



УКРАЇНА

(19) UA (11) 81908 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 38/20

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 15/62

A61P 29/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) РЕКОМБІНАНТНИЙ ХИМЕРНИЙ БІЛОК - АНТАГОНІСТ ANTN1

1

(21) 20041210147

(22) 08.05.2003

(24) 25.02.2008

(86) PCT/CU03/00006, 08.05.2003

(31) CU2002/0095

(32) 10.05.2002

(33) CU

(72) БЕЛЛО РІВЕРО ІРАЛЬДО, ТОРРЕС РУІЗ
ІЄНІ, БЛАНКО ГАРСЕЗ ЕЛІЗАБЕТ, ПЕНТОН
РОЛЛ ГІЗЕЛЬ, ЛОПЕЗ САУРА ПЕДРО(73) ЦЕНТРО ДЕ ІНЖЕНЕРІА ГЕНЕТИКА І
БІОТЕХНОЛОГІА(56) BELLO, Y. ET AL.: "The IFN-gamma
pathophysiology. The role of soluble IFN-gamma-R
alpha chain" BIOTECNOLOGIA APLICADA, vol. 12,
no. 3, 1995, pages 163-164, XP002251568
EP A 0393502, 24.10.1990
EP A 0614981, 14.09.1994
EP A 0621338, 26.10.1994
WO A 9421282, 29.09.1994
US A 5073627, 17.12.1991(57) 1. Рекombінантний химерний білок, до складу
якого входять фрагмент цитокіну, який кодує 60
амінокислот N-кінцевої ділянки людського
інтерлейкіну-2, представлений у лістингу
послідовностей як Послідовність № 5, і
позаклітинна ділянка рецептора цитокіну, що кодує
позаклітинну N-кінцеву ділянку альфа-ланцюга
рецептора людського γ-інтерферону,
представлену у лістингу послідовностей як
Послідовність № 7, а також сполучний пептид,
представлений у лістингу послідовностей як
Послідовність № 6.2. Рекombінантний химерний білок за п. 1, який
кодується послідовністю нуклеотидів,
представленою у лістингу послідовностей як
Послідовність № 8, і який є продуктом експресії
цієї послідовності.3. Рекombінантний химерний білок за будь-яким з
пп. 1-2, для продукування якого використовується
вектор рHu(AnTHI), хазяїном якого є E.coli.4. Рекombінантний химерний білок за будь-яким з
пп. 1-3, який відрізняється тим, що пригнічує

2

біологічну активність інтерлейкіну-2, γ-інтерферону
або обох цитокінів разом.5. Рекombінантний химерний білок за будь-яким з
пп. 1-4, який відрізняється тим, що має
рістстимулювальну активність Т-клітин, пригнічує
рістстимулювальну активність інтерлейкіну-2,
пригнічує антипроліферативну активність γ-
інтерферону і пригнічує індукцію HLA-II γ-
інтерфероном.6. Рекombінантний химерний білок за будь-яким з
пп. 1-5, який відрізняється тим, що становить
складову частину фармацевтичної композиції для
лікування захворювань, опосередкованих дією
інтерлейкіну-2, γ-інтерферону або спільною дією
обох цитокінів.7. Рекombінантний химерний білок за будь-яким з
пп. 1-6, який відрізняється тим, що становить
складову частину фармацевтичної композиції для
лікування аутоімунних захворювань, запальних
захворювань, відторгнення трансплантатів або
інфекцій, що викликаються мікроорганізмами.8. Рекombінантний химерний білок за будь-яким із
попередніх пунктів, який відрізняється тим, що
становить складову частину фармацевтичної
композиції для лікування розсіяного склерозу,
системного червоного вовчака, важкої
псевдопаралітичної міастенії, цукрового діабету,
ревматоїдного артриту, запальної хвороби
кишечнику, сепсису, псоріазу, атеросклерозу або
розладів, що викликаються ішемією, реперфузією.9. Ланцюг нуклеїнової кислоти, який відрізняється
тим, що має послідовність, представлену у
лістингу послідовностей як Послідовність № 8, і
який кодує рекombінантний химерний білок за
пп. 1-8.10. Ланцюг нуклеїнової кислоти за п. 9, який
відрізняється тим, що являє собою складову
частину молекули-носія або вектора для експресії
рекombінантного химерного білка за пп. 1-8.11. Ланцюг нуклеїнової кислоти за п. 9 або п. 10,
який відрізняється тим, що являє собою складову
частину фармацевтичної композиції для лікування

(13) C2

(11) 81908

(19) UA

захворювань, опосередкованих дією інтерлейкіну-2, інтерферону або спільною дією обох цитокінів.

12. Ланцюг нуклеїнової кислоти за будь-яким з пп. 9-11, який відрізняється тим, що являє собою

складову частину фармацевтичної композиції для лікування аутоімунних захворювань, запальних захворювань або інфекцій, що викликаються мікроорганізмами.

Цей винахід має відношення до біологічної науки, біотехнології та медицини, зокрема, до лікарського засобу, що може пригнічувати біологічну активність інтерлейкіну-2 (IL-2) та гамма-інтерферону (IFN γ), двох цитокінів, що приймають участь у регулюванні декількох функцій організму, підвищена кількість яких реєструється у патологічному стані. Цим, у свою чергу, запобігається інактивація імунної системи, що ставить під загрозу життя хворих.

Продуктування цитокінів хелперними Т-лімфоцитами (CD4+) та цитотоксичними Т-лімфоцитами (CD8+) відбувається за схемами продуктування цитокінів, які були позначені як Th1 і Th2. Схема Th1 характеризується продуктуванням IL-2, пухлинного некротичного фактора альфа (TNF α) і IFN γ , тоді як за схемою Th2 відбувається продуктування IL-4, IL-5, IL-6 та інших. Реакція подібного типу відіграє важливу роль у захисті організму, а також є стимулятором різних імунопатологічних реакцій.

Існує цілий ряд ситуацій, у яких наслідком запальних та неконтрольованих імунних реакцій є виникнення, розвиток і хронічний перебіг запальних і аутоімунних захворювань. Є приклади, що демонструють патологічну роль IL-2 та IFN γ у деяких із цих захворювань.

Розсіяний склероз являє собою дегенеративне демієлінізуюче аутоімунне захворювання. Роль IFN γ у цьому аутоімунному розладі є дуже чітко визначеною. Так, у клінічних дослідженнях із застосуванням IFN γ було показано, що подібна обробка викликає загострення захворювання [Panitch H.S. et al. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with interferon gamma. *Lancet* 1, 893-5, 1987]. У хворих, що страждають на цю хворобу, були також зареєстровані високі рівні матричної РНК (мРНК) і білків, що відповідають IL-2 та IFN γ [Lin J. et al. IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh* Page 19, 24-8, 1997]. Продуктування цих двох цитокінів клітинами хворих дозволяє висунути припущення про їх застосування як маркерів рецидиву розсіяного склерозу [Philippe J. et al. In vitro TNF-alpha, IL-2 and IFN-gamma production as markers of relapses in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 98, 286-90, 1996]. Спостерігається також, що IL-2 та IFN γ є залученими до активації неспецифічних лімфоцитів, наслідком чого є демієлінізація центральної нервової системи [Martino G. et al. Proinflammatory cytokines regulate antigen-independent T-cell activation by two separate calcium-signaling pathways in multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 43, 340-49, 1998]. На пацієнтах, що страждають на цю хворобу і не

реагують на лікування IFN β , зараз проводять клінічні випробування із застосуванням антитіла проти IL-2, відомого як даклізумаб (Daclizumab).

Червоний вовчак є іншим системним аутоімунним захворюванням, де присутність високих рівнів IL-2 і IFN γ асоціюється із загостренням цього захворювання [Viallard J.F. et al. Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN-gamma)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 115, 189-95, 1999]. З іншого боку, відсутність рецептора IFN γ зменшує продуктування автоантитіл у тваринних моделях вовчака [Haas C. et al. IFN-gamma receptor deletion prevents autoantibody production and glomerulonephritis in lupus-prone (NZBxNZW)F1 mice. *J. Immunol.* 160, 3713-18, 1998], а присутність розчинного рецептора IFN γ пригнічує виникнення хвороби [Ozmen L. et al. Experimental therapy of systemic lupus erythematosus: the treatment of NZB/W mice with mouse soluble interferon receptor inhibits the onset of glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* 25, 6-12, 1995]. Це було нещодавно перевірено на мишачій моделі вовчака із застосуванням химерного білка, до складу якого входить позаклітинна ділянка IFN γ , злита з Fc-фрагментом імуноглобуліну [Lawson B.R. et al. Treatment of murine lupus with cDNA encoding IFN-gammaR/Fc. *J. Clin. Invest.* 106, 207-15, 2000]. Ефективність молекули цього типу у разі червоного вовчака може, однак, обмежуватись явно вираженою дисфункцією рецептора Fc у пацієнтів, що страждають на червоний вовчак [Frank M. M. et al. Defective reticuloendothelial system Fc-receptor function in systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 300, 518-23, 1979, Dijstelbloem H.M. et al. Fc-gamma receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum* 43, 2793-800, 2000].

Важка псевдопаралітична міастенія вважається Т-клітинозалежним органоспецифічним аутоімунним захворюванням, опосередкованим автоантитілами проти ацетилхолінового рецептора і характеризується м'язовою слабкістю і втомлюваністю. Нещодавно було показано, що IFN γ сприяє утворенню автоантитіл проти ацетилхолінового рецептора, у той час як відсутність рецептора IFN γ зменшує сприйнятливості тваринних моделей до цього захворювання [Zhang G.X. et al. Mice with IFN-gamma receptor deficiency are less susceptible to experimental autoimmune myasthenia gravis. *J. Immunol.* 162, 3775-81, 1999]. IL-2 та інші цитокіни сприяють, разом з IFN γ , розвитку захворювання

[Zhang G.X. et al. Cytokines and the pathogenesis of myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 20, 543-51, 1997].

У разі діабету типу I (інсулінозалежного) або цукрового діабету, бета-клітини підшлункової залози знищуються аутоімунним механізмом. Існують *in vitro* дані відносно того, що IFN γ може бути токсичним для бета-клітин підшлункової залози [Stermes J. et al. Effects of prolonged exposure *in vitro* to interferon gamma and tumor necrosis factor-alpha on nitric oxide and insulin production of rat pancreatic islets. *Autoimmunity* 20, 185-90, 1995, Dunger A. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin secretion and cause DNA damage in unweaned-rat islets. Extent of nitric oxide involvement. *Diabetes* 45, 183-9, 1996, Baldeon M.E. et al. Interferon-gamma independently activates the MHC class I antigen processing pathway and diminishes glucose responsiveness in pancreatic beta-cell lines. *Diabetes* 46, 770-8, 1997]. Однак результати інших досліджень показують, що вплив IFN γ на клітини підшлункової залози, що продукують інсулін, є опосередкованим [Sarventick N. et al. Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature*, 346, 844-7, 1990]. Його вплив, найімовірніше, активується через макрофаги для продукування IL-1, TNF α і оксид азоту, що не мають безпосереднього впливу на бета-клітини і стимулюють експресію MHC I (головного комплексу гістосумісності) у бета-клітинах, сприяючи тим самим їх знищенню цитотоксичними лімфоцитами [Thomas H.E. et al. IFN-gamma action on pancreatic beta cells causes class I MHC upregulation but not diabetes. *J. Clin. Invest.* 102, 1249-57, 1998, Thomas H.E. et al. Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 16, 251-61, 2000]. Було показано також, що відсутність IFN γ уповільнює виникнення діабету, хоча і не запобігає йому [Hultgren B. et al. Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes* 45, 812-7, 1996]. У декількох повідомленнях показано, яким чином інактивація біологічної активності IFN γ може застосовуватись для запобігання діабету [Debray-Schaus M. et al. Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma. *J. Autoimmun.* 4, 237-48, 1991, Moosmayer D. et al. A bivalent immunoadhesin of the human interferon-gamma receptor is an effective inhibitor of IFN-gamma activity. *I. Interferon Cytokine Res.* 15, 1111-5, 1995, Prud'homme G.J. et al. Prevention of autoimmune diabetes by intramuscular gene therapy with a nonviral vector encoding an interferon-gamma receptor/IgG1 fusion protein. *Gene Ther.* 6, 771-7, 1999]. Було показано також, що IL-2, як інактиватор Т-клітин, може докладати свій внесок до цієї реакції по знищенню клітин, що продукують інсулін. Нещодавно були започатковані клінічні випробування лікування діабету типу I у дітей/підлітків віком від 10 років до 21 року із недавнім діагнозом цього захворювання із застосуванням антитіла проти IL-2, даклізумабу [Riley Hospital for Children. Project: Prevention of Diabetes Progression Trial (PDPT).

www.rileyhospital.org.]. Метою цього дослідження є запобігання розвитку процесу знищення бета-клітин у дітей з нещодавно встановленим діагнозом.

Відторгнення трансплантатів є складним процесом, у якому важливу роль відіграють клітинно-опосередкований імунітет та циркулюючі антитіла. У стандартному лікуванні з метою профілактики кризи відторгнення трансплантата застосовуються комбінації лікарських засобів, наприклад, циклоспорину, рапаміцину, азатіоприну, стероїдних препаратів тощо. Однак, навіть у разі такого лікування, більш ніж у 50% хворих, яким були пересаджені нирки, відбувається повільне відторгнення трансплантата впродовж 10 років. Реакція "трансплантат проти хазяїна" є головною причиною смерті серед хворих, яким було трансплантовано кістковий мозок. Було показано, що до розвитку цих реакцій, які ведуть до відторгнення трансплантатів і ставлять під загрозу життя пацієнтів, що були піддані трансплантації, свій внесок додають як IL-2, так і IFN γ [Hu H.Z. et al. Kinetics of interferon-gamma secretion and its regulatory factors in the early phase of acute graft-versus-host disease. *Immunology* 988, 379-85, 1999, Nakamura H. et al. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-12, IL-18, and IFN-gamma in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, S45-50, 2000].

Ревматоїдний артрит (RA) є хронічним системним захворюванням невідомої етіології, що характеризується запаленням, гіперплазією синовіальних оболонок суглобів і руйнуванням уражених суглобів. IL-2, взагалі, вважають цитокином, що викликає запалення і загострює стан захворювань типу Th1, наприклад, аутоімунного артриту. Нещодавні дослідження показали, що рівень матричної РНК IL-2 підвищується на гострій стадії артриту, що викликається на тваринній моделі колагеном [Thornton S. et al. Heterogeneous effects of IL-2 on collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 165, 1557-63, 2000]. З іншого боку, на тваринних моделях було зареєстроване загострення хвороби, що пов'язується з підвищенням рівня IFN γ [Tellander A.C. et al. Potent adjuvant effect by anti-CD40 in collagen-induced arthritis. Enhanced disease is accompanied by increased production of collagen type-II reactive IgG2a and IFN-gamma. *J. Autoimmun.* 14, 295-302, 2000]. У тканині синовіальної оболонки суглобів пацієнтів, що страждають на ревматоїдний артрит, були значно підвищені рівні як IL-2, так і IFN γ [Canete J.D. et al. Differential Th1/Th2 cytokine patterns in chronic arthritis: interferon gamma is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis compared with seronegative spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 59, 263-268, 2000].

Запальна хвороба кишечника включає два розлади шлунково-кишкового тракту: хворобу Крона і неспецифічний виразковий коліт. Характерною ознакою цих хвороб є хронічне запалення кишечника. Хвороба Крона являє собою запальний розлад, яким охоплюється внутрішня

поверхня стінки кишечника і який проникає до його найглибших шарів. Це запалення може віднаходитись у будь-якій частині травної системи (стравохід, шлунок, тонка кишка, товста кишка або задній прохід). Фірма Protein Design Labs повідомила про початок клінічних випробувань стадії I/II на хворих, що страждають на хворобу Крона (у межах від помірної до тяжкої), із застосуванням антитіла проти $IFN\gamma$ (SMART-антитіло проти гамма-інтерферону) [Fremont C.A. Protein Design Labs Announces Phase I/II Trial of SMART[®] Anti-Gamma Interferon Antibody in Crohn's Disease. Protein Design Labs, Inc. (Nasdaq), January 10, 2001]. Неспецифічний виразковий коліт обмежується слизовою оболонкою та підслизовою основою товстої кишки (товста або пряма кишка). Нещодавно на Щорічному Конгресі Американської Спілки Гастроентерологів (Annual Congress of the American Association of Gastroenterology) на мишачій моделі коліту було продемонстровано, що зменшення рівнів $IFN\gamma$ у кровотоці є маркером ремісії [Yawn I. Annual meeting of the American Gastroenterology Association. May 20-23, 2001. Georgia World Congress Center. Atlanta, Georgia.].

Септичний шок є результатом дисемінації мікроорганізмів тяжких інфекційних захворювань із кровотоком. Септичний шок частіше викликається грамнегативними бактеріями, набутими у лікарнях, і є більш поширеним серед хворих з ослабленим імунітетом та таких, що страждають на хронічні захворювання. У третини хворих септичний шок викликають грампозитивні мікроорганізми та *Candida albicans*. У разі септичного шоку, що викликається як грамнегативними, так і грампозитивними бактеріями, $IFN\gamma$ і IL-2 сприяють летальності запальних реакцій, у яких вони беруть участь. $IFN\gamma$ є летальним посередником у тваринних моделях септичного шоку [Heremans H. et al. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Schwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.* 171, 1853-69, 1990, Wysocka M. et al. Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *Eur. J. Immunol.* 25, 672-676, 1995, Kuschnaroff L.M. et al. Increased mortality and impaired clonal deletion after staphylococcal enterotoxin B infection in old mice: relation to cytokines and nitric oxide production. *Scand. J. Immunol.* 469-478, 1997]. Як і у разі тваринних моделей інших захворювань, відсутність рецептора $IFN\gamma$ у цих тварин робить їх стійкими до ендотоксичного бактеріально-токсичного шоку [Car B.D. et al. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *Exp. Med.* 179, 1437-1444, 1994]. Подібним чином, декілька повідомлень показують участь IL-2 у розвитку та летальних наслідках септичного шоку [Micusan V.V. et al. Production of human and murine interleukin-2 by toxic shock syndrome toxin-1. *Innology* 58, 203-208, 1986, Arad G. et al. Superantigen antagonist protects against lethal shock and defines a new domain for T-cell activation. *Nat. Med.* 6, 378-9, 2000, Stevens D.L. et al. Streptococcal toxic shock syndrome associated with necrotizing fasciitis. *Annu. Rev. Med.* 51, 271-288, 2000]. Мононуклеарні клітини, культивовані in vitro

з IL-2, що виділяють вторинні цитокіни, наприклад, IL-1, $TNF\alpha$ і $IFN\beta$, є причетними до патофізіології септичного шоку.

Звичайний псоріаз є складним та полігенним шкірним захворюванням, потенційно опосередковане передзапальними цитокінами, що продукуються пошкодженими Т-клітинами. Невідповідна хронічна експресія цих цитокінів веде до імунної активації клітин і до пошкодження тканин. Цей процес характеризується надмірним продукуванням шкірних клітин і утворенням кровоносних судин, які, ймовірно, є відповідальними за почервоніння і утворення бляшок, які є частиною цього захворювання. Встановлено патологічну роль $IFN\gamma$ і IL-2 для псоріазу. Більшість епідермальних клітин у разі звичайного псоріазу продукує IL-2, $IFN\gamma$ і $IFN\beta$, які визначаються, як Т-цитотоксичні клітини. У пацієнтів, що страждають на псоріаз, були виявлені високі рівні $IFN\gamma$ і IL-2, а не IL-4. Це може пов'язуватись із дисбалансом популяцій Т-клітин, що сприяє тривалій або хронічній імунній активації цих клітин [Schaak J.F. et al. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J. Invest. Dermatol.* 102, 145-149, Austin L.M. et al. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining Th1 (cytotoxic T lymphocyte) and Th1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J. Invest. Dermatol.* 113, 752-759, 1999]. У разі лікування псоріазу із застосуванням даклізумабу були одержані обнадійливі результати [Krueger J.M. et al. Successful in vivo blockade of CD25 (high-affinity interleukin 2 receptor) on T cells by administration of humanized anti-Tac antibody to patients with psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43, 448-458, 2000]. Нещодавно розпочали нове випробування цього лікарського засобу [Fremont C.A. Protein Design Labs Presents Three Humanized Antibodies in Clinical Development for Psoriasis at International Psoriasis Symposium. June 22, 2000. Protein Design Labs, Inc. (PDL) Nasdaq].

Існують інші, менш вивчені захворювання, у разі яких застосування антагоніста проти IL-2 та $IFN\gamma$ також може бути корисним; у цьому разі це може бути атеросклероз та ішемія/реперфузія. Атеросклероз та посттрансплантаційний атеросклероз характеризуються розширенням внутрішньої артеріальної оболонки, як результат інфільтрації мононуклеарних лейкоцитів, проліферації клітин гладеньких м'язів судин і накопичення позаклітинного матриксу, а також присутності $IFN\gamma$ [Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126, 1999, Hansson G.K. et al. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 9, 567-578, 1989, Libby P. et al. Functions of vascular wall cells related to development of transplantation-associated coronary arteriosclerosis. *Transplant. Proc.* 21, 3677-3684, 1989]. Було показано, що екзогенний $IFN\gamma$ посилює атеросклероз тваринної моделі [Whitman S. C. et al. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Am. J.*

Pathol. 157, 1819-1824, 2000]. З іншого боку, було показано, що нейтралізація IFN γ у сироватці, а також відсутність його гена зменшує ступінь розширення внутрішньої оболонки [Gupta S. et al. IFN γ potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. J. Clin. Invest. 99, 2752-2761, 1997, Nagano H. et al. Interferon γ deficiency prevents coronary arteriosclerosis but not myocardial rejection in transplanted mouse hearts. J. Clin. Invest. 100, 550-557, 1997, Raisanen-Sokolowski A. et al. Reduced transplant arteriosclerosis in murine cardiac allografts placed in interferon γ knockout recipients. Am. J. Pathol. 152, 359-365, 1998]. Нещодавно було доведено, що IFN γ стимулював інтенсивність атеросклерозу за відсутності лейкоцитів [Tellides G. et al. Interferon γ elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. Nature 403, 207-211, 2000]. Ішемія і реперфузія характеризуються перериванням кровотоку на ділянці з подальшим припиненням постачання кисню та поживних речовин; реперфузія характеризується повним або частковим відновленням кровотоку до тканини, яка була ішемічною, що є частим клінічним явищем. Це може спостерігатись під час гіповолемічного та септичного шоку, інфаркту міокарда, емболії, підвищення тиску у будь-якій анатомічній порожнині, відмороження, трансплантації органу тощо. Тканинна гіпоксія, у будь-якому разі, викликає зміну клітинного метаболізму, складні біохімічні та молекулярні модифікації якого стають все краще зрозумілими. Пошкодження, викликане реперфузією, викликає у подальшому загибель клітин та порушення функціонування ендотелію унаслідок відновлення кровотворної тканини. Повідомлялось, що IFN γ та IL-2 є посередниками пошкодження, якому піддаються органи унаслідок ішемії та реперфузії [Serrick C. et al. The early release of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma after ischemia reperfusion injury in the lung allograft. Transplantation 58, 1158-1162, 1994, March A.R. C. et al. Ischemia/Reperfusion-induced IFN-gamma Or-Regulation: Involvement of IL-12 and IL-18. The Journal of Immunology 162, 5506-5510, 1999].

Декілька авторів наводили опис антагоністів IFN γ . Пригнічення протівірусної активності людського IFN γ його рекомбінантним розчинним рецептором описується у [EP 0393502 A1]. Повідомлялось також про те, що рекомбінантний розчинний рецептор мишачого IFN γ пригнічує виникнення гломерулонефриту у мишей [Ozmen L. et al. Experimental therapy of systemic lupus erythematosus: the treatment of NZB/W mice with mouse soluble interferon-gamma receptor inhibits the onset of glomerulonephritis. Eur. J. Immunol. 25, 6-12, 1995]. Були сконструйовані три мишачі IFN γ . До їхнього складу входять химерні білки, що включають позаклітинну ділянку мишачого рецептора IFN γ і константні ділянки імуноглобулінових молекул. Ці генно-інженерні конструкції нейтралізують протівірусну активність мишачого IFN γ і мають подовжену середню тривалість життя у крові [Cornelia K. et al. Construction, purification, and characterization of new interferon gamma (IFN γ) inhibitor protein. J. Biol.

Chemistry. 267, 9354-9360, 1992, європатент EP 0614981 A1]. Потенційне застосування фрагмента імуноглобуліну або його Fc-фрагмента, злитого з розчинним рецептором IFN γ , при червоному вовчаку у людей може обмежуватись продемонстрованим порушенням функціонування рецептора Fc у разі цього аутоімунного розладу [Frank M. M. et al. Defective reticuloendothelial system Fc-receptor function in systemic lupus erythematosus. N. Engl. J. Med. 300, 518-523, 1979]. Інгібітор цього типу є монофункціональним і, як наслідок, має менший масштаб дії.

Застосування нейтралізуючих антитіл проти IFN γ у мишей зменшує інтенсивність реакції "трансплантат проти хазяїна" [Mowat A. et al. Antibodies to IFN gamma prevent immunologically mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reaction. Immunology 68, 18-23, 1989]. При вивченні шкірних алотрансплантатів, антитіла проти IFN γ пригнічували відторгнення лише у тому разі, коли трансплантат був несумісним з антигенами МНС (головний комплекс гістосумісності) класу II. Це дозволяє припустити, що IFN γ сприяє відторгненню алотрансплантата шляхом індукції антигенів МНС класу II [Rosenberg A. et al. Specific prolongation of MHC class II disparate skin allografts by in vivo administration of anti-IFN gamma monoclonal antibody. J. Immunol. 144, 4648-4650, 1990]. Були одержані також однокланцюгові антитіла з варіабельною ділянкою (scFv) проти людського IFN γ , що експресувались бактеріями. Була доведена їхня ефективність щодо нейтралізації біологічної активності мишачого IFN γ [Froyen G. et al. Bacterial expression of a single-strand antibody fragment (scFv) that neutralizes the biological activity of human interferon γ . Mol. Immunol. 30, 805-812, 1993]. У разі застосування антитіл при лікуванні людей виникає проблема реакцій хазяїна проти імуногенних ділянок цих гетерологічних молекул, а у разі застосування химерних та гуманізованих антитіл виникає проблема втрати спорідненості та специфічності [Merluzzi S. et al. Humanized antibodies as potential drugs for therapeutic use. Adv. Clin. Path., 4, 77-85, 2000], а також проявів токсичності [Clark M. et al. Antibodies to IFN gamma prevent immunologically mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reaction. Immunology 68, 18-23, 2000].

Повідомлялось також про інші аналогічні рішення. Пропонувались суміші цитокіну з його розчинним рецептором, однак вони мали на меті підсилення ефекту цитокінів. У цьому випадку цитокін та його рецептор продукуються незалежно один від одного і пізніше змішуються у одному препараті, як було показано у [WO 94/21282].

Циклоспорин А, FK506 і рапаміцин є сильнодіючими супресорами імунної системи, зокрема, Т-клітин, і застосовуються для запобігання відторгнення трансплантатів. Перші два пригнічують трансдукцію сигналу, яка започатковується рецептором антигену до Т-клітин і веде до транскрипції ранніх генів активації. Сюди входить транскрипція гена, що кодує IL-2, необхідний для переходу клітинного циклу від стану покою G0 до перед синтетичного періоду

G1. Рапаміцин не впливає на ранній синтез цитокінів Т-клітинами, однак він пригнічує реакцію цих клітин на IL-2, необхідну для переходу клітинного циклу від періоду G1 до фази синтезу S [Waldmann I.A. et al. The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. *Immunology Today* 14, 264-270, 1993]. Рапаміцин забезпечує можливість специфічної активації Т-клітин, однак запобігає їх клональній експансії шляхом втручання до процесу передачі сигналу завдяки бета-ланцюгу рецептора IL-2 (β IL-2) [Woerly G. et al. Effect of rapamycin on the expression of the IL-2 receptor (CD25). *Clin. Exp. Immunol.* 103, 322-7, 1996]. Циклоспорин А значно підвищує виживаність ниркових алотрансплантатів, у той час як він також зменшує ймовірність виникнення аутоімунних захворювань. Застосування цих імуносупресорів обмежується з причини їхніх токсичних ефектів, а саме шлунково-кишкових ускладнень, гіпертрофії ясен і, особливо, дозозалежної нефротоксичності та гіпертензії [Hortelano S. et al. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 2315-2323, 2000, Tsimaratos M. et al. Kidney function in cyclosporine-treated paediatric pulmonary transplant recipients. *Transplantation* 69, 2055-9, 2000].

Моноклональні антитіла, що блокують взаємодію IL-2 з його рецептором, застосовували на тваринних моделях для пригнічення реакції "трансплантат проти хазяїна" і відторгнення алотрансплантатів. Ці антитіла застосовувались також на гризунах для пригнічення аутоімунних розладів. У клінічних випробуваннях антитіла проти альфа-ланцюга рецептора IL-2 (α IL-2) поліпшували перебіг реакції "трансплантат проти хазяїна", що не піддавалась лікуванню стероїдними препаратами. Ці зусилля, однак, є обмеженими з причини антигенності цих антитіл. Було встановлено, що однокланові антитіла варіабельної ділянки пригнічують зв'язування IL-2 із субодиницею γ рецептора IL-2 і впливають на біологічну активність IL-2, що перевірялась на лінії мишачих клітин CTLL-2, як описано у [EP 0621338 A2]. Одержання гуманізованих антитіл поліпшило терапію такого типу, однак вони все ще не позбавлені вад, які згадувались вище. У терапії такого типу перевірялись також моноклональні антитіла, кон'юговані з токсинами або мічені радіоактивними ізотопами [Waldmann T.A. Genetically engineered monoclonal antibodies armed with radionuclides. *Year Immunol.* 7, 205-12, 1993]. Повідомлялось про застосування токсинів, злитих з антитілами проти IL-2 або з IL-2 для знищення клітин, що експресують рецептор IL-2 і сприяють розвитку патогенних станів, наприклад, у [WO 92/20701] та у [EP 0369316 A2]. Застосування цих лікарських препаратів навряд чи можна рекомендувати з причини неспецифічної токсичності імунотоксинів [Frankel A. E. et al. Clinical trials of target toxins. *Cancer Biology* 6, 307-317, 1995], а також їхньої імуногенності [Chen S.-Y. et al. Design of genetic immunotoxin to eliminate toxin immunogenicity. *Gene Therapy* 2, 116-123, 1995]. Розробляють антитіла проти IL-2 для лікування ревматоїдного артриту [Simon L.S. et al. New and

future drug therapies for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 39 Suppl. 1:36-42, 2000]. Антитіла, спрямовані проти α IL-2, застосовують для запобігання відторгнення ниркових трансплантатів [Olyaei A.J. et al. Use of basiliximab and daclizumab in kidney transplantation. *Prog. Transplant.* 11, 33-37, 2001]. Обмеження щодо застосування антитіл при довгостроковому лікуванні описувались вище.

Нейтралізація передзапальних цитокінів, наприклад, $\text{TNF}\alpha$ [Beutler B. et al. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229, 869-871, 1989] або IL-1 [Natanson C. et al. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanism of pathogenesis. *Ann. Intern. Med.* 120, 771-83, 1994], зменшувала рівень смертності унаслідок сепсису у декількох тваринних моделей. Однак у клінічних випробуваннях із застосуванням антагоністів IL-1 (антагоніст рецептора IL-1) [Fischer C.J. et al. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome: results from randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JAMA* 271, 1836-1843, 1994] та $\text{TNF}\alpha$ (рекомбінантний химерний білок: розчинний рецептор TNF/Fc) [Fischer C.J. et al. Treatment of septic shock with tumor necrosis factor receptor. Fc fusion protein. *N. Engl. J. Med.* 334, 1697-1702, 1996] вони не лише не викликали поліпшень, але також підвищили рівень смертності унаслідок деактивації імунної системи. Управління із санітарного нагляду за харчовими продуктами і медикаментами (США) схвалило два антагоністи $\text{TNF}\alpha$ [Lipsky P. E. et al. Infliximab and Methotrexate in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.*, 343, 1594-1602, 2000], які продемонстрували сприятливі ефекти при лікуванні ревматоїдного артриту. Одним з них є антитіло проти субодиниці рецептора $\text{TNF}\alpha$ (інфліксимаб (Infliximab)). Нейтралізація $\text{TNF}\alpha$ поза певні межі може викликати деактивацію імунної системи, як було продемонстровано на моделі з пацюками, що страждають на ревматоїдний артрит [Colagiovanni D.B. et al. TNF-alpha blockade by a dimeric TNF type I receptor molecule selectively inhibits adaptive immune responses. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 22, 627-651, 2000]. У пацієнтів, які одержували інфліксимаб, спостерігалась підвищена частота інфекцій, порівняно з контрольними групами, які не одержували цього препарату (групи, що одержували плацебо) [Schaible T.F. Long term safety of infliximab. *Can. J. Gastroenterol.* 14 Suppl. C.29C-32C, 2000], а також поява аутоантитіл і розвиток вовчака [Markham A. et al. Infliximab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* 59, 1341-1359, 2000]. Етанерцепт (Etanercept) являє собою химерний білок, зв'язаний з розчинним рецептором $\text{TNF}\alpha$ і Fc-фрагментом IgG1 [Moreland L.W. et al. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 130, 478-486, 1999]. Тимчасове припинення лікування викликає у хворого рецидив; таким чином, цей лікарський препарат хвороби не лікує. Це означає, що хворого слід лікувати

впродовж тривалих періодів часу. Хоча впродовж короткострокових досліджень суттєвих негативних ефектів не спостерігалось, тривале лікування може викликати появу антитіл проти цієї молекули [Russel E. et al. Patients receiving etanercept may develop antibodies that interfere with monoclonal antibody laboratory assays. *Arthritis Rheum* 43, 944-47, 2000]. У декількох випадках лікування хворих етанерцептом повідомлялось про розвиток летальної гіпопластичної анемії, а також панцитопенії та синдромів демієлінізації [Klippel J.H. Biologic Therapy for Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.*, 343, 1640-1, 2000].

До цього часу у клінічних умовах не застосовувався жоден антагоніст IFN γ . Вивчалися антагоністи багатьох цитокінів із метою застосування їх для запобігання, полегшення або ліквідації запальних і аутоімунних реакцій, що пошкоджують тіло унаслідок тимчасової зміни або хронічності. Багато з них виявились неефективними. У деяких випадках антагоніст обмежується молекулою цитокіну і масштаби його дії і активності є обмеженими, оскільки дози антагоніста не можуть підвищуватись з приводу його токсичності. У антагоністів, що були здатними до нейтралізації цитокіну, цей ефект був екстремальним і викликав деактивацію важливих функцій організму (імунної системи).

IL-2 взаємодіє зі своїм R α IL-2. Ця субодинаця є здатною до інтерналізації IL-2, що було продемонстровано для Т- та В-лімфоцитів, і, ймовірно, повторно повертається на поверхню (піддається рециклізації), у той час як інші ланцюги цього рецептора розпадаються після інтерналізації [HemarA. et al. Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains. *J. Cell. Biol.* 129, 55-64, 1995]. IFN γ інтерналізується і розпадається, у той час як його рецептор піддається рециклізації [Celada A. et al. Internalization and degradation of receptor-bound interferon-gamma by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling. *J. Immunol.* 139, 147-153, 1987]. Характеристики інтерналізації IL-2 його R α IL-2, а також характеристики інтерналізації IFN γ його рецептором, вказують на потенційну рециклізацію принаймні позаклітинної ділянки рецептора IFN γ , яка є складовою частиною химерного антагоніста AnTh1. Наслідком цього є подовження присутності цієї молекули у кровотоці і, таким чином, її впливу.

Наслідком об'єднання або кон'югації двох молекул часто є значне зниження або втрата біологічної активності споріднених молекул із причини конформаційних змін, що відбуваються або просторового взаємовпливу, що виникає як наслідок утворення нової молекули [Knusli C. et al. Polyethylene glycol (PEG) modification of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) enhances neutrophil priming activity but not colony stimulating activity. *Br. J. Haematol.* 82, 654-663, 1992]. Застосовувались певні альтернативні варіанти, як, наприклад, у [патенті США №5,073,627], у якому наведено опис сполучного пептиду, який з'єднує гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор

(GM-CSF) з IL-3. Проблема з пептидами цього типу полягає у тому, що вони можуть бути жорсткими і негнучкими. Як наслідок, білок не може рухатись для набуття точної конформації, яка б надавала йому можливість відповідного здійснення його біологічної активності. Таким чином, необхідно також конструювати та віднаходити пептиди, що можуть зв'язувати дві молекули і одночасно надавати кожній з них можливість для набуття відповідної конформації з одержанням біологічно активної молекули. Приймаючи останнє до уваги, необхідними є безпечніші, більш ефективні і більш специфічні імуносупресорні та протизапальні лікарські засоби. Важливо, таким чином, одержати молекулу з більшою функціональною різнобічністю, яка пригнічує усі патологічні активності або функції лікарських препаратів цілеспрямованої дії, однак, одночасно з цим, може надавати можливість здійснення важливих функцій для організму із забезпеченням можливості їхнього тривалого застосування без виникнення загрози для життя хворих. Антагоніста, який може одночасно перешкоджати дії двох цитокінів і запобігати пригніченню імунної системи, поки що не було створено.

Сутністю цього винаходу є рекомбінантний химерний білок, який називають AnTh1, що складається з фрагмента (який включає 60 амінокислот) N-кінцевої ділянки людського IL-2, злитого, через пептид довжиною у 4 амінокислоти, з N-кінцевою позаклітинною ділянкою альфа-субодинаці рецептора IFN γ , до складу якої входить 228 амінокислот. Цей білок має рістстимулювальну активність Т-клітин, він пригнічує рістстимулювальну активність Т-клітин, індуковану IL-2, він пригнічує індукування системи HLA-II (антигени головного комплексу гістосумісності людини) IFN γ і він пригнічує антипроліферативну активність IFN γ . Послідовність ДНК, що відповідає першим 60 амінокислотам N-кінцевої ділянки людського IL-2 та сполучному пептиду (Послідовність №5) і послідовність сполучного пептиду і ДНК, що кодує 228 амінокислот позаклітинної ділянки R α IFN γ (Послідовність №7), одержали шляхом зворотної транскрипції полі(A)-сайту РНК Jurkat- та Raji-клітин, відповідно, і ампліфікували зі специфічними праймерами засобами полімеразно-ланцюгової реакції (PCR) (дивись приклад 1, Послідовність №1 і Послідовність №2, Послідовність №3, Послідовність №4). Послідовність ДНК, що відповідає сполучному пептиду (Послідовність №6), сконструювали з цією метою і додали до праймерів, що застосовувались для ампліфікації ділянки розчинного рецептора R α IFN γ .

У цьому винаході наводять також опис вектора, що застосовувався для продукування за допомогою E.coli рекомбінантного білка AnTh1, який було названо рHu(AnTh1), що був депонований у Бельгійській Координативній Колекції Мікроорганізмів (BCCM) під номером LMBP 4535 6 травня 2002 року. Цей вектор одержали за допомогою методу рекомбінантних ДНК [Sambrook et al. *Molecular Cloning - A laboratory Manual*, 2 ed., Cold Spring Harbor, New

York, 1989]. Згаданий вектор модифікували і зараз він включає відповідний маркер, триптофановий промотор і послідовність, що кодує 60 амінокислот людського IL-2, сполучний пептид і 228 амінокислот позаклітинної ділянки RαIFNγ (Послідовність №8). Одержаний вектор кінцевої конструкції називають рHu(AnTH1), (дивись приклад 2, Фіг.1).

У цьому винаході наводять також опис штаму E.coli, трансформованого вектором рHu(AnTH1). Вектор рHu(AnTH1) було застосовано для трансформування штаму E.coli W3110P3. Штам E.coli W3110P3, що містить вектор рHu(AnTH1), культивували і індукували для експресії рекомбінантного химерного білка AnTH1. Згаданий штам забезпечує високий ступінь експресії білка (дивись приклад 4). Цей білок може експресуватись іншими клітинами-хазяями (клітинами комах, клітинами ссавців і рослинними клітинами із застосуванням відповідних векторів).

У цьому винаході наводять також опис одержання рекомбінантного химерного білка відповідного ступеня чистоти для визначення його біологічної активності способом, який забезпечує одержання препарату біологічно активного білка 80-90% чистоти. Клітинний осад, який одержали шляхом культивування штаму після індукції, піддавали обробці з метою екстрагування рекомбінантного білка. Подальше послідовне промивання осаду здійснювали за допомогою солюбілізаторів (денатураційних), що забезпечують екстрагування відповідного білка з мінімальною кількістю забруднювальних білків E.coli. Після досягнення штаму після індукції, цих процедур відповідного ступеня чистоти (80-90%), препарат, що містив білок AnTH1, піддавали повторному впорядкуванню. Ця процедура полягає у повільному видаленні денатураційних агентів. Згаданий спосіб ілюструється у прикладі 5.

У цьому винаході наводять опис біологічної активності рекомбінантного білка AnTH1. Цей білок має рістстимулювальну активність Т-клітин (приклад 7). Він здатен впливати на стимулювання проліферації Т-клітин, що індукується людським IL-2 у лінії мишачих клітин CTLL-2 (приклад 8). Він здатен пригнічувати антипроліферативну активність людського IFNγ у лінії клітин Her-2 (приклад 9) і він також пригнічує стимулювання IFNγ експресії HLA-II у лінії клітин COLO 205 (приклад 10). Людський IL-2, у протилежність до IFNγ, може також впливати на мишачі клітини.

Цей рекомбінантний білок може застосовуватись для одержання фармацевтичної композиції, придатної для лікування захворювань, у яких патологічну роль відіграють як IL-2, так і IFNγ. Це можуть бути хвороби автоімунного типу, наприклад, розсіяний склероз, системний червоний вовчак, важка псевдопаралітична міастенія, інсулінозалежний цукровий діабет, активний хронічний гепатит і блискавичний гепатит; автоімунного/запального типу, наприклад, ревматоїдний артрит і псоріаз, а також відторгнення органів, реакція "трансплантат проти хазяїна" і запальні захворювання, наприклад, септичний шок, а також атеросклероз.

Цей винахід пропонує новий спосіб запобігання, втручання та/або ліквідування дій двох цитокінів, що мають патогенні функції у різних захворюваннях. Таким чином, ціль цього винаходу розширюється із набуттям більш конкретної форми. Застосування химерного білка, що може нейтралізувати або впливати на системи передачі сигналів двох цитокінів у однакових патологічних ситуаціях, надає можливість розширення шляхів впливу і, таким чином, підвищення ефективності. Наявність певної рістстимулювальної активності Т-клітин виключає небажану інактивацію імунної системи, що надає можливість більш тривалого застосування пацієнтами та для лікування нозологічних одиниць, які потребують цього. Таким чином, цей лікарський препарат є більш безпечним і більш ефективним. Ціль цього винаходу полягає у створенні гетеробівалентного антагоніста, що може впливати на функції людського IL-2 та IFNγ з підсиленням терапевтичних можливостей молекули і запобіганням негативних реакцій.

Депонування мікроорганізмів

Плазміда рHu(AnTH1) була депонована за Будапештським Договором про Захист Мікроорганізмів до Бельгійської Координованої Колекції Мікроорганізмів (BCCM) під номером LMBP 4535 6 травня 2002 року.

Фіг.1. Генно-інженерна плазміда рHu(AnTH1) для експресії рекомбінантного химерного білка AnTH1.

Фіг.2. Експресія E.coli химерного білка AnTH1. Електрофорез у 12,5% поліакриламідному гелі за відновних умов, а: стандарт молекулярної маси; b, c, d: негативний контрольний штам через 0год, 8год і 18год індукції; e, f, g: штам, що містить плазмиду рHu(AnTH1), за умов індукції через 0год, 8год, 18год.

Фіг.3. Присутність рекомбінантного химерного білка AnTH1 на різних стадіях процесу напівочищення. А: Електрофорез у 12,5% поліакриламідному гелі за відновних умов. На лінії а: стандарт молекулярної маси; b: ферментація; c: екстрагування розчином сечовини (8M); d: змішані гель-хроматографічні фракції; e: суміш фракцій після діалізу. В: "Вестерн-блотинг" із застосуванням антисироватки проти AnTH1, розведеної 1:1000 у 1% забуференому фосфатом фізіологічному розчині/знежиреному молоці, виділеної з антитіл проти штаму E.coli W3110P3. В: На лініях a, b, c, d були застосовані ті самі зразки і у тому самому порядку, який наведено для електрофорезу на Фіг.А (стандарт молекулярної маси не застосовувався).

Фіг.4. Ідентифікація химерного білка AnTH1 засобами "вестерн-блотингу". Для ідентифікації застосовували антисироватки (А) проти IL-2 та (В) проти AnTH1. Коефіцієнт розведення у обох випадках становив 1:1000. На лінії a застосовували препарат AnTH1, який було піддано повторному впорядкуванню після діалізу; на лінії b застосовували IL-2.

Фіг.5. Аналіз зв'язування людського IFNγ, міченого I¹²⁵, із химерним білком AnTH1 засобами "дот-блотингу". Застосовували приблизно 1мкл гель-хроматографічних фракцій, елюйованих на

нітроцелюлозній мембрані. Смуги інкубували з $\text{IFN}\gamma$, міченим ^{125}I (35мкКі/мкг) за відсутності (лінія а) та у присутності (лінія б) надлишку людського $\text{IFN}\gamma$ (у 100 разів більше).

Фіг.6. Рістстимульовальна активність Т-клітин рекомбінантного химерного білка AnTH1. Стовпчик 1: 2,8нг/мл IL-2, стовпчик 2: 1,5мкг/мл AnTH1, стовпчик 3: культуральне середовище.

Фіг.7. Пригнічення рекомбінантним химерним білком AnTH1 рістстимульовальної активності людського IL-2 на лінії мишачих клітин CTLL-2 (результати виражені у міжнародних одиницях (МОД) IL-2).

Фіг.8. Результати пригнічення антипроліферативної активності людського $\text{IFN}\gamma$ рекомбінантним химерним білком AnTH1. Стовпчик 1: 4МОД/мл $\text{IFN}\gamma$ (4нг/мл), стовпчик 2: 4 МОД/мл $\text{IFN}\gamma$ +50мкг/мл AnTH1, стовпчик 3: 50мкг/мл AnTH1.

Фіг.9. Пригнічення $\text{IFN}\gamma$ -індукованої системи HLA II рекомбінантним химерним білком AnTH1. Стовпчик 1: Вихідний рівень ($\text{IFN}\gamma$ =0МОД/мл), стовпчик 2: $\text{IFN}\gamma$ 500МОД/мл (0,5мкг/мл), стовпчик 3: $\text{IFN}\gamma$ 500МОД/мл+1,5мкг/мл AnTH1.

Фіг.10. Амінокислотна послідовність рекомбінантного химерного білка AnTH1. Позначені пептиди, визначені засобами мас-спектрометрії.

Приклади

Приклад 1

Виділення комплементарних ниток ДНК, що кодують перші 60 амінокислот людського IL-2 та позаклітинну ділянку α -субодиниці розчинного рецептора людського $\text{IFN}\gamma$ ($\text{R}\alpha\text{IFN}\gamma$ s)

Для виділення людської ДНК, комплементарної кодувальному ланцюгу ДНК або мРНК, Raja- (клітини лінії африканської лімфоми Бюркітта, ATCC (Американська колекція типових культур):CCL-86) і Jurkat- (людський гострий Т-клітинний лейкоз, ATCC:TIB-152) клітини культивували у живильному середовищі RPMI 1640, доповненому 10% фетальної сироватки великої рогатої худоби у 5л колбі з обережним збовтуванням при температурі 37°C у 5% атмосфері CO_2 . Екстрагування загальної РНК з Jurkat- і Raja-клітин здійснювали за методом Чомшіски [Chomczynski P. et al. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-9, 1987]. Після цього полі(А)-сайт РНК екстрагували за допомогою комерційної системи виділення мРНК (фірма Isolation System Life Technologies Messagemaker, номер за каталогом 10551-018). ДНК, комплементарну кодувальному ланцюгу ДНК або мРНК, що кодує перші 60 амінокислот людського IL-2 і 288 амінокислот позаклітинної амінокінцевої ділянки людського $\text{R}\alpha\text{IFN}\gamma$ s виділяли шляхом зворотної транскрипції і полі(А)-сайт РНК Jurkat- і Raja-клітин, відповідно, ампліфікували засобами полімеразно-ланцюгової реакції. Приблизно 1-2мкг полі(А)-сайту РНК піддавали процесингу із застосуванням довільних гексамерів.

Послідовності олігонуклеотидів (праймерів), що застосовувались для ампліфікації

комплементарної нитки ДНК для перших 60 амінокислот людського IL-2, представлені у Послідовності №1 (праймер 1) і Послідовності №2 (зворотний праймер 1). Послідовності праймерів, що застосовувались для ампліфікації комплементарної нитки ДНК для 228 амінокислот амінокінцевої ділянки людського $\text{R}\alpha\text{IFN}\gamma$ s, представлені у Послідовності №3 (праймер 2) і Послідовності №4 (зворотний праймер 2).

Ампліфіковану ДНК, що кодує перші 60 амінокислот людського IL-2 і сполучного пептиду (Послідовність №5), розщеплювали рестриктазою Nco I (підкреслена у послідовності праймеру 1, Послідовність №1). Після цього здійснювали екстрагування фенолом-хлороформом із метою видалення ферменту і буфера. Екстракт осаджували, ресуспендували у відповідному буфері і зберігали при температурі -70°C. Дивись послідовність сполучного пептиду (Послідовність №6).

Ампліфіковану ДНК, що кодує сполучний пептид і 231 амінокислоту $\text{R}\alpha\text{IFN}\gamma$ (Послідовність №7) додавали до "липкого" кінця за допомогою полімерази Кльонова і очищали, як описувалось вище. Після цього її розщеплювали рестриктазою BstH I (підкреслена у послідовності зворотного праймера 2) і очищали, як описувалось вище. Дивись послідовність сполучного пептиду (Послідовність №6).

Ампліфіковані смуги (Послідовність №5 і Послідовність №7) змішували у розрахованих пропорціях і у відповідному буфері для забезпечення ампліфікації нової смуги, що містить послідовність ДНК, яка відповідає першим 60 амінокислотам людського IL-2, зв'язаної з відповідною послідовністю 231 амінокислоти позаклітинної ділянки людського $\text{R}\alpha\text{IFN}\gamma$ і послідовністю, що відповідає сполучному пептиду (Послідовність №6). Нову смугу ампліфікували засобами полімеразно-ланцюгової реакції.

Ампліфіковану ДНК (Послідовність №8) очищали, як описувалось вище. Очищену ДНК розщеплювали рестриктазою BstH I і обробляли з метою видалення ферменту і буфера, як описувалось. Після цього ДНК знову розщеплювали рестриктазою Nco I і очищали, як описувалось.

Приклад 2

Генно-інженерна конструкція для експресії рекомбінантного химерного білка AnTH1

Вектор експресії містить сильний триптофановий промотор. Згаданий вектор розщеплювали рестриктазою BstH I. Після цього здійснювали екстрагування фенолом-хлороформом із метою видалення ферменту і буфера. Екстракт осаджували і ресуспендували у відповідному буфері. Після цього його розщеплювали рестриктазою Nco I. Вектор, нарешті, відокремлювали на гелі, як описувалось вище. Таким чином, вектор містить триптофановий промотор, вільний "липкий" сайт Nco I, вільний "липкий" сайт BstH I, термінатор T4 і ген стійкості до ампіциліну.

ДНК, що відповідає Послідовності №8, лігували до вектора за допомогою лігази фага T4. Клітини E.coli трансформували за допомогою

згаданої генно-інженерної конструкції. Ідентифікували трансформанти, що містять комплементарний фрагмент ДНК для перших амінокислот людського IL-2, а також сполучного пептиду і 231 амінокислоти людського α IFN γ s у тому самому напрямку, що і триптофановий промотор, шляхом здійснення рестрикційного аналізу за допомогою рестриктаз Nco I і Eco RI. Одержану плазмиду назвали pHu(AnTH1) (дивись Фіг.1).

Приклад 3

Секвенування

Кінцеву генно-інженерну конструкцію піддавали секвенуванню. Секвенування здійснювали за протоколом, основу якого становить методика Сангера [Sanger F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-67, 1977]. Було доведено, що згадана генно-інженерна конструкція має під контролем частину генів, що кодують IL-2 (60 амінокислот, розпочинаючи з амінокінцевої групи), і, далі, послідовність нуклеотидів, що кодує сполучний пептид (Послідовність №6), зв'язану з ділянкою, що кодує 228 амінокислот амінокінця α IFN γ s. Дивись Послідовність №8.

Приклад 4

Експресія E.coli рекомбінантного химерного білка AnTH1

Штамом-хазяїном був штам Escherichia coli W3110 P3 (прототроф F—) і плазмиди pHu(AnTH1). Для експресії, плазмиду вводили до 5мл живильного середовища LB (середовище Лурія) з ампіциліном (50мкг/мл) і L-триптофаном (100мкг/мл) і інкубували при температурі 37°C впродовж 6год зі збовтуванням. Цю культуру додавали до 50мл середовища LB і встановлювали на струшувач (100об/хв) на 6год при температурі 37°C. Цю культуру додавали до 500мл живильного середовища M9 (33мМ розчин Na_2HPO_4 , 2мМ розчин KH_2PO_4 , 8,5мМ розчин NaCl , 18мМ розчин NH_4Cl , 0,1мМ розчин CaCl_2 , 1мМ розчин MgSO_4), збагаченого 0,2% гідролізованого казеїну, 0,4% глюкози, 50мкл/мл ампіциліну, таким чином, що початкова оптична густина культури (620нм) дорівнювала 0,3. Після цього впродовж 8год здійснювали інкубування за умов, які були описані вище і, нарешті, клітинний осад збирали шляхом центрифугування (дивись Фіг.2).

Приклад 5

Екстрагування, очищення і ренатурація рекомбінантного химерного білка AnTH1

Клітини гомогенізують за допомогою політрон у концентрацією 0,1г вологої біомаси на мл буфера TE (10мМ розчин Трис-HCl, 1мМ розчин EDTA (етилендіамінтрифтороцтова кислота, pH 7,2). Цю суспензію піддають ферментативному гідролізу за допомогою лізоциму. Осад, який одержали на попередній стадії, промивають розчинами сечовини різної молярності (від 1М до 8М) у 50мМ розчині Трис-буфера (pH 7,2), 1мМ розчині EDTA. Гомогенізацію здійснюють за допомогою політрон. Спочатку гомогенізацію здійснюють впродовж 1хв, потім процес гомогенізації припиняють на 3хв, після чого гомогенізацію відновлюють ще на 1хв. Увесь процес відбувається при температурі 4°C. Білки

солюбілізують розчином сечовини (приблизно 150мл, 3мл/хв) на колонці K9/60 (Pharmacia, Sweden), заповненій смолою Sephadex G-100, яка була попередньо врівноважена 3 об'ємами 50мМ розчину Трис-HCl (pH 9) і 4М розчину сечовини. Елюювання здійснювали у тому самому буфері. Фракції, що містили білки, об'єднували і діалізували проти 0,1М розчину Трис-HCl (pH 9). У подальшому діаліз продовжували проти забуференого фосфатом фізіологічного розчину (PBS) (pH 7,4). (Дивись Фіг.3 і Фіг.4).

Приклад 6

Зв'язування гамма-інтерферону з рекомбінантним химерним білком AnTH1

Один мікролітр (приблизно 1мкг загального білка) рекомбінантного химерного білка AnTH1 після впорядкування наносили на нітроцелюлозні смужки. Смужки інкубували з 10% знежиреного молока впродовж 2год при кімнатній температурі. Мембрани двічі промивали фізіологічним розчином, забуференим трис-буфером (TBS) впродовж 5хв. Після промивання смужки інкубували з гамма-інтерфероном, міченим радіоактивним йодом (^{125}I -IFN γ , 35мкКи/мкг впродовж 1год при кімнатній температурі) у присутності або за відсутності надлишку гамма-інтерферону, який не був міченим. Після цього нітроцелюлозні смужки двічі промивали TBS впродовж 5хв, потім TBS+0,03% твін 20 впродовж 5хв. І, нарешті, смужки експонували на рентгенівську плівку, зберігали при температурі -70°C впродовж 72год, після чого проявляли. (Дивись Фіг.5).

Приклад 7

Рістстимульовальна активність Т-клітин рекомбінантного химерного білка AnTH1

Біологічну активність рекомбінантного химерного білка AnTH1 перевіряли на лінії IL-2-залежних мишачих Т-лімфоцитів. Згадані клітини культивували на живильному середовищі RPMI-1640, що містило 1мМ розчин пірувату, 2мМ розчин L-глутаміну, 40мМ розчин ГЕПЕС-буфера, 100Од/мл пеніциліну, 50мкг/мл стрептоміцину, 50мкМ розчин 2-меркаптоетанолу і 10% фетальної сироватки великої рогатої худоби, доповненої 8МОд/мл людського рекомбінантного інтерлейкіну-2 з питомою активністю $1,2 \times 10^7$ МОд/мг. Клітини перед застосуванням тричі промивали, ресуспендували у повному культуральному середовищі без IL-2 і інкубували впродовж 1год при температурі 37°C у вологій атмосфері CO_2 . Після цього клітини промивали, ресуспендували з густиною 4×10^5 клітин/мл і розподіляли на 96-лункові планшети (100мкл/лунку), що містили по 100мкл серійних розведень (1:2) rhIL-2 або зразків (рекомбінантного химерного білка AnTH1) у повному живильному середовищі. У цьому випробуванні застосовували міжнародний стандарт IL-2010397. Після 36год інкубування при температурі 37°C до кожної лунки додавали 20мкл (5мг/мл) MTT ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{SBr}$), і планшети інкубували впродовж 4год за тих самих умов. На завершення, додавали суміш 10% SDS (додецилсульфат натрію), 0,1N розчину HCl, 50% ізопропанолу (50мкл/лунку), планшети струшували впродовж 1год при температурі 37°C, і оптичну густина

визначали при 570nm за допомогою планшет-рідера. (Дивись Фіг.6).

Приклад 8

Пригнічення активності IL-2 щодо стимулювання росту Т-клітин рекомбінантним химерним білком AnTH1

Біологічну активність IL-2 перевіряли на лінії IL-2-залежних мишачих Т-лімфоцитів. Згадані клітини культивували чином, подібним до попереднього експерименту. Клітини перед застосуванням тричі промивали, ресуспендували у повному культуральному середовищі без IL-2 і інкубували впродовж 1год при температурі 37°C у вологій атмосфері CO₂. Після цього клітини промивали, ресуспендували з густиною 4x10⁵клітин/мл і розподіляли на 96-лункові планшети (100мкл/лунку), що містили по 100мкл серійних розведень (1:2) rhIL-2 або зразків (rhIL-2+рекомбінантний химерний білок AnTH1 або лише рекомбінантний химерний білок AnTH1) у повному живильному середовищі. У цьому випробуванні застосовували міжнародний стандарт IL-2010397. Після 36год інкубування при температурі 37°C до кожної лунки додавали 20мкл (5мг/мл) MTT (C₁₈H₁₆N₅SBBr) і планшети інкубували впродовж 4год за тих самих умов. На завершення, додавали суміш 10% SDS (додецилсульфат натрію), 0,1N розчину HCl, 50% ізопропанолу (50мкл/лунку), після чого планшети струшували впродовж 1год при температурі 37°C, і оптичну густину визначали при 570nm за допомогою планшет-рідера. Результати були виражені у одиницях rhIL-2, виходячи з аналізу даних стандартної кривої розведення rhIL-2 і серійних розведень зразка. (Дивись Фіг.7).

Приклад 9

Пригнічення антипроліферативної активності IFN γ рекомбінантним химерним білком AnTH1

Клітини лінії Нер-2 культивували (96-лункові планшети, 2,5x10³клітин/лунку) у живильному середовищі MEM CANE (мінімальне живильне середовище із замінними амінокислотами), доповненому 10% фетальної сироватки великої рогатої худоби. Культури інкубували впродовж 24год при температурі 37°C у термостаті з 5% CO₂. Після завершення інкубування живильне середовище замінювали з додаванням зразків, призначених для оцінки, і відповідних контролів. Через 72год інкубування клітини забарвлювали 0,5% розчином кристалічного фіолетового впродовж 2хв, і планшети зчитували за допомогою планшет-рідера. (Дивись Фіг.8).

Приклад 10

Пригнічення індукування HLAII IFN γ рекомбінантним химерним білком AnTH1

Це випробування на клітинах здійснюють із застосуванням ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз) за методикою, опис якої наведено у роботі [Seeling G. et al Development of receptor peptide antagonist to human γ -interferon and characterization of its ligand-bound conformation using transferred nuclear overhauser effect spectroscopy. J. Biol. Chem. 270, 9241-9253, 1995]. Була застосована лінія клітин Colo 205. Клітини культивували на 96-лункових планшетах (2,5x10⁵клітин/лунку) у 0,1мл середовища RPMI

1640, збагаченого 10% фетальної сироватки великої рогатої худоби. Клітини інкубували впродовж 12год при температурі 37°C у термостаті у 5% атмосфері CO₂. Після цього клітини, культивовані у культуральному середовищі, додавали до рекомбінантного химерного білка і IFN γ у об'ємі 0,1мл, після чого інкубували впродовж 1год при температурі 37°C. Після інкубування живильне середовище видаляли, і лунки тричі промивали культуральним середовищем. Після цього до лунок додавали 1,2мл аліквоти середовища, і планшети інкубували впродовж 48год при температурі 37°C для індукування антигенів HLA-DR. Лунки промивали забуференим фосфатом фізіологічним розчином, і клітини фіксували чистим етанолом впродовж 2хв. Промивання повторювали, і планшети інкубували впродовж 1 год при кімнатній температурі з мишачим моноклональним антитілом анти-HLA-DR, розбавленим забуференим фосфатом фізіологічним розчином з 0,5% сироваткового альбуміну великої рогатої худоби. Лунки промивали забуференим фосфатом фізіологічним розчином і інкубували за тих самих умов із мишачим антитілом анти-IgG, кон'югованим із пероксидазою. Промивання повторювали тричі і проявляли шляхом додання 100мкл/лунку 0,15% H₂O₂+5мг/мл о-фенілєндіаміну. Реакцію виявляли за допомогою 50мкл/лунку 2M розчину H₂SO₄ і оптичну густину визначали при 492nm за допомогою планшет-рідера. (Фіг.9).

Приклад 11

Мас-спектрометричний аналіз

Аліквоту (0,5мкг) очищеного білка аналізували засобами електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію і піддавали оборотному забарвленню із застосуванням Zn-імідазолу [Castellanos-Serra L. et al. Detection of biomolecules in electrophoresis gels with salts of imidazole and zinc II: a decade of research. Electrophoresis. 2001, 22, 864-7]. Смугу вирізали і інкубували з розчином (1%) лимонної кислоти впродовж 5хв до повного знебарвлення, після чого додатково інкубували впродовж 10хв у воді для видалення надлишку хелатоутворювача. Прозору смугу додатково нарізали на маленькі приблизно 1мм³ кубики, і дегідрували у 90% водному розчині ацетонітрилу з трифтороцтовою кислотою і повністю висушували у вакуумній сушарці. Шматочки гелю повторно гідратували у 20-30мкл 50мМ розчину NH₄HCO₃, що містив 12,5нг модифікованого трипсину (чистий для секвенування) від фірми Promega (штат Массачусетс, США). Гідроліз у гелі здійснювали шляхом інкубування впродовж ночі при температурі 37°C у термоміксері (фірма Eppendorf, США). Додатково додавали 20мкл 50мМ розчину NH₄HCO₃ і додатково інкубували впродовж 45хв. Триптичні пептиди екстрагували за допомогою ZipTips C18 від фірми Millipore (США), які попередньо були активовані і врівноважені за рекомендаціями виробника. Для екстрагування триптичних пептидів здійснили двадцять циклів завантаження. Гідролізат підкислювали мурашиною кислотою, інкубували впродовж 45хв при кімнатній температурі, після чого здійснювали

ще двадцять циклів завантаження. ZipTips екстенсивно промивали 5% розчином мурашиної кислоти; протеолітичні пептиди елюювали 2мкл 60% розчину ацетонітрилу, що містив 1% мурашиної кислоти.

Низькоенергетичні мас-спектри визначали за допомогою гібридного квадрупольного ортогонального прискорювального тандемного мас-спектрометра QTOF від фірми Micromass (Манчестер, Великобританія), спорядженого джерелом електророзпилюваного нанопотоку іонів із застосуванням ефекту Зеємана. Мас-спектрометр функціонував при температурі джерела 80°C і з потоком сушильного газу 50л/год. Пептиди розчиняли для одержання приблизної концентрації 5пмоль/мкл. Вносили 2мкл триптичних пептидів до боросилікатного нанопотокового наконечника. До згаданого наконечника і до вхідного конуса прикладали напругу у 900В і 35В відповідно. Мас-спектри визначали за методом, опис якого наведено у роботі [Gonzalez L. et al. Differentiating alpha-and beta-aspartic acids by electrospray ionization and low-energy tandem mass spectrometry. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 2000, 14, 2092-210]. Перший квадруполь застосовували для відбирання іона-попередника у межах 4-5Th. Для одержання фрагментарних іонів у шестигранній камері зіткнення застосовували газ зіткнення (аргон) під тиском -3×10^{-2} Па. Для зменшення вихідної напруженості іона-попередника більше ніж наполовину, застосовували відповідну енергію зіткнення. Збирання і обробку даних здійснювали за допомогою системи MassLynx (версія 3.5) від фірми Micromass.

Мас-спектрометричний аналіз з електрон-стимульованою іонізацією триптичних пептидів, одержаних з білка AnTH1

зі здійсненням впливу на імунорегуляторні та запальні механізми. Конструювання химерного білка полягає у злитті ліганду (IL-2₆₀) через пептид з 4 амінокислот із позаклітинною ділянкою рецептора (RαIFN_γ). Подібна комбінація надає можливість сполучення рекомбінантного химерного білка з клітинами, що мають на своїй поверхні RαIL-2. Ця субодинаця є присутньою, головним чином, у неактивованих Т-клітин та у високоафінного рецептора IL-2 (RαβIL-2) активованих Т-клітин [Smith K.A. The interleukin-2 receptor. Annu. Rev. Cell. Biol. 5, 397-403, 1989, Strom T.B. et al. Interleukin-2 receptor-directed therapies: antibody- or cytokine-based targeting molecules. Annu. Rev. Med. 44, 343-350, 1993].

У разі, коли білок AnTH1 зв'язується з RαIL-2 клітин у стані спокою, він може бути інтерналізованим, у той час як RαIFN_γs залишається у цитоплазмі -за умови виведення назовні, і впливає на IFN_γ, який буде продукуватись при активації клітин. Була описана взаємодія IFN_γ цитоплазми із позаклітинною ділянкою мембранного рецептора, наслідком чого може бути біологічна активність IFN_γ [Szente B.E. et al. Identification of IFN (receptor binding sites for JAK2 and enhancement of binding by IFN_γ and its C-terminal peptide IFN_γ (95-133). J. Immunol. 155, 5617-5622, 1995]. Під час хвороби, коли може виникнути необхідність послаблення дії IL-2, що продукується тілом, при доданні білка AnTH1, цей білок буде зв'язуватись через частину IL-2₆₀ з альфа-субодинацею високоафінного комплексу (RαβIL-2) активованих клітин, він буде перешкоджати зв'язуванню нативного IL-2, що секретується клітинами імунної системи і буде перешкоджати його біологічній активності. З іншого боку, IFN_γ, який вже був секретований активованими Т-клітинами, може зв'язуватись

№	Послідовності пептидів ^{a)}	Експериментальне відношення m/z	Теоретичне відношення m/z	Частини RαIFN _γ s химерного білка, що запобігає його зв'язуванню з мембранним рецептором.	Абсолютна помилка ^{c)}
1	¹¹ T-K ^{33 d)}	908,81	908,83	1	0,02
2	⁴⁰ M-K ⁴⁴	639,34	639,34	1	0,01
3	⁴⁵ F-K ⁵⁰	685,33	685,33	1	0,01
4	⁵⁶ H-R ^{66 f)}	442,87	442,88	3	0,01
5	⁶⁷ A-K ¹¹⁴	1781,52	1781,54	3	0,02
6	¹⁰¹ Q-K ^{114 d), e)}	807,93	807,95	2	0,02
7	¹²⁰ N-R ^{151 f)}	921,14	921,17	4	0,03
8	¹⁶⁶ S-R ¹⁷³	506,23	506,23	2	0,00
9	¹⁷⁷ I-K ¹⁸¹	511,31	511,28	2	0,03
10	¹⁹⁰ Q-R ^{220 f)}	1225,20	1225,23	3	0,03
11	²²¹ V-R ^{227 d)}	456,74	456,75	2	0,01
12	²²⁸ M-K ^{236 d)}	535,24	535,25	2	0,01

a) Нумерація послідовностей пептидів відповідає послідовності білка AnTH1, зображений на Фіг.10.

b) Зарядовий стан окремих пептидів.

c) Вказує різницю абсолютної маси між теоретичною і експериментальною молекулярними масами виявлених пептидів.

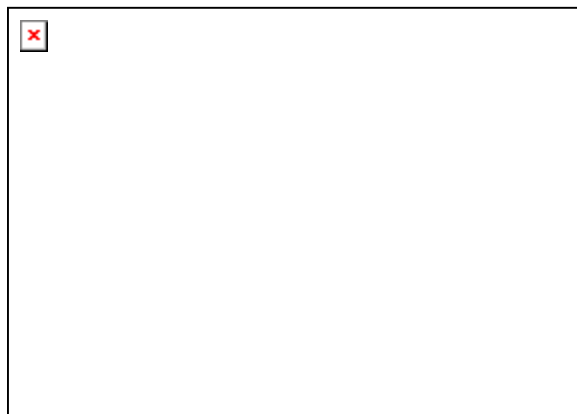
d) Пептиди, секвензовані засобами мас-спектрометричного аналізу з електрон-стимульованою іонізацією.

e) Пептид, одержаний шляхом неспецифічного розщеплення трипсину.

f) Пептид, що містить вільний цистеїн.

Переваги запропонованого рішення

Цей винахід об'єднує у одній молекулі здатність до втручання до двох сигнальних систем



<210> 2
<211> 32
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(32)
<223> Зворотний праймер 1 для ампліфікації ланцюга ДНК, комплементарного кодувальному ланцюгу ДНК або мРНК, для перших 60 амінокислот людського IL-2
<400> 2
catcatatgg gtctagacac tgaagatgt tc 32

<210> 3
<211> 29
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(29)
<223> Праймер 2 для ампліфікації ланцюга ДНК, комплементарного кодувальному ланцюгу ДНК або мРНК, для 231 амінокислоти амінокінцевої ділянки людського RαIFNγs
<400> 3
cccatatgat gacagggct gagatgggc 29

<210> 4
<211> 31
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(31)
<223> Зворотний праймер 2 для ампліфікації ланцюга ДНК, комплементарного кодувальному ланцюгу ДНК або мРНК, для 231 амінокислоти амінокінцевої ділянки людського RαIFNγs

<400> 4
gagatccttat ttatatactgc tattgaaat g 31
<210> 5
<211> 193
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>

<221> κДНК (генний фрагмент)
<222> (1)..(193)
<223> Послідовність, що відповідає ампліфікованій ДНК, яка кодує перші 60 амінокислот людського IL-2 і сполучний пептид

<400> 5
atggcaccta ctccaagttc tacaagaaga acacagctac aactggagca ttactctgtg 60
gatttacaga tgattttgaa tgaataata aattacaaga atcccaaat caccagatg 120
ctcacattta agttttacat gcccaagaag gccacagaac tgaacatct tcagtgtcta 180
gaccatgatg atg 193

<210> 6
<211> 11
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(11)
<223> Послідовність ДНК, що відповідає сполучному пептиду

<400> 6
cccatatgat g 11

<210> 7
<211> 703
<212> ДНК

<213> Homo sapiens

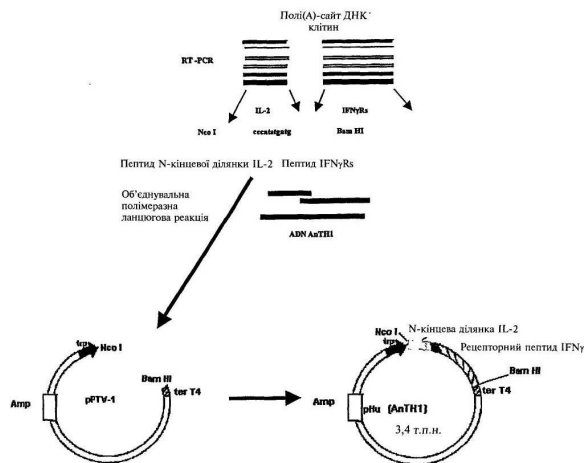
<220>
<221> κДНК (генний фрагмент)
<222> (1)..(703)
<223> Послідовність, що відповідає ампліфікованій ДНК, яка кодує сполучний пептид і 231 амінокислоту ділянки RαIFNγs

<400> 7
cccatatgat gacagggct gagatggcca ccgcgatct gggcgctgc tcagtgccta 60
caccacataa tgttacaati gaattctata acatgaacc tatcgtatat tggagtagcc 120
agatcatgcc acaggtccct gttttaccg tagagtaaa gaactatggt gtaagaatt 180
cagaatggat tgaagcctgc atcaatattt ctatcatta ttgtaattt tctgatcatg 240
ttgtgatcc atcaattct ctftgggtca gaggtaaac cagggttga caaaaaaat 300
ctgcctatgc aaagtcagaa gaatttctg tatgccgaga tggaaaaatt ggaccacct 360
aactggatat cagaaggag gagaagcaat catgattgac atatttcacc cttcagttt 420
tgtaaatgga gacgagcagg aagtcgatta tgaatccgaa actaccgtt acattagggt 480
gtacaatgtg tatgtgagaa tgaacggaag tgaatccag tataaatac tcacgcagaa 540
ggaagatgat tgaagcagaa ttcagtgcca gttagcgatt ccagatcct cactgaattc 600
tcagtactgt gtttcagag aaggatctt acatgtgtgg ggtgtacaa ctgaaaagtc 660
aaaaagaatt tttattacca tttcaatag cagtataaa taa 703
<210> 8
<211> 885
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

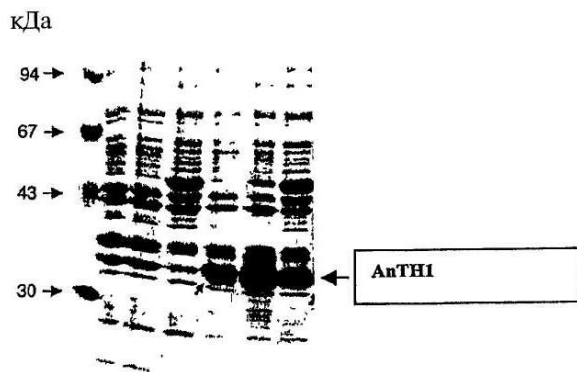
<220>
<221> κДНК (генний фрагмент)
<222> (1)..(885)
<223> Послідовність перших 60 амінокислот амінокінця людського IL-2, потім послідовність нуклеотидів, що кодують сполучний пептид, потім ділянка, що кодує 231 амінокислоту амінокінця RαIFNγs

<400> 8
atggcaccta ctccaagttc tacaagaaga acacagctac aactggagca ttactctgtg 60
gatttacaga tgattttgaa tgaataata aattacaaga atcccaaat caccagatg 120
ctcacattta agttttacat gcccaagaag gccacagaac tgaacatct tcagtgtcta 180
gaccatgatg atgacaggg ctgagatgg caccggatg ctggcgctgc cctcagtgcc 240
tacaccaact aatgttaca ttgaatcca taacatgaac cctatgatg attggagta 300
ccagatcatg ccacaggtcc ctgttttac cgtagaggta aagaactatg gtttgaaga 360
ttcagaatgg attgatgctt gcatcaatat ttctcatcat tatgttaata ttctgatca 420
tgttggatg ccatcaaat ctcttgggt cagagttaaa gccagggttg gacaaaaaga 480
atctgcctat gcaaaagtcag aagaatttgc tgaatgccga gatggaaaaa ttggaccacc 540
taaacctgat atcagaagaagg aggaagaaga atcatgattg acatatttca cectcagtt 600
tttgaatg gagacgagca ggaagtcgat tatgatccc aaactaccgtg ttacattagg 660
gtgtacaatg tgaatgtgag aatgaacgga agtgagatcc agtataaat actcacgcag 720
aaggaagatg atttgacga gattcagtc cagttagcga ttccatgat ctcactgaat 780
tctcagatg gttttcagc agaaggatc ttacatgtgt ggggtgttac aactgaaaag 840
tcaaaagaag ttgtattac cattttcaat agcagataaa aataa 885

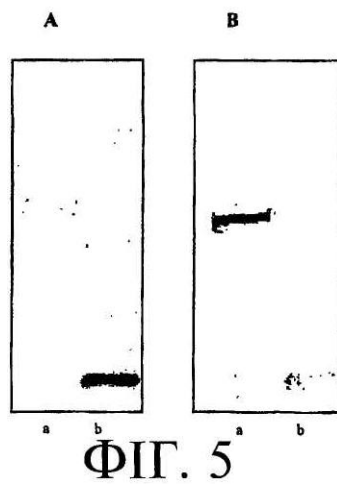
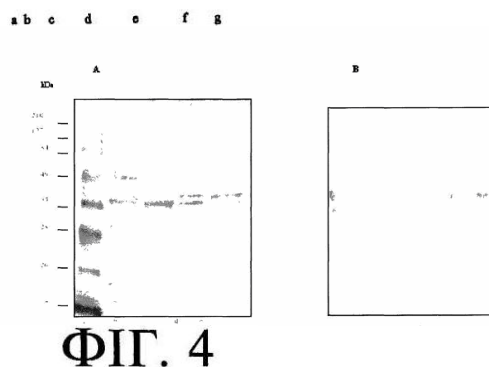
ФІГ. 1



27
ФІГ. 2



ФІГ. 3

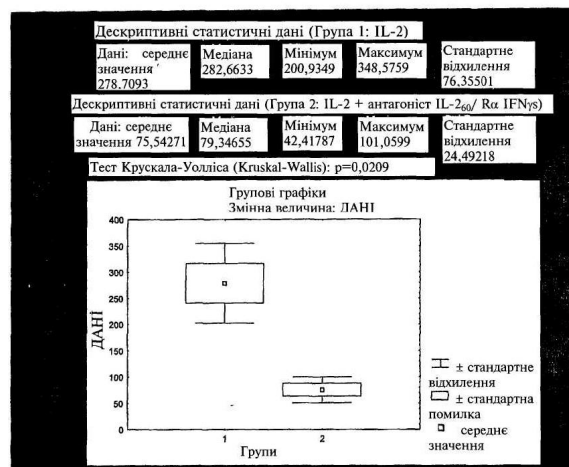


81908

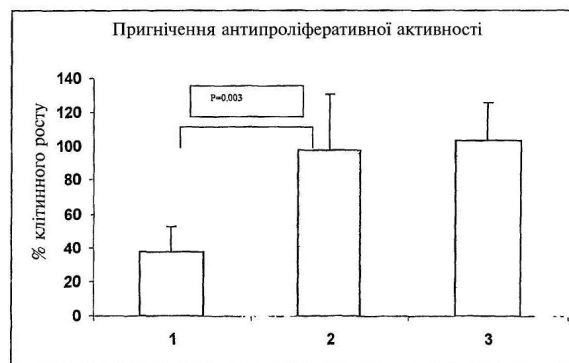
28
ФІГ. 6



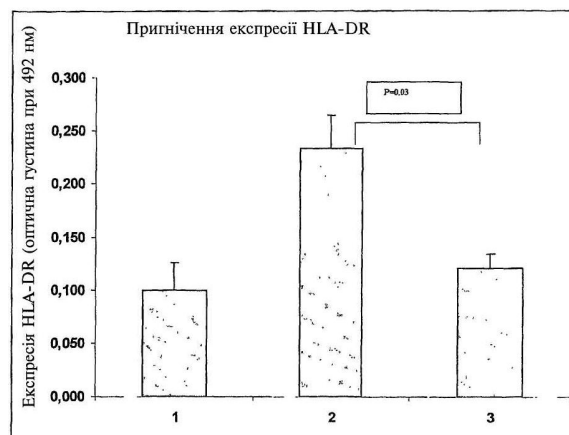
ФІГ. 7



ФІГ. 8



ФІГ. 9



ΦΙΓ. 10

SAPTSSTKKT₁QLQLEHLLLDLQMILNGINNYK₂NPKLTRM₃LTFK₄F₅YMP
 KK₆ATE LKH₇LQCLAHMMSR₈A₉EMGTADLGPSSVPTPTN VTIESYNMNP
 VYWEYQ₁₀IMPQVPVFTVEVK₁₁NYGVKN₁₂SEWIDACINISHHYCNISDHVGD
 PSNSWVR₁₃VKARVGQKESAYAKS₁₄EEFAVCR₁₅DGKI₁₆GPPK₁₇LDIRKEEKQ₁₈I
 MIDIFHPSVFNNG DEQEVYDFETTCYIR₁₉V₂₀YNVYVR₂₁M₂₂NGSEIQYK₂₃LL
 TQKEDDCDEIQCQLAIPVSSLNSQYCVSAEGVLHVWGVTTTEKSKEVCITIFNSSI
 KG