pro odstranění protilátkových epitopů superantigenů.

45 Bylo zjištěno, že SEE vykazuje silnou redukci v protilátkové reaktivitě ve srovnání se SEA (Antonsson et al., 1997). Naneštěstí je s tímto snížením také spojeno snížení tumoricidních vlastností, když je SEE fúzován na tumor-reaktivní Fab (Antonsson et al., 1997). Proto byly zkoumány chimérické konstrukty SEA a SEE. Při vložení příslušných aminokyselin ze SEA do čtyř pozic v TCR-vazebném regionu SEE bylo dosaženo požadovaných vlastností. Tyto substituce, Arg20Gly, Asn21Thr, Ser24Gly a Arg27Lys (region A) v SEE vedly k zisku chiméry SEA/E-18 (obr. 4) (Antonsson et al., 1997). Tato chiméra vykazuje více než 50% snížení v protilátkové reaktivitě, jako má SEE, za zachování účinné úrovně cytotoxicity, jako má SEA. Dále pro snížení afinity mezi superantigenem a MHC třídy II, která redukuje SDCC a tím zlepšuje terapeutické okno, obsahuje SEA/E-18 také substituci Asp227Ala (Abrahamsén et al., 55 1995).

Pro další snížení schopnosti lidských anti-SEA rozpoznávat SEA/E-18 se určily protilátkové vazebné epitopy v superantigenech. Peptidy/fragmenty z částečného peptidového trávení buď SEAw<sub>t</sub>, nebo SEA/E-18 se zachycovaly za použití mobilizované anti-SEA protilátky. Po přečištění se peptidové sekvence identifikovaly za použití LC-MS (obr. 1). Tak se potenciální oblasti podílející se na rozpoznávání protilátkou lokalizovaly do aminokyselinové sekvence. Významné je to, že většina získaných peptidů byla umístěna poblíž regionů, o kterých je známo, že interagují s MHC antigeny třídy II (Abrahmsén et al., 1995) (obr. 2 a obr. 6). Trojrozměrná struktura SEA (Schadetal., 1995; Sundström et al., 1996) a počítačový model SEA/E-18 (obr. 5), založený na krystalové struktuře SEA (Schad et al., 1995; Sundstrom et al., 1996 A), se použily pro lokalizaci zbytků exponovaných na povrchu v identifikovaných peptidech. Následující zbytky byly identifikovány jako zbytky exponované na povrchu a jako potenciální kandidáti v protilátkových vazebných epitopech: Glu34, Lys35, Glu39, Asn40, Lys41, Glu42, Asp44, Asp45, Glu49, Lys74, Asp75, Asn78, Lys79, Lys81, Lys83, Lys84, Asp173, His187, Ser189, Glu190, Gln204, Lys217, Asn220, Glu222, Asn223, His225 a Asp227 (Tabulka 1).

Tyto zbytky se potom substituovaly pro redukcí jejich vazby na protilátky. Kontinuálně se prováděly nové počítačové modely s vylepšenými SAg variantami, aby se potvrdily a srovnaly výsledky pro nové varianty. Zejména se hodnotil význam vedlejších řetězců na stabilitu proteinů.

#### Příklad 8: Modifikace superantigenů pro snížení séroreakivity

Charakterizoval se příspěvek identifikovaných zbytků k vazbě protilátky, nejprve za použití dvou simultánních substitucí v SEA/E-18. Tak se získaly SAg varianty SEA/E-62 (Lys217Thr, Asn220Ala, Glu222Thr, Asn223Ala, His225Ala) (region E), SEA/E-63 (Ser189Asp, Glu190Ala) (region D), SEA/E-64 (Glu34Lys, Lys35Glu, Glu39Lys, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys) (region B), SEA/E-65 (Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Glu, Lys84Glu) (region C), SEA/E-74 (Asp44Ala, Asp45Ala, Glu49Thr) (region B) a SEA/E-75 (Lys74Thr, Asp75Ala, Asn78Ser) (region C) (Tabulka 1, obr. 4).

Pro zkoumání toho, zda lidské IgG anti-SEA protilátky mohou rozpoznávat různé SAg varianty se vyvinul "test blízkosti scintilace" (SPA). Modifikované varianty byly všechny rozpoznávány méně než SEA/E-18 (tabulka 1). Nejvýznamnější redukce vazby byla způsobena substitucí provedenou v SEA/E-65. V SPA analýze byla pozorována redukce o více než 40 % (obr. 7). Nicméně, mnohá nahrazení také generovala redukci produkce v *E. coli* a občas byla snížena také biologická aktivita. Zkoumáním substitucí jsme identifikovaly v každé variantě odpovědné zbytky a tyto zbytky jsme modifikovaly či vyloučily, aby bylo dosaženo lepších vlastností. Obecně byla produkce zlepšena hydrofilními substitucemi ve srovnání s více hydrofobními substitucemi.

Redukce vazby protilátky byla synergně zvýšena tehdy, když byly varianty kombinovány, jak je tomu v SEA/E-91 skládajícího se ze SEA/E-63, SEA/E-65 a modifikovaného SEA/E-74 (s přirozeným Asp45) (tabulka 1). Variantou s nejlepšími výsledky v SPA analýze s redukcí vazby o téměř 70 % ve srovnání s SEA/B-1B byl SEA/E-110, kombinace SEA/E-A-63, SEA/E-75 a modifikovaného SEA/E-62 (SEA/E-97), SEA/E-64 (SEA/B-108), SEA/E-65 (SEA/E-84) a SEA/E-74 (wt Asp45) (obr. 7, tabulka 1). Modifikace odpovědné za většinu redukce vazby protilátky byly v SEA/E-109 (Glu34Ser, Glu39Ser, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys, Asp44Ala, Glu49Thr, Lys74Thr, Asp75Ala, Asn78Ser, Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Ser, Lys84Ser) a kombinace SEA/E-75 a modifikovaného SEA/E-64 (SEA/E-108), SEA/E-65 (SEA/E-84) a SEA/E-74 (wt Asp45). Toto je proto, že varianty superantigenů obsahující tyto substituce mají všechny dobré snížení v SPA analýze.

Tak způsobují zbytky substituované v SEA/E-62, SEA/B64, SEA/E-65 a SEA/E-74 20 až 40% snížení reaktivity s protilátkou ve srovnání se SEA/E-18 (tabulka 1).

Tabulka 1

Chimera	E34	K35	E39	N40	K41	E42	D44	D46	E49	K74	D75	N78	K79	K81	K83	K84	D173	H187	S188	S189	E190	Q204	K217	N220	E222	N223	H225	D227	Yield (mg/l)	Seroreaktivita (Bmax)	SADCC	SDCC
SEAE-21																		A	T								A	55.0	98%	0.5	1	
SEAE-62																			A	T								A	1.0	77%	1	0.5
SEAE-97																			A	T								S	48.0	93%	3	1
SEAE-63																			A	T	D	A						A	14.0	95%	1	0.5
SEAE-64	K	E	K	S	E	K												A	T								A	23.0	98%	0.5	0.5	
SEAE-108	S		S	S	E	K												A	T								A	30.0	66%	0.7	0.9	
SEAE-65													E	E	E	E			A	T							A	1.5	57%	1	0.5	
SEAE-90													E	E	E	E			A	T		R				A	2.2	52%	1	1		
SEAE-84													E	E	S	S			A	T						A	15.0	59%	1	1		
SEAE-88																	A	A	T								A	26.5	93%	0.5	1	
SEAE-74						A	A	T											A	T							A	42.0	90%	1	0.5	
SEAE-91							A	T					E	E	E	E			A	T	D	A				A	12.0	46%	1	0.1		
SEAE-75									T	A	S								A	T							A	53.0	86%	0.1	1	
SEAE-93				S	E	K	A	A	T				E	E	E	E			A	T	D	A				A	15.0	43%	1	0.9		
SEAE-107																	A	A	T	D							S	8.0	78%	1	0.1	
SEAE-113																			A	T	D	A	R	T	S	S	S	S	14.0	89%	3	0.5
SEAE-109	S		S	S	E	K	A												A	T	D	A	T	S	S	S	A	24.0	48%	1	0.04	
SEAE-110	S		S	S	E	K	A		T	A	S								A	T	D	A	T	S	S	S	S	0.5	32%	0.07	0.005	
SEAE-115	S		S	S	E	K	A		T	A	S								A	T	D	A	T	S	S	S	S	2.0	48%	0.5	0.01	
SEAE-118	S		S	S	E	K	A		T	A	S								A	S	T						S	2.0	49%	0.5	0.005	
SEAE-119	S		S	S	E	K	A		T	A	S								A	T							S	10.0	52%	1	0.05	
SEAE-120	S		S	S	E	K	A		T	A	S																S	30.0	36%	3	0.04	
SEAE-121	S		S	S	E	K	A		T	A	S								A								S	7.0	44%	1	0.04	
SEAE-122	S		S	S	E	K	A		T	A	S								S								S	12.0	46%	1	0.008	

Biologická aktivita byla stanovena jako 1 pro C215Fab/SEAE/E18 jak v SADCC, tak v SDCC. Hodnota pro hodnocení seroreaktivity, tj. Bmax, je vyjádřena v procentech C215Fab/SEAE/E18. Hodnoty uvedené tučně jsou hodnoty získané v pokusech s jinými šaržemi protilátek než ostatní.

## Příklad 9: Náhrady ovlivňující úroveň produkce

5 Jak bylo uvedeno výše, některé substituce na povrchu superantigenů vedou ke snížení produkce v *E. coli*. Mnoho kombinací takových substitucí nebylo možné produkovat. Proto bylo rozhodnuto zkoumat alternativní modifikace těch zbytků, které zjevně způsobují redukci výtěžku. Substituce, které ovlivňovaly výtěžek bez toho, že by snižovaly vazbu na protilátku, nebyly dále zkoumány. Místo nich byly použity přirozené zbytky.

10 V první sadě variant superantigenů zbytek Lys35 v SEA/E-64; negativně ovlivňoval úroveň exprese. Při použití přirozeného zbytku v pozici 35 společně se serinovou substitucí Glu34 a Glu39, což vede k zisku SEA/E-108, bylo pozorováno zvýšení výtěžku z 23 na 30 mg/l. Snížení reaktivity s protilátkou bylo také zachováno. Při substituování kyseliny glutamové za zbytky Lys79, Lys81, Lys 83 a Lys 84 v SEA/E-65 byla úroveň produkce pouze 1,5 mg/l.  
15 Vzhledem ke skutečnosti, že reaktivita s protilátkou se snížila o 43 % ve srovnání se SEA/E-18, byla snaha identifikovat lepší náhrady. Nejlepší kombinací, jak z hlediska výtěžku, tak reaktivity protilátky, byl SEA/E-84 se serinovými zbytky v pozicích 83 a 84 a se zachovanou kyselinou glutamovou v pozicích 79 a 81 (tabulka 1). Úroveň produkce se zvýšila 10krát a reaktivita protilátky se redukovala o 41 % ve srovnání s SEA/E-18 (tabulka 1). Úroveň produkce se také  
20 snížila více než 10krát při substitucích Lys217Thr, Asn220Ala, Glu222Thr, Asn223Ala, His225Ala a Asp227Ala v SEA/E-62, na 1,0 mg/l. Nicméně, při nahrazení alaninových substitucí serinovými zbytky, což vede k zisku SEA/E-97, se dosáhlo produkce 48 mg/ml (tabulka 1).

25 Zajímavé je to, že při kombinování SEA/E-65 s více variantami, jako je SEA/E-63 a modifikovaný SEA/E-74, jak je tomu v SEA/E-91, změnila se nízká úroveň produkce na 12 mg/l (tabulka 1). Na druhé straně bylo dosaženo exprese varianty superantigenů SEA/E-110 pouze 0,5 mg/l a 14 mg/l, v příslušném pořadí. Úroveň produkce SEA/E-110 byla zvýšena na 30 mg/l při odstranění substitucí Asp174Ala, His87Ala, Ser188Thr, Ser189Asp, Glu190Ala  
30 a Gln204Tahr, což vedlo k zisku SEA/E-120 (tabulka 1).

Vložení velkého počtu substitucí do superantigenů může vést k problémům s expresí v *E. coli*. Existují alespoň tři mechanismy pro tento jev: snížení termodynamiky, narušení přirozených drah skládání proteinu nebo nově vzniklá proteolytická místa. Ačkoliv bylo cílem tohoto pokusu  
35 odstranění antigenních epitopů na povrchu, které s největší pravděpodobností interferují s hlavním strukturálním skeletem, existuje také možnost, že stabilita nových struktur byla závislá na jiných zbytcích než v přirozeném konstruktu. Proto se trvale vytvářely nové počítačové modely pro predikci nebo potvrzení lokalizace substituovaných zbytků v nové struktuře. Tímto způsobem je ve variantách superantigenů možno identifikovat zbytky způsobující problémy  
40 s úrovní exprese a je možné navrhovat vylepšené varianty obsahující buď přirozené zbytky, nebo lepší substituce (Tabulka 1).

Závěrem, pro dosažení lepší úrovně produkce by měly být zbytky Lys83, Lys84, Asn220, Asn223, His225 a Asp227 substituované serin/a nikoliv na alanin. Dále, pro eliminaci snížení  
45 exprese by zbytky Lys35, Asp173, His187, Ser188, Ser189, Glu190 a Gln204 měly být konzervovány.

## Příklad 10: Hodnocení biologických funkcí v různých Sac variantách

50 Jelikož byly superantigeny primárně navrženy pro protinádorovou terapii (Dohlsten et al., 1994), je důležité, aby substituce v nových variantách superantigenů nesnižovaly cytotoxicitu namířenou proti nádoru. Schopnost zprostředkovat tuto cytotoxicitu namířenou proti nádoru byla proto měřena proti všem novým variantám superantigenů v SADCC testu (obr. 3). Dále byla v SDCC  
55 testu měřena účinnost superantigenů ve zprostředkování zabíjení buněk exprimujících MHC

antigeny třídy II T-lymfocyty, kde tento mechanismus může vést k nežádoucím účinkům (obr. 3). Pro klinické použití je nejlépe, aby SDCC byla co nejmenší, protože se tím zvětší terapeutické okno.

- 5 Většina z iniciální sady SAg variant měla stejnou úroveň tumor specifického cytotoxického potenciálu jako SEA/E-18 (Tabulka 1). Výjimkou byl SEA/E-75 se substitucemi Lys74Thr, Asp75Ala a Asn78Ser, který měl desetkrát menší potenciál a SEA/E-64 se substitucemi Glu34Lys, Lys35Glu, Glu39Lys, Asn40Ser, Lys41Glu a Glu42Lys, který měl pětkrát menší potenciál než SEA/E-18 (tabulka 1). Zajímavé je to, že snížená aktivita v SEA/E-75 byla  
10 pozorována pouze v této variantě, v kombinaci s dalšími substitucemi, jako například v SEA/E-109, byla detekována plná aktivita (tabulka 1). Kromě toho byla SDCC aktivita nezměněna v SEA/E-75 ve srovnání s SEA/E-18. Substitute Lys74Thr, Asp75Ala a Asn78Ser proto pravděpodobně narušují interakce významné pro na protilátkách závislou cytotoxicitu.
- 15 Většina ze zde popsaných variant superantigenů vykazuje jasné snížení v SDCC. Mírné snížení v SDCC aktivitě bylo pozorováno pro prvotní varianty SEA/E-62, SBA/E-63, SEA/E-64, SEA/E-65 a SEA/E-74, ve srovnání se SEA/E-18.

Všechny varianty superantigenů obsahovaly substituovaný zbytek Asp227Ala nebo Ser.  
20 Je známo, že tato substitute redukuje afinitu k MHC molekulám třídy II 100krát a tím redukuje SDCC aktivitu (Abrahmsén et al., 1995). Protože však SAg varianta SEA/E-109, s N-koncovými substitucemi, vykazuje větší snížení ve srovnání se SEA/E-18 než SEA/E-113, s C-koncovými substitucemi, tak se předpokládá, že v SEA/E-109 byly změněny další zbytky, které jsou významné pro SDCC a s největší pravděpodobností se podílejí na vazbě na MHC antigeny třídy II (obr.8).  
25

Tak byly zbytky způsobující největší redukci Lys79Ser a Lys81Ser v SEA/E-83 a substitute Asp45Ala v SEA/E-74. Většina z těchto substitucí je lokalizována okolo zbytků, o kterých bylo dříve známo, že interagují s MHC antigeny třídy II (Abrahmsén et al., 1995).  
30

#### Příklad 11: Vývoj nových variant superantigenů

Pro vývoj optimálních variant superantigenů se všechny výhodné substitute kombinovaly, což vedlo k získání lepšího SEA/E-120 (obr.4 a obr.9).  
35

Nejprve se sestavily všechny výhodné modifikace v C-konci, tj. zbytky Asp173Ala, Ser189Thr, Glu190Ala, Lys217Thr, Asn220Ser, Glu222Thr, Asn223Ser, His225Ser a Asp227Ser, spolu s Gln204Thr, za získání SAg varianty SEA/E-113. Tato varianta měla očekávané snížení anti-SEA reaktivity a přijatelnou úroveň exprese, ale měla o něco nižší biologickou aktivitu (Tabulka 1, obr. 7 a obr. 8A a obr. 8B). Všechny výhodné substitute na N-konci, tj. zbytky Glu34Ser, Glu39Ser, Asn40Ser, Lys41Glu, Glu42Lys, Asp44Ala, Glu49T, Lys74T, Asn78Ser, Lys79Glu, Lys81Glu, Lys83Ser a Lys84Ser, se přidaly do SEA/E-109. Bylo pozorováno značné snížení anti-SEA reaktivity pro tuto variantu superantigenů společně s vysokou expresí a lepším biologickým profilem (tabulka 1, obr. 7 a obr. 8A a obr. 8B). Nicméně, při vytváření kombinací těchto dvou variant SEA/E-113 a SEA/E-109 v SEA/E-110 bylo pozorováno významné snížení jak výtěžku, tak biologické funkce (tabulka 1). Biologická účinnost byla zcela obnovena, když se v SEA/E-115 použily přirozené zbytky Ser189, Glu190 a Gln204, ale úroveň produkce byla stále ještě nízká. Molekulové modelování této varianty předpovědělo, že zbytky Asp173, His187 a Ser188 mohou být důležité pro stabilizaci skládání, což nakonec vede ke zvýšení výtěžku.  
40  
45  
50

Bylo připraveno několik různých kombinací pro hodnocení těchto zbytků, za získání SEA/E-118, SEA/E-119, SEA/E-120, SEA/E-121 a SEA/E-122 (tabulka 1). Nejlepší produkce byla získána pro SEA/E-120 s přirozenými zbytky ve všech třech pozicích. Společně s dříve připravenými SEA/E-21, SEA/E-74, SEA/E-97, SEA/E-108 a SEA/E-109 se jednalo o jediné SAg varianty,  
55



kteře dosáhly úrovně exprese vyšší než 20 mg/l (tabulka 1). Mezi variantami nebyly pozorovány žádné významnější odlišnosti v biologické aktivitě nebo protilátkové reaktivitě.

#### Návrh nových konjugátů

5

SEA/E-120 byl geneticky fúzován na Fab skupinu tumor-reaktivní protilátky, kterou byla 5T4 (Dohlsten et al., 1994) (obr. 10).

10 Antigen 5T4 je exprimován na různých nádorech, jako je nemalobuněčný karcinom plic, karcinom prsu, renální karcinom, karcinom slinivky břišní, karcinom vaječníků a karcinom tlustého střeva. Substituce v přirozené sekvenci 5T4 byly také provedeny s cílem dosažení vyšších výtěžků. V těžkém řetězci se jednalo o substituce: His41Pro, Ser44Gly, Ile69Thr a Val113Gly; a v lehkém řetězci se jednalo o substituce: Phe10Ser, Thr45Lys, Ile63Ser, Phe73Leu, Thr77Ser, Leu78Val a Leu83Ala.

15

Je třeba si uvědomit, že ačkoliv předkládaný vynález a jeho výhody jsou popsány podrobně, různé varianty záměn, náhrad a alternativ se mohou provést, aniž by došlo k odchýlení od smyslu a rozsahu předkládaného vynálezu, jak je definován v připojených patentových nárocích. Rozsah předkládaného vynálezu není nadto limitován konkrétními provedeními procesu, přístroji, postupy, složením látek, prostředky, metod a kroky uvedenými v popisu. Odborníkovi v oboru bude ihned jasné na základě vysvětlení předmětného vynálezu, že mohou být používány podle předmětného vynálezu jiné postupy, přístroje, výrobní způsoby, složení látek, prostředky, metody a kroky nyní existující nebo později vyvinuté, které splňují v podstatě stejnou funkci nebo se s nimi dosahují v podstatě stejné výsledky, jako s uvedenými v popisu. Proto připojené patentové nároky mají být pokládány za takové, které do svého rozsahu zahrnují podobné postupy, přístroje, výrobní způsoby, složení látek, prostředky, metody a kroky.

25

Odborníkovi v oboru bude hned jasné, že předkládaný vynález je dobře přizpůsoben pro provádění předmětů a dosažení výhod vynálezu zde zmíněných, stejně jako v něm obsažených. Zde popsané prostředky, způsoby, postupy a techniky jsou zamýšleny pouze jako příklady výhodných provedení a neomezují rozsah předkládaného vynálezu. Jejich změny a jiná použití přicházející na mysl odborníkovi v oboru jsou zahrnuta do podstaty vynálezu nebo jsou definovány rozsahem patentových nároků.

30

#### 35 Citované odkazy

Všechny patenty a publikace uvedené v popisu jsou ukazatelem úrovně oboru pro odborníka v oboru, který má vztah k tomuto vynálezu.

40

Patent US 4 554 101

Patent US 5 221 605

Patent US 5 238 808

Patent US 5 798 208

Patent US 5 830 650

45

Patent US 5 220 007

Patent US 5 284 760

Patent US 5 354 670

Patent US 5 366 878

Patent US 5 389 514

50

Patent US 5 635 377

Patent US 5 789 166

- Patent US 5 446 128  
 Patent US 5 710 245  
 Patent US 5 840 833  
 Patent US 5 859 184  
 5 Patent US 5 440 013  
 Patent US 5 618 914  
 Patent US 5 670 155  
 Patent US 5 475 085  
 Patent US 5 929 237  
 10 Patent US 5 672 681  
 Patent US 5 674 976  
 Patent US 4 608 251  
 Patent US 4 601 903  
 Patent US 4 599 231  
 15 Patent US 4 599 230  
 Patent US 4 596 792  
 Patent US 4 578 770  
 Abrahmsén L., et al. EMBO J. 14:2978–86, 1995.  
 Alpaugh, R.K., et al., Clin. Cancer Res. 4:1903–14, 1998.  
 20 Antonsson P., et al. J. Immunol. 158:4245–51, 1997.  
 Bangham et al., J. Mol. Biol., 13:238–252, 1965.  
 Bird et al., Science, 242:423–6, 1988.  
 Braisted et al, Proc Natl. Acad Sci USA. 93(12) :5688–92 1996.  
 Burks et al., Proc Natl. Acad Sci USA. 94(2):412–7, 1997.  
 25 Capaldi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 76:425, 1977.  
 Cavallin A., et al., J Biol. Chem. 275:1665–72, 2000.  
 Cunningham et al., Science. 244(4908): 1081–5, 1989.  
 Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, 1986.  
 Dohlsten M., et al., Proc Natl Acad Sci USA. 91:8945–9, 1994.  
 30 DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE, G. Gregoriadis ed (1979) str. 287–341.  
 Hakansson, M. et al., J Mol. Biol. 302:527–37, 2000.  
 Harlow, et al., Antibodies: A Laboratory Manual, 1988.  
 Johannesson et al., J. Med. Chem. 42:601–608, 1999.  
 Kaneda et al., J. Biol. Chem., 264(21):12126–12129, 1989.  
 35 Kato et al., J Biol Chem., 266 (6) :3361–3364, 1991.  
 Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157–176, 1987.  
 Papageorgiou A. C. et al., Trends in Microbiology 8: 369 375, 2000.  
 Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, kapitola 61, str. 1035–1038 a 1570–1580.  
 Sambrook et. al., v: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., 1989.  
 40 Schad E. M., et al. EMBO J. 14:3292–3301, 1995.  
 Short et al., J. Biol Chem. 270(48) :28541–50, 1995.  
 Sundstram M, et al. EMBO J. 15:6832–40, 1996 A.

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

## Seznam sekvencí

- <110> FORSBERG, GORAN  
 ERLANDSSON, EVA  
 ANTONSSON, PER  
 WALSE, BJORN
- <120> Nový upravený superantigen pro použití v terapii u člověka
- <130> P02188US0;10104199
- <140> TBA
- <141> 2001-06-20
- <160> 7
- <170> PatentIn version 3.0
- <210> 1
- <211> 672
- <212> PRT
- <213> Artificiální sekvence
- <220>
- <221> PEPTIDE
- <222> (1)..(672)
- <223> Konjugovaný 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

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

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

<210> 2

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificiální sekvence

<220>

<221> Peptid

<222> (1)..(233)<223> Chimérický 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

Thr Asn Thr Leu Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Gly His Pro Trp Tyr  
 50 55 60  
 Asn Asp Leu Leu Val Asp Leu Gly Ser Thr Ala Ala Thr Ser Glu Tyr  
 65 70 75 80  
 Glu Gly Ser Ser Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys  
 85 90 95  
 Ala Gly Gly Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr  
 100 105  
 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> Artificiální sekvence

<220>  
 <221> peptide  
 <222> (1)..(233)  
 <223> Chimérický 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

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

<210> 4

<211> 233

<212> PRT

<213> staphylococcus sp.

<400> 4

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



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

<210> 5

<211> 203

<212> PRT

<213> staphylococcus sp.

<400> 5

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

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

<210> 6

<211> 217

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 6

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

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; PRT

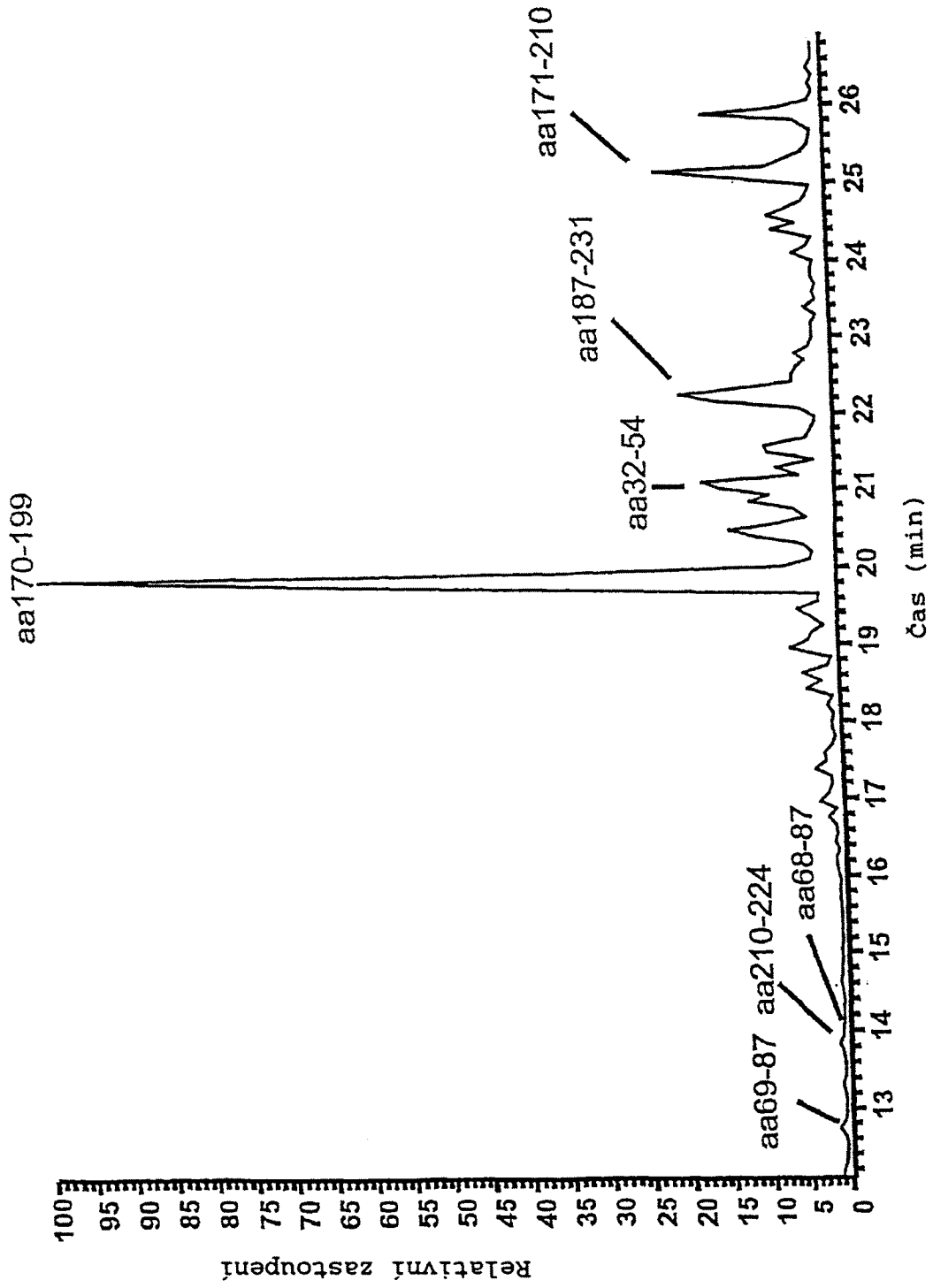
&lt;213&gt; Staphylococcus sp.

&lt;400&gt; 7

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

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Konjugát obsahující bakteriální superantigen a protilátkovou skupinu, v němž superantigenem je stafylokokový enterotoxin E (SEE), **vyznačující se tím**, že aminokyselinová sekvence superantigenu obsahuje regiony A až E, přičemž region A je vazebné místo receptoru T – lymfocytu – TCR a určuje vazbu na TCR, a regiony B až E určují vazbu na hlavní histokompatibilní komplex – MHC molekuly třídy II,
- 5 kde náhrady dále uvedených aminokyselinových zbytků jsou zavedeny do regionu C: K79E, K81E, K83S, K84S a
- 10 kde náhrady dále uvedených aminokyselinových zbytků jsou zavedeny do regionu A: R20G, N21T, S24G, R27K, a kde je nebo jsou nahrazeny popřípadě také aminokyseliny v poloze 173 a/nebo v poloze 204 v regionu A, a
- 15 kde náhrada D227S (nebo A) je zavedena do regionu E, a
- kde je nebo jsou dále nahrazen(y) jeden nebo více aminokyselinových zbytků v pozicích 34, 35, 39, 40, 41, 42, 44, 45 a 49 v regionu B a/nebo v pozicích 74, 75, 78 v regionu C a/nebo v pozicích 187, 188, 189, 190 v regionu D a/nebo v pozicích 217, 220, 222, 223, 225 v regionu E,
- 20 tak, že substituovaný superantigen má redukovanou séroreaktivitu ve srovnání se superantigenem, od kterého byl odvozen,
- 25 a kde protilátkovou skupinou je kompletní protilátka nebo jakýkoliv jiný aktivní fragment protilátky vážící antigen, který je namířen proti povrchové struktuře asociované s nádorovou buňkou.
2. Konjugát podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že superantigen má aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEQ ID NO: 2 (SEA/E-120).
- 30 3. Konjugát podle jakéhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že protilátkovou skupinou je fragment Fab.
4. Konjugát podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že protilátkovou skupinou je C215Fab.
- 35 5. Konjugát podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že protilátkovou skupinou je 5T4Fab.
6. Konjugát podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že má aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEQ ID NO: 1.
- 40 7. Konjugát podle jakéhokoliv z předchozích nároků, pro použití v léčbě zhoubných nádorů.
8. Konjugát podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že zhoubný nádor je vybrán ze skupiny zahrnující karcinom plic, prsu, tlustého střeva, ledvin, slinivky břišní, vaječníků, žaludku, čípku děložního a prostaty.
- 45 9. Použití konjugátu podle jakéhokoliv z předchozích nároků 1 až 6, pro výrobu léčiva pro léčbu zhoubných nádorů.
- 50 10. Použití podle nároku 9, kde léčivo je určeno pro intravenózní podávání.
11. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje, jako aktivní složku, terapeuticky účinné množství konjugátu podle jakéhokoliv z nároků 1 až 6.



Obr. 1

1 6 11 16 21 26 31 36 41 46

SEQ ID NO: 2 1-50 SEKSEI NEKDLRKKSELQGTALGNL KQIYYNSKAITSEK S ADQFLTN

51-100 TLLFKGFFTGHPWYNDLLV D LGSTAA TSEYEGSSVDLYGAYYGYQCAGGT

101-150 PNKTACMYGGVTL HDNNRLT EEK KVP INLWIDGKQTTVP IDKVKTSKKEV

151-200 TVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQRGLIV FHSSEGSTVSYDLFD

201-233 AQQQYPTLLRIYRDNTTISSTLSLSL YLYTT

Obr. 2

SEQ ID NO: 3 SEAE18 : SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQKIYYN---EKAITENKESDDQF  
 SEQ ID NO: 4 SEA : SEKSEEINEKDLRKKSELQGTALGNLQKIYYN---EKAKTENKESHQDF  
 SEQ ID NO: 5 SED : ALHKKSELSS'TALNNMKHSYADA---NPIIGANKSTGDOF  
 SEQ ID NO: 6 SEH : FDLHDKSELTDLALANAYGOYNHPFIKENIKSDEISGEKDL

SEAE18 : LENTLLEFKGFFTGHPWYNDLLVLDLGSKDATNKYKGGKVDLYGAYGYQCA  
 SEA : LQHTLLEFKGFFTDHSWYNDLLVDFDSKDIVDKYKGGKVDLYGAYGYQCA  
 SED : LENTLLEYKAF---LLINFNSAEMAQHFKSKNVDVYAIRYAAAC  
 SEH : IFRNQGDSG---NDRVKFATADLAQKFKKNVDIYGASFYKCE

SEAE18 : GGTPNKTCMYGGVTLHDNRLTEEEKKVPINLWIDKQTTVPIDKVKTSK  
 SEA : GGTPNKTCMYGGVTLHDNRLTEEEKKVPINLWIDKQNTVPLETVKTNK  
 SED : ---RTACTYGGVTPHAGNALKARKKIPINLWIGVQKEVSLDKVQTDK  
 SEH : KISENSECLYGGTTLN---SEKLAQERVIGANVWVDGIQKETE---LIRTNK

SEAE18 : KEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFSGKVQRGLIVFHSSEGSTVSYD  
 SEA : KNVTVQELDLQARRYLQEKYNLYNSDVFDGKVQRGLIVFHTSTEPSVNYD  
 SED : KNVTVQELDAQARRYLQKDLKLYN---AIQRGKLEFDSAAASKVSYD  
 SEH : KNVTLQELDIKIRKILSDKYKIYY---KSEISKGLIEFDMKTPRDYSFD

SEAE18 : LFDAQGQYPTLLRIRYRDNKTINSEN---LHIALYLYTT  
 SEA : LFDAQGQYSNTLLRIRYRDNKTINSENM---HIDIYLYTS  
 SED : LFDVAGDFPEKQLRIYSDNKTLSTEH---LHIDIYLYEA  
 SEH : IYDLKGENDYEIDKIYEDNKTILKSDDISHIDVNLYTKKKV

Obr. 3

A B

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

SEKSEEINEKDLRKKSELOQTALGNLKOIYYYNESKAITSEKSDAQFLITNTLLFKGFFTG 60  
 SEKSEEINEKDLRKKSELOQTALGNLKOIYYYNEKAITENKESDDQFLENTLLFKGFFTG 60  
 SEKSEEINEKDLRKKSELOQRNALSNLROIYYYNEKAITENKESDDQFLENTLLFKGFFTG 60  
 SEKSEEINEKDLRKKSELOQTALGNLKOIYYYNEKAKTENKESHQDFLQHTLLFKGFFTD 60  
 \*\*\*\*\* \*\*.\*:\*\*\*\*\* \*\* \*.:\* \*\*\*\*\* :\*:\* \*\*\*\*\*\*.

C

HPWYNDLLVDLGS~~TAATSEYEGSSVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTA~~CMYGGVTLHDNNRLT 120  
 HPWYNDLLVDLGS~~KDATNKYKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTA~~CMYGGVTLHDNNRLT 120  
 HPWYNDLLVDLGS~~KDATNKYKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTA~~CMYGGVTLHDNNRLT 120  
 HSWYNDLLVDF~~SKDIVDKYKGGKVDLYGAYYGYQCAGGTPNKTA~~CMYGGVTLHDNNRLT 120  
 \* .\*\*\*\*\*:\*. . .:\*. .\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

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

EEKVPINLWIDGKQTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ 180  
 EEKVPINLWIDGKQTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ 180  
 EEKVPINLWIDGKQTVPIDKVKTSKKEVTVQELDLQARHYLHGKFGLYNSDSFGGKVQ 180  
 EEKVPINLWLDGKQNTVPLETVTKNKKNVTVQELDLQARRYLQEKYLNLYNSDVFDGKVQ 180  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*:\*. .\*\*\*.\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*: \*.:\*\*\*\*\* \* .\*\*\*\*\*

D

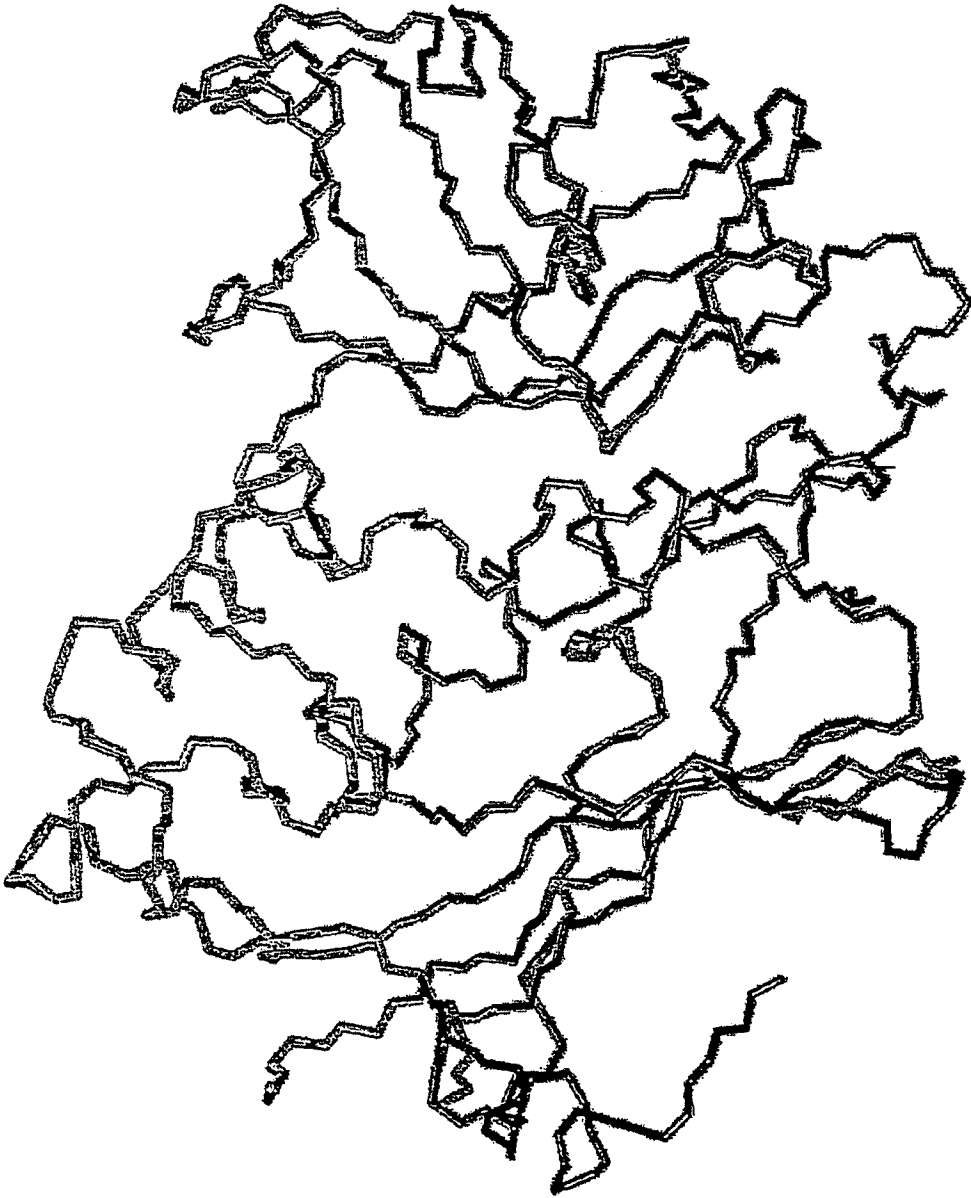
SEA/E-120  
 SEA/E-18  
 SEE  
 SEA

RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAGQGYPTLLRIYRDNTTISSTLSLSL~~LYTT~~ 233  
 RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAGQGYPTLLRIYRDNKTINSENHLAL~~LYTT~~ 233  
 RGLIVFHSSEGSTVSYDLFDAGQGYPTLLRIYRDNKTINSENHLID~~LYTT~~ 233  
 RGLIVFHTSTEPSVNYDLFAGQGYSN~~TLRIYRDNKTINSENMHIDI~~LYTS 233  
 \*\*\*\*\*:\*. .:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*. \* .:\*\*\*\*\*:

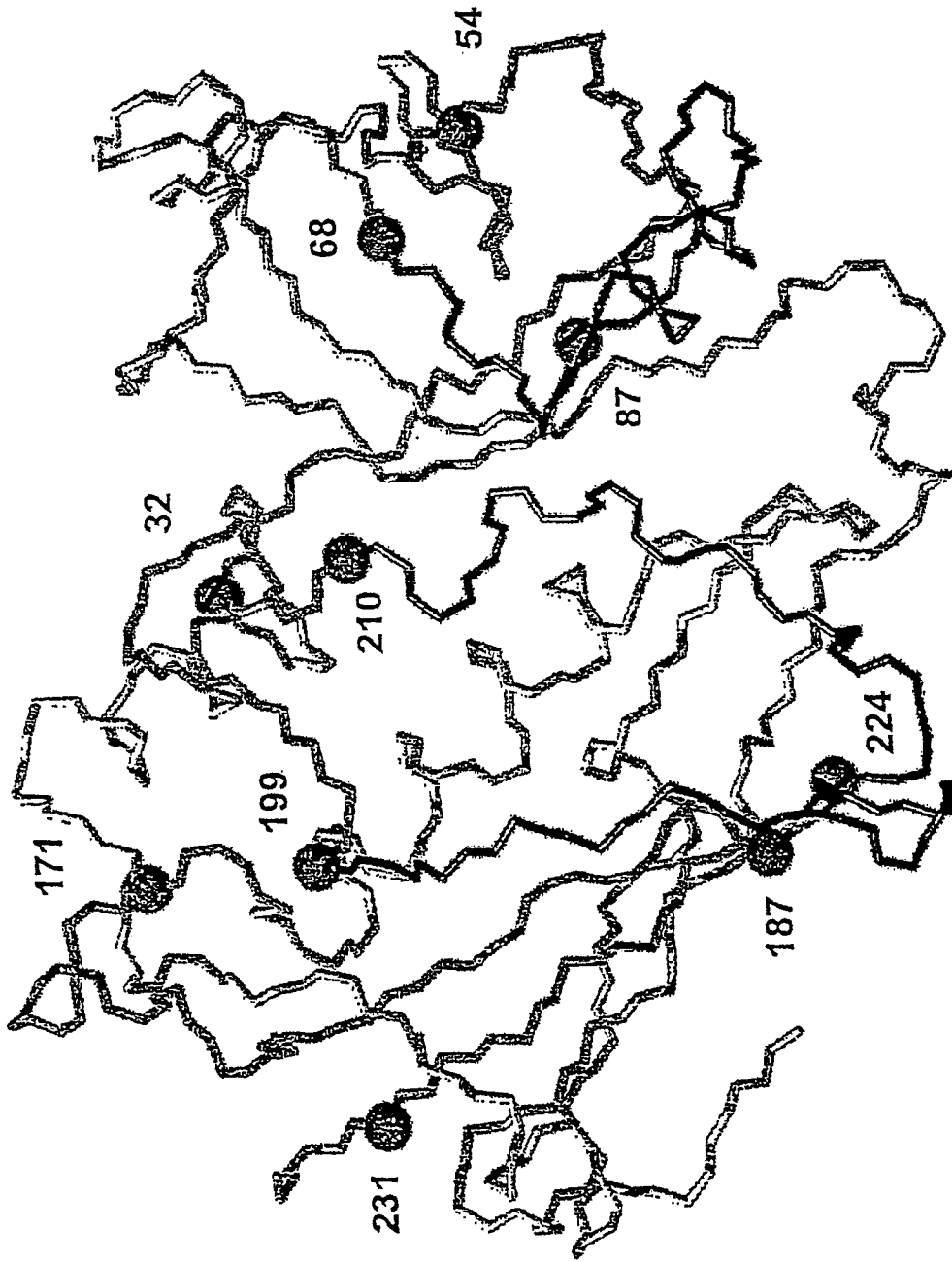
E

Obr. 4

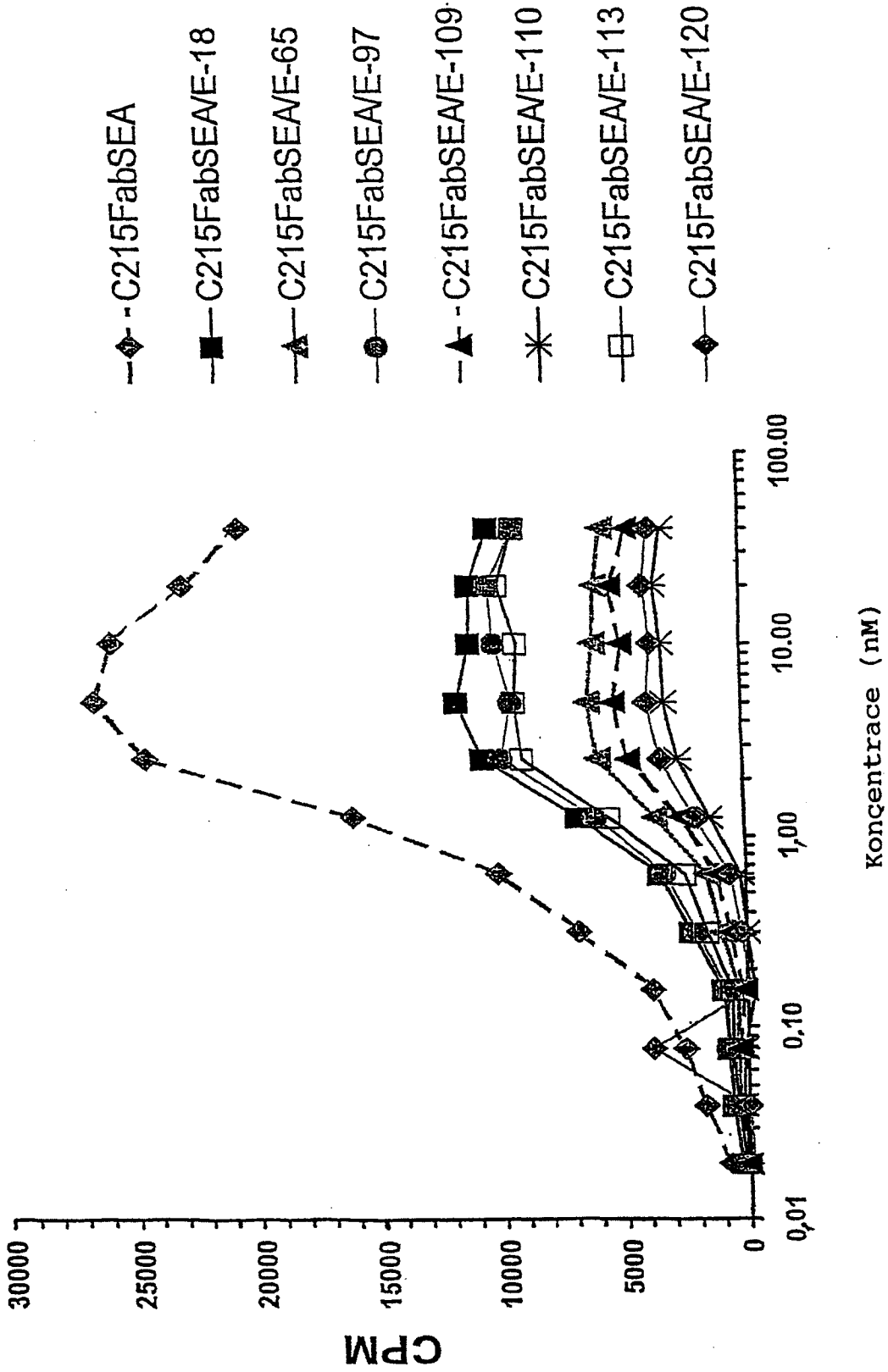




Obr. 5

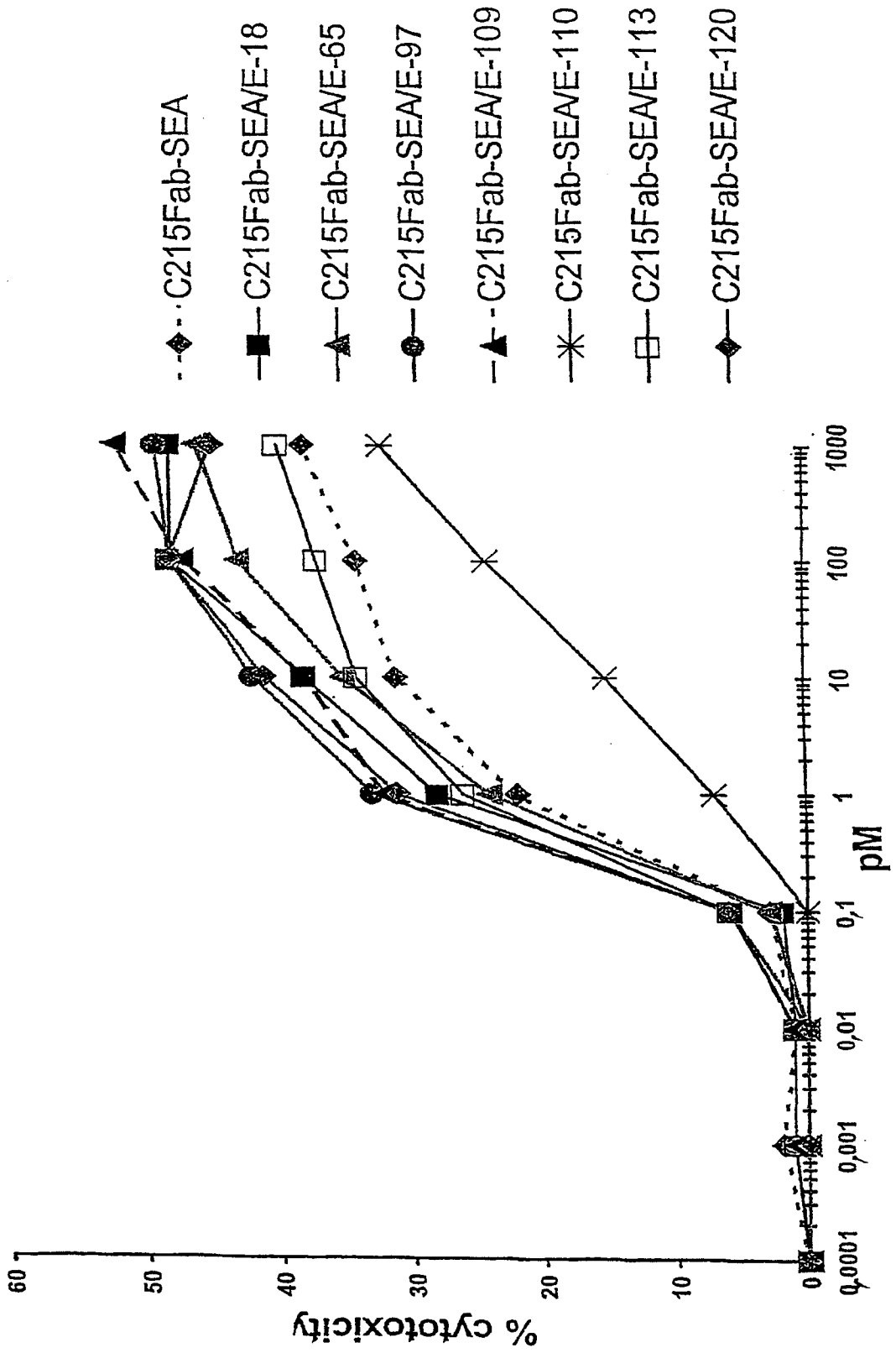


Obr. 6

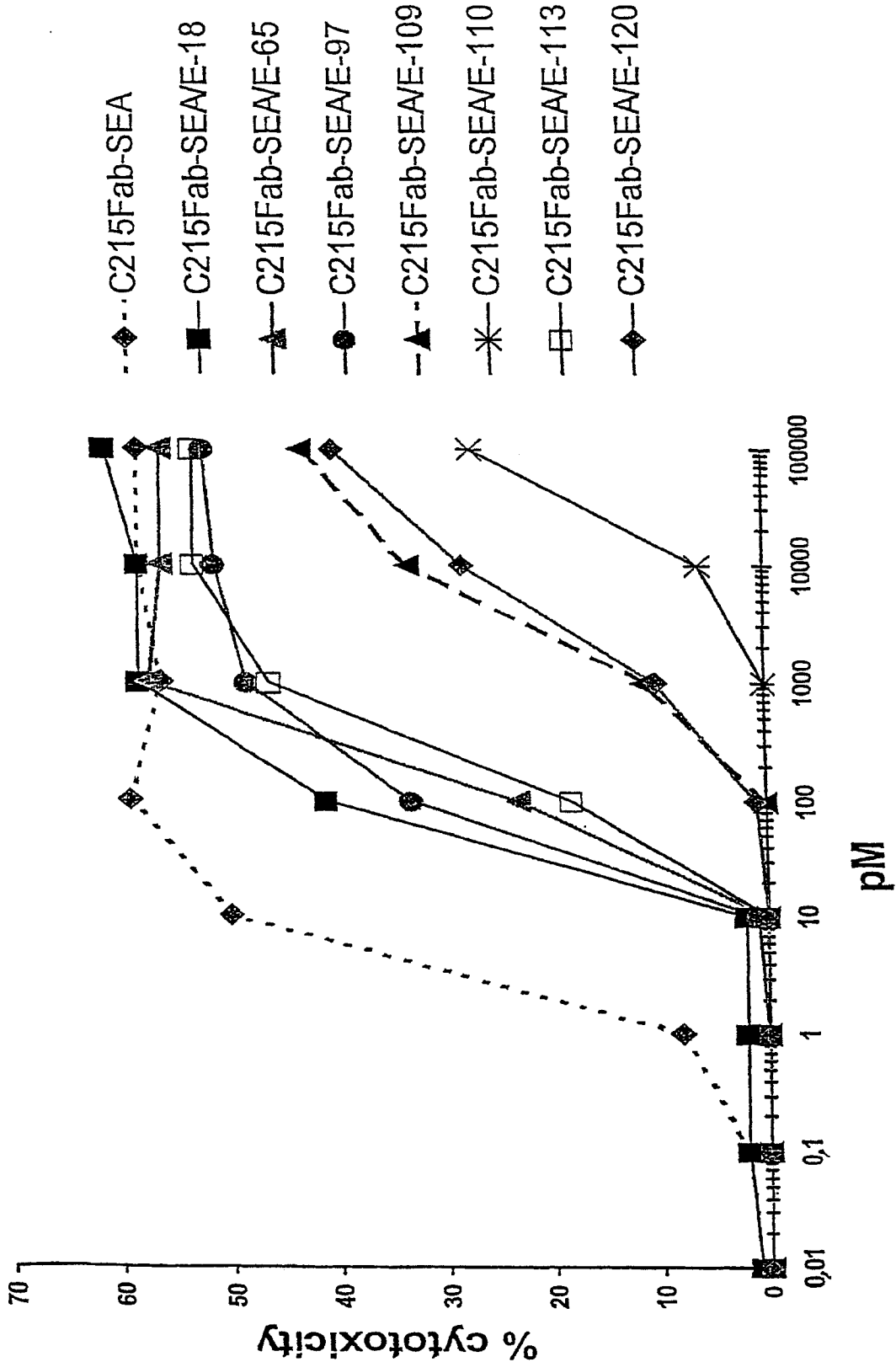


Koncentrace (nM)

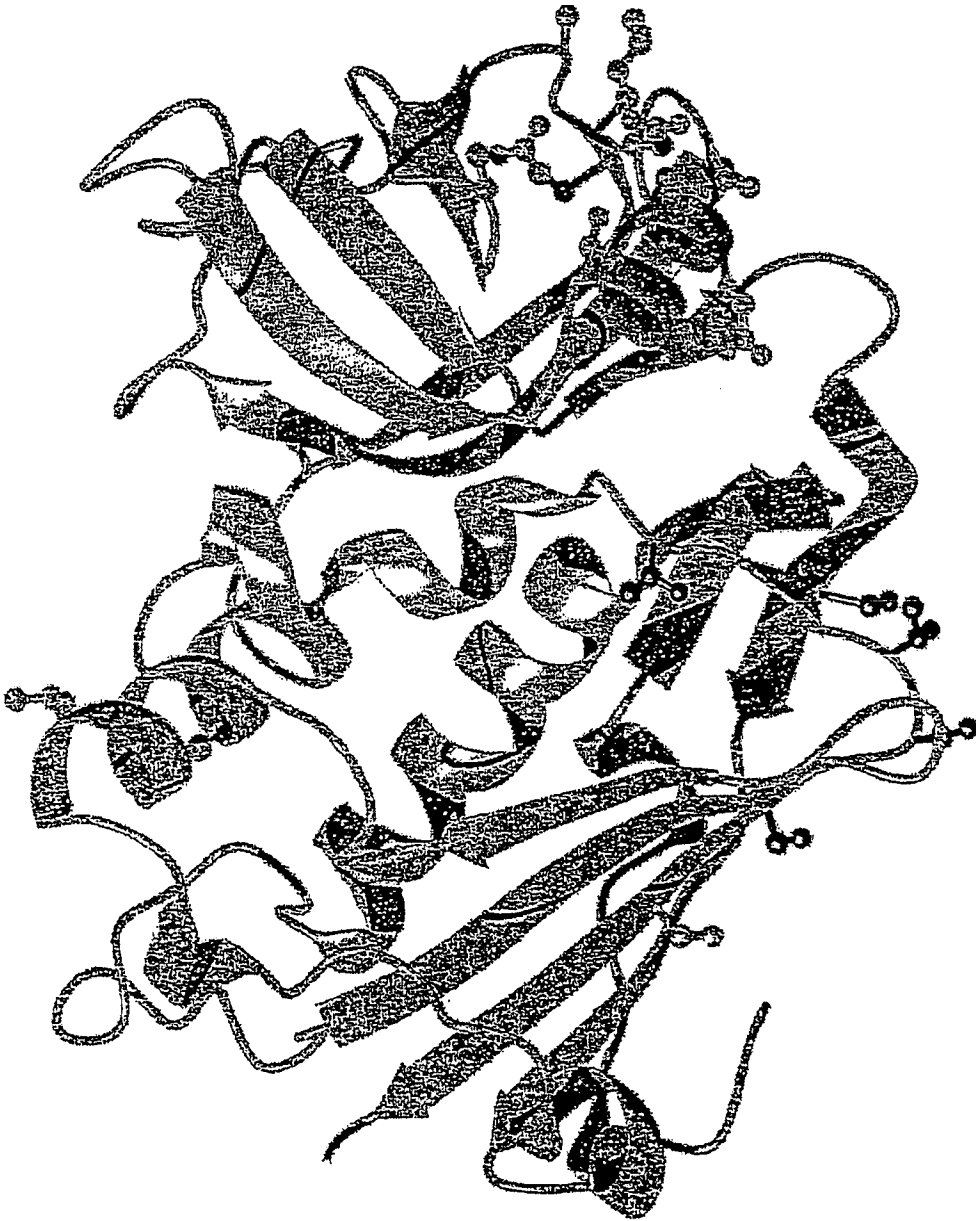
Obř. 7



Obr. 8A



Obr. 8B



Obr. 9

5T4 variabilní těžký řetězec	EVQLQ QSGPD LVKPG ASVKI SCKAS GYSFT GYMH WVKQS PGKGL EWIGR
SEQ ID NO: 1 1-50	
51-100	INPNN GVTLY NQFKK DKATL TVDKS STAY MELRS LTSED SAVYY CARST
51-100	C242 konstantní těžký řetězec
101-150	MITNY VMDYW GQGTS VIVSS AKTTP PSVYP LAPGS AAQTN SMVTL GCLVK
151-200	GYPFE PVTVT WNSGS LSSGV HFFPA VLQSD LYTLS SSVTV PSSTW PSETV
151-200	SEA/E-120
201-250	TCNVA HPASS TKVDK KIVPR DSGGP SEKSE EINEK DLRKK SELQG TALGN
251-300	LKQIY YYNSK AITSS EKSAD QFLTN TLLFK GFFTG HPWYN DLLVD LGSTA
301-350	ATSEY EGSSV DLYGA YGYQ CAGGT PNKTA CMYGG VTLHD NNRLT EEKKV
351-400	PINLW IDGKQ TTVPI DKVKT SKKEV TVQEL DLQAR HYLHG KFGLY NSDSF
401-450	GKVKQ RGLIV FHSSE GSTVS YDLFD ACGOY PDTLL RIYRD NTTIS STSLS
401-450	5T4 variabilní lehký řetězec
451-500	ISLYL YTTSI VMTQT PTSLL VSAGD RVTIT CKASQ SVSND VAWYQ QKPGQ
501-550	SPKLL ISYTS SRYAG VEDRF SGGY GTDFT LTISS VQAEV AAVYF COODY
501-550	C242 konstantní lehký řetězec
551-600	NSPPT FGGGT KLEIK RADA A PTVSI FPPSS EQLTS GGASV VCFLN NFYPK
601-650	DINVK WKIDG SERQN GVLNS WTDQD SKDST YSMSS TLLTL KDEYE RHNSY
651-672	TCEAT HKTST SPIVK SENRN ES

Obr. 10

Konec dokumentu

