

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

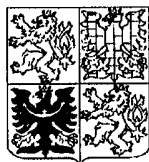
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3712-96

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16. 06. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **17.06.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/9412230**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 05. 98**
(Věstník č. 5/98)

(86) PCT číslo: **PCT/GB95/01411**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/35375**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/13
C 12 N 15/85
C 12 N 15/10
C 07 K 16/24
A 61 K 39/395
G 01 N 33/577

(71) Přihlašovatel:

CELLTECH THERAPEUTICS LIMITED,
Slough, GB;

(72) Původce:

Emtage John Spencer, Slough, GB;
Bodmer Mark William, Slough, GB;
Athwal Diljeet Singh, Slough, GB;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Interleukin-5 specifické rekombinantní
protilátky**

(57) Anotace:

Účinná anti-IL-5 rekombinantní protilátková
molekula, obsahující těžký a/nebo lehký řetě-
zec antigen-vázajících zbytků z donor protilát-
ky.

```
GAA TGT GGA GGA GGC TTG GTA CAG CCA TCA CAG ACC CTG TGT CTC  
E S G G G L V Q P S Q T L S L  
ACC TGC ACT GTC TGT GGG TTA TCA TTA ACC AGC AAT AGT GTG AAC  
T C T V S G L S L T S H S V N  
TGG ATT GGG CAG GGT CCA GGA AAG GGT GTG GAG TGG ATG GGA GTA  
W I R Q P P G K G L E W K G L  
ATA TGG AGT AAT GCA GAC ACA GAT TAT AAT TCA GGT ATC AAA TGG  
I W S H G D T D Y N S A I K S  
GCA CTG AGC ATC AGT AAG GAC ACC TCG AAG AGC CAG GTT TGC TTA  
R L S Y S R D T S K S Q V F L  
AAG ATG AAC AGT CTG CAA AGT GAA GAC ACA GGC ATG TAC TTC TGT  
K K N S L Q S E D T A H Y F C  
GCC AGA GAG TAC TAC GGC TAC TTT GAT TAC TCG GGC GAA GCA CTC  
A R E Y Y G Y F D Y W G Q G V  
ATG CTC ACA CTC TCC TCA  
N V T V S S
```

CZ 3712-96 A3

buněk sleziny hlodavců s buňkami myelomu hlodavců. Tyto Mab jsou tak v podstatě hlodavčí proteiny. Použití těchto Mab jako terapeutických činidel u lidí může zvýšit nežádoucí imunitní odpověď nazvanou HAMA (z anglického Human Anti-mouse Antibody). Použití hlodavčích Mab jako terapeutických činidel u lidí je inherentně omezeno skutečností, že lidský subjekt bude poskytovat imunologickou odezvu k Mab, která buď odstraní úplně nebo alespoň redukuje její účinnost.

Bylo vyvinuto mnoho technik pro snížení antigenických charakteristik takových lidských Mab. Tyto techniky obecně zahrnují použití rekombinantní DNA technologie k sestavení DNA sekvencí, kodujících polypeptidové řetězce protilátkové molekuly. Tyto metody jsou obecně nazývány jako "humanizační" techniky.

Nejnovější metody pro humanizaci Mab zahrnují produkci chimerních protilátek, ve kterých antigen vázající místa, obsahující kompletní variabilní domény jedné protilátky, jsou fuzována ke konstantním doménám získaným z jiné protilátky. Metody pro provedení takových chimerizačních postupů jsou popsány v EP 0120694 (Celltech Limited) a EP 0125023 (Genentech Inc. a City of Hope). Humanizované chimerní protilátky však ještě obsahují významný podíl ne-humánních aminokyselinových sekvencí a mohou ještě stále vyvolávat určitou HAMA odezvu, zejména jsou-li podávány po delší dobu (Begent a spol., Br.J.Cancer, 62, 487 (1990)).

Alternativní řešení, popsané v EP-A-0239400 (Winter), zahrnuje naroubování komplementaritu determinujícího regionu (CDR) myši Mab na rámečky regionů variabilních domén lidského imunoglobulinu za použití rekombinantních DNA technik. Existují tři CDR (CDR1, CDR2 a CDR3) v každých variabilních

doménách těžkého a lehkého řetězce. Takové CDR-roubované humanizované protilátky pravděpodobně mnohem méně zvyšují HAMA odpověď než humanizované chimerní protilátky vzhledem ke mnohem nižšímu podílu ne-humánních aminokyselinových sekvencí, které obsahují. V Riechmann a spol. (Nature, 332, 323-324 (1988)) bylo nalezeno, že transfer CDR samotných, jak definuje Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (1987)) nebyl dostačující pro poskytnutí vyhovující antigen vázající aktivity v CDR-roubovaném produktu. Riechmann a spol. zjistili, že bylo nezbytné konvertovat mnoho zbytků mimo CDR, zejména ve smyčce připojené k CDR1. Avšak vazebná afinita nejlepších CDR-roubovaných získaných protilátek byla ještě významnější než původní MAb.

Ve WO 91/09967, Adair a spol., popisují CDR-roubovanou protilátku těžkého a lehkého řetězce a determinují hierarchii donorových zbytků.

Ve WO 93/16184 Chou a spol. popisují dezén, klonování a expresi humanizovaných monoklonálních protilátek proti lidskému interleukinu-5. Je navržen způsob selekce lidských protilátkových sekvencí, které mají být použity jako humánní rámečky pro humanizaci zvířecích protilátek, zahrnující stupně porovnání humánních variabilních doménových sekvencí s variabilními doménovými sekvencemi ze zvířecí MAb, která se humanizuje, na procentickou identitu, sekvenční dvojznačnosti a podobné PIN-regionové vzdálenosti. PIN-regionová vzdálenost je definována jako počet zbytků mezi cysteinovými zbytky, tvořícími intra doménové disulfidové můstky. Vybere se lidská protilátka, mající nejlepší kombinaci těchto rysů. Je také navržena metoda stanovení, které variabilní doménové zbytky zvířecí NAb by měly být vybrány pro humanizaci,

zahrnující stanovení potenciálního minima zbytků (zbytky, které obsahují CDR strukturní smyčky a zbytky vyžadované pro podporu a/nebo orientaci CDR strukturních smyček) a maximum zbytků (zbytky, které obsahují Kabatovy CDR, CDR strukturní smyčky, zbytky vyžadované pro podporu a/nebo orientaci CDR strukturních smyček a zbytky, které spadají do asi 10 Å CDR strukturní smyčky a vykazují povrch přístupný pro vodné rozpouštědlo asi 5 Å² nebo větší) zvířecí monoklonální protilátky. Dále se provádí počítačové modelování na všech možných rekombinantních protilátkách, zahrnujících lidskou protilátkovou rámečkovou sekvenci do které bylo inzertováno minimum a maximum zbytků. Minimum a maximum zbytků se vybere na základě kombinace, která produkuje rekombinantní protilátku, mající strukturu počítačového modelu nejbližší struktury zvířecí monoklonální protilátky. Humanizovaná získaná anti-IL-5 protilátka se jeví jako postrádající podstatné množství své afinity pro hIL-5 molekulu.

Cílem vynálezu je poskytnout humanizovanou protilátkovou molekulu, mající zlepšenou afinitu pro hIL-5 molekulu.

Podstata vynálezu

Podle předloženého vynálezu je poskytnuta RAM, mající afinitu pro lidský IL-5 a obsahující antigen vazebné regiony získané z těžkého a/nebo lehkého řetězce variabilních domén donor protilátky, mající afinitu pro lidský IL-5, RAM mající vazebnou afinitu podobnou afinitě donor protilátky.

RAM podle vynálezu může obsahovat antigen vazebné regiony z jakékoliv vhodné donor anti-IL-5 protilátky. Typicky je donor anti-IL-5 protilátka hlodavčí MAb. Výhodně je donor protilátka MAb 39D10.

Variabilní domény těžkých a lehkých řetězců MAb 39D10 jsou zde dále popsány u obrázků 1 a 2.

Podle preferovaného aspektu vynálezu je RAM podle předloženého vynálezu anti-IL-5 protilátková molekula, mající afinitu pro lidský IL-5 antigen, obsahující kompozitní těžký řetězec a komplementární lehký řetězec, kde uvedený kompozitní těžký řetězec má variabilní doménu, obsahující převážně zbytky rámečku těžkého řetězce protilátkového akceptoru a vazebné zbytky pro těžký řetězec antigenu donor protilátky, kde uvedená donor protilátka má afinitu pro lidský IL-5, přičemž uvedený kompozitní těžký řetězec obsahuje donor zbytky alespoň v polohách 31 až 35, 50 až 65 a 95 až 102 (podle Kabatova systému číslování) [Kabat a spol., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Vol.I, páté vydání, 1991, US Department of Health and Human Services, National Institute of Health].

Výhodně rámeček kompozitního těžkého řetězce dále obsahuje donor zbytky v polohách 23, 24, 27-30, 37, 49, 73 a 76-78 nebo 24, 27-30, 37, 49, 72, 76 a 78.

Podle druhého preferovaného aspektu předloženého vynálezu je poskytnuta anti-IL-5 protilátková molekula, mající afinitu pro lidský IL-5 antigen, obsahující kompozitní lehký řetězec a komplementární těžký řetězec, kde uvedený kompozitní lehký řetězec má variabilní doménu, obsahující převážně zbytky rámečku lehkého řetězce protilátkového akceptoru a vazebné zbytky pro lehký řetězec antigenu donor protilátky, kde uvedená donor protilátka má afinitu pro lidský IL-5, přičemž uvedený kompozitní lehký řetězec obsahuje donor zbytky alespoň v polohách 24 až 34, 50 až 56 a 69 až 97 (podle Kabatova systému číslování).

Výhodně rámeček kompozitního lehkého řetězce dále obsahuje donor zbytky v polohách 22, 68 a 71 nebo v polohách 68 a 71.

Podle třetího preferovaného aspektu předloženého vynálezu je poskytnuta anti-IL-5 protilátková molekula, mající afinitu pro lidský IL-5 antigen, obsahující kompozitní těžký řetězec podle prvního aspektu vynálezu a kompozitní lehký řetězec podle druhého aspektu vynálezu.

Výhodně každá RAM podle vynálezu má afinitní konstantu pro lidský IL-5 větší než 10^{-9} M.

Bude zřejmé, že vynález je v širokém rozsahu použitelný pro produkci anti-IL-5 RAM obecně. Donorová protilátka tak může být jakákoliv anti-IL-5 protilátka získaná z jakéhokoliv zvířete. Akceptorová protilátka může být získána ze zvířete stejných druhů a může to být i stejná třída nebo podtřída protilátky. Obvyklejí však jsou donorové a akceptorové protilátky získány ze zvířat odlišných druhů. Typicky donorová anti-IL-5 protilátka je ne-lidská protilátka, jako je hlodavčí MAb a akceptorovou protilátkou je lidská protilátka.

Jakákoliv vhodná rámečková sekvence může být použita pokud jde o třídu nebo typ donorové protilátky, ze které jsou antigen vázající regiony získány. Výhodně typ použitého akceptorového rámečku je stejné nebo podobné třídy nebo typu jako donorová protilátka. Výhodně má zvolený rámeček nejvyšší homologii k donorové protilátce. Výhodně se použijí rámečky lidské skupiny III gama zárodečné linie pro kompozit těžkého řetězce a rámečky lidské skupiny I kappa zárodečné linie se použijí pro kompozitní lehké řetězce.

Konstantní regionové domény RAM podle vynálezu mohou být zvoleny s ohledem na navržené funkce protilátky, zejména efektorové funkce, které mohou být vyžadovány. Například konstantní regionové domény mohou být lidské IdA, IgE, IgG nebo IgM domény. Zejména může být použity IgG lidské konstantní regionové domény, zejména isotypu IgG1 a IgG3, je-li humanizovaná protilátková molekula zamýšlena pro terapeutická použití a jsou vyžadovány protilátkové efektorové funkce. Alternativně mohou být použity IgG2 a IgG4 isotypy, je-li humanizovaná protilátková molekula zamýšlena pro terapeutické účely a nejsou vyžadovány protilátkové efektorové funkce, např. specifická vazba k a neutralizace biologické aktivity lidského IL-5. Mohou být také použity modifikované lidské konstantní regionové domény, ve kterých jeden nebo více aminokyselinových zbytků byl zaměněn nebo deletován pro změnu určité efektorové funkce. Výhodně jsou konstantní regionové domény RAM lidské IgG4.

Označení zbytků uvedené výše a jinde v předložené přihlášce jsou provedena podle číslování Kabata (Kabat a spol., Sequences of Proteins of Immunological Interest, díl.I, páté vydání, 1991, US Department of Health and Human Services, National Institute of Health). Označení zbytků tak vždy neodpovídají přímo lineárnímu číslování aminokyselinových zbytků. Aktuální lineární aminokyselinové sekvence mohou obsahovat méně nebo další aminokyseliny než v Kabatově číslování, odpovídající zkrácení, nebo inzerci do základní variabilní doménové struktury.

Také anti-IL-5 protilátkové molekuly podle předloženého vynálezu mohou být připojeny k efektorovým nebo reporterovým molekulám. Alternativně mohou být použity postupy technologie rekombinantní DNA pro produkci imunoglobulinových molekul, ve

kterých Fc fragment nebo CH3 doména kompletního imunoglobulinu byly nahrazeny, nebo byly k němu připojeny peptidovou vazbou, funkční ne-imunoglobulinový protein jako je enzym, cytokin, růstový faktor nebo toxinová molekula.

Proto zbytek protilátkových molekul nezbytně nemusí obsahovat pouze sekvence z imunoglobulinů. Například může být konstruován gen, ve kterém DNA sekvence, kodující část lidského imunoglobulinového řetězce je fuzována k DNA sekvenci, kodující aminokyselinovou sekvenci molekuly polypeptidového efektoru nebo reporteru.

Další aspekty vynálezu zahrnují DNA sekvence, kodující kompozitní těžký řetězec a kompozitní lehký řetězec. Klonovací a expresní vektory, obsahující DNA sekvence, hostitelské buňky transformované s DNA sekvencemi a způsoby produkce molekul protilátek, obsahujících DNA sekvence ve transformovaných hostitelských buňkách, jsou také dalšími aspekty vynálezu.

Obecné metody, kterými mohou být vektory konstruovány, transfekční metody a kultivační metody jsou dobře v oboru známé a tvoří část vynálezu.

DNA sekvence, které kodují anti-IL-5 donor aminokyselinové sekvence mohou být získány metodami dobře známými v oboru (viz například mezinárodní patentová přihláška č. WO 93/16184). Například anti-IL-5 kodující sekvence mohou být získány genomickým klonováním nebo cDNA klonováním ze vhodných hybridomových linií, např. buněčné linie 39D10. Pozitivní klony mohou být screenovány za použití vhodných sond pro požadované těžké a lehké řetězce. Také může být použito PCR klonování.

DNA, kodující akceptorové aminokyselinové sekvence, může být získána jakýmkoliv vhodným způsobem. Například DNA sekvence, kodující preferované lidské akceptorové rámečky jako je lidská skupina I lehkých řetězců a lidská skupina III těžkých řetězců, jsou v širokém rozsahu dostupné pracovníkům v oboru.

Pro přípravu požadovaných DNA sekvencí mohou být použity standardní techniky molekulární biologie. Sekvence mohou být syntetizovány kompletně nebo částečně za použití technik oligonukleotidové syntézy. Techniky místně řízené mutagenese a polymerasové řetězové reakce (PCR) mohou být použity jako vhodné. Například může být použita oligonukleotidová řízená syntéza jak popsal Jones a spol. (Nature 321, 522 (1986)). Také může být použita oligonukleotidová řízená mutagenese již existujícího variabilního regionu jak je například popsána Verhoeynem a spol. (Science, 239, 1534-1536 (1988)). Také může být použito enzymatické plnění prolomených ("gapped") oligonukleotidů za použití T4 DNA polymerasy, jak je například popsáno Queenem a spol. (Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 86, 10029-10033 (1989) a ve WO 90/07861).

Pro expresi DNA sekvencí, kodujících RAM mohou být použity jakékoliv vhodné hostitelské buněčné a vektorové systémy. Výhodně se používají eukaryotické, např. savčí, hostitelské buněčné expresní systémy. Zejména vhodné savčí buňky zahrnují CHO buňky a myelomové nebo hybridomové buněčné linie.

Podle dalšího aspektu předloženého vynálezu je poskytnut způsob produkce anti-IL-5 RAM, zahrnující:

(a) produkci prvního expresního vektoru prvního operonu,

majícího DNA sekvenci, která koduje kompozitní těžký řetězec, jak je definován podle prvního preferovaného aspektu vynálezu;

(b) popřípadě v prvním nebo druhém expresním vektoru produkci druhého operonu, majícího DNA sekvenci, která koduje komplementární lehký řetězec, kterým může být kompozitní lehký řetězec jak je definován podle druhého preferovaného aspektu vynálezu;

(c) transfekci hostitelské buňky vektorem nebo každým vektorem;

a

(d) kultivaci transfektované buněčné linie pro produkci RAM.

Alternativně může způsob zahrnovat použití sekvencí, kodujících kompozitní lehký řetězec a komplementární těžký řetězec.

Pro produkci RAM, obsahujících jak těžký tak lehký řetězec, mohou být buněčné linie transfektovány dvěma vektory. První vektor může obsahovat operon, kodující kompozitní nebo komplementární těžký řetězec a druhý vektor může obsahovat operon, kodující komplementární nebo kompozitní lehký řetězec. Výhodně jsou vektory identické pokud jsou kodující sekvence a selektující markery obsaženy tak, že umožňují, jak jen to je možné, že je stejně exprimován každý polypeptidový řetězec. V preferované alternativě může být použit jediný vektor, vektor, obsahující sekvence, kodující jak těžký řetězec tak lehký řetězec.

DNA v kodujících sekvencích pro těžký a lehký řetězec

může zahrnovat cDNA nebo genomickou DNA nebo obě.

Předložený vynález také zahrnuje terapeutické a diagnostické kompozice, obsahující RAM a použití takových kompozic v terapii a diagnóze.

V souladu s tím v dalším aspektu vynález poskytuje terapeutickou nebo diagnostickou kompozici, obsahující RAM podle předchozích aspektů vynálezu v kombinaci s farmaceuticky přijatelnou přísadou, ředidlem nebo nosičem.

Tyto kompozice mohou být připraveny použitím RAM podle předloženého vynálezu, například jako celých protilátek, jednořetězcových Fv fragmentů nebo protilátkových fragmentů, jako jsou Fab nebo Fv fragmenty. Takové kompozice mají IL-5 blokuující nebo antagonistické účinky a mohou být použity pro potlačení IL-5 aktivity.

Kompozice podle vynálezu mohou být formulovány v souladu s běžnou praxí pro podání jakýmkoliv vhodným způsobem a mohou obecně být v kapalně formě (např. roztok RAM ve sterilním fyziologicky přijatelném pufru) pro podání například intravenózním, intraperitoneálním nebo intramuskulárním způsobem; ve sprejové formě, například pro podání nasálním nebo bukálním způsobem; nebo ve formě vhodné pro implantaci.

Vynález také poskytuje způsob terapie nebo diagnózy, zahrnující podání účinného množství, výhodně 0,1 až 10 mg/kg tělesné hmotnosti, RAM podle předchozích aspektů vynálezu lidskému nebo zvířecímu subjektu. Přesná dávka a celková dávka se budou měnit podle zamýšleného použití RAM a věku a stavu léčeného pacienta. RAM může být podána jako jediná dávka nebo kontinuálním způsobem po časový úsek. Dávky mohou být podle

potřeby opakovány.

RAM podle předchozích aspektů vynálezu může být použita pro jakákoliv terapeutická použití, pro která byly použity nebo v budoucnosti budou použity anti-IL-5 protilátky, např. 39D10.

IL-5 je primární aktivátor eosinofilů a blokování funkce těchto cytokinů s protilátkami bylo zjištěno jako bránící nebo redukující eosinofilii, která je spojena s určitými alergickými chorobami. RAM podle vynálezu tak může být použita pro tento účel a zejména může být použita pro léčení astma, kdy je možno očekávat, že bude bránit akumulaci a aktivaci eosinofilů v astmatických plicích a tím redukovat bronchiální zánět a zúžení dýchacích cest. Pro použití při léčení astma může RAM podle vynálezu být výhodně jednořetězcový Fv fragment formulovaný jako sprej, pro podání například nasální cestou.

Preferovaný protokol pro získání anti-IL-5 protilátkové molekuly v souladu s předloženým vynálezem je uveden dále. Tento protokol je uveden pro zobecnění vynálezu jak je zde popsán a definován.

39D10 krysí monoklonální protilátka působící proti lidskému IL-5 je použita jako donor protilátka. Variabilní domény těžkého a lehkého řetězce 39D10 byly již dříve klonovány (WO 93/16184) a nukleotidové a předpovězené aminokyselinové sekvence těchto domén jsou uvedeny na obr. 1 a 2. Vhodné variabilní domény akceptoru těžkého a lehkého řetězce musí být stanoveny a musí být známy aminokyselinové sekvence. RAM je pak číslována tak, že vychází ze základu akceptorové sekvence.

1. CDR

V prvním stupni jsou donorové zbytky nahrazeny za akceptorové zbytky v CDR. Pro tento účel jsou CDR definovány následovně:

těžký řetězec: CDR1: zbytky 31 - 35
CDR2: zbytky 50-65
CDR3: zbytky 95-102

lehký řetězec: CDR1: zbytky 24-34
CDR2: zbytky 50 až 56
CDR3: zbytky 89 až 97

Polohy, ve kterých jsou donorové zbytky substituovány za akceptorové zbytky v rámečku jsou pak zvoleny následovně, nejprve s ohledem na těžký řetězec a následně s ohledem na lehký řetězec.

2. Těžký řetězec

2.1 Donorové zbytky jsou použity buď ve všech polohách 24, 27 až 30, 37, 49, 73, 76 a 78 nebo ve všech polohách 23, 24, 27 až 30, 37, 49, 73 a 76 až 78 těžkého řetězce.

3. Lehký řetězec

3.1 Donorové zbytky jsou použity buď ve všech polohách 22, 68 až 71 nebo ve všech polohách 68 a 71.

Předložený vynález se týká rekombinantní anti-IL-5 protilátkové molekuly, mající vazebnou afinitu v podstatě stejnou jako je afinita donorové protilátky. Předložený vynález bude nyní popsán pomocí příkladů s odkazy na připojené

obrázky.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obrázek 1 představuje nukleotidovou a aminokyselinovou sekvenci 39D10 těžkého řetězce;

obrázek 2 představuje nukleotidovou a aminokyselinovou sekvenci 39D10 lehkého řetězce;

obrázek 3 představuje srovnání regionů rámečku variabilní domény těžkého řetězce s regiony rámečku těžkého řetězce souhlasné sekvence lidské skupiny III těžkých řetězců;

obrázek 4 představuje srovnání regionů rámečku variabilní domény lehkého řetězce s regiony rámečku těžkého řetězce souhlasné sekvence lidské skupiny III lehkých řetězců;

obrázek 5 představuje nukleotidovou a aminokyselinovou sekvenci CDR naroubovaného anti-IL-5 lehkého řetězce CTIL-5-gL6;

obrázek 6 představuje nukleotidovou a aminokyselinovou sekvenci CDR naroubovaného anti-IL-5 těžkého řetězce CTIL-5-10gH;

obrázek 7 představuje mapu plasmidu pMR14;

obrázek 8 představuje mapu plasmidu pMR15.1;

obrázek 9 představuje afinitní konstanty a asociační a

náhradní list

disasociační rychlosti chimerní 39D10 protilátky a CTIL-5-10gH\ -gL6 protilátky;

obrázek 10 představuje graf neutralizace IL-5 v TF1 eseji panelem protilátek;

obrázek 11 představuje výsledky kompetiční eseje pro krysí 39D10, chimerní 39D10 protilátku a CTIL-5-10gH/gL6 protilátku a

obrázek 12 představuje účinek CTIL-5-10gH/gL6 na opičí eosinofilii.

Příklady provedení vynálezu

1. Materiál a metody

39D10 je krysí monoklonální protilátka působící proti lidskému IL-5. Geny pro variabilní domény těžkého a lehkého řetězce 39D10 byly již dříve klonovány (WO 93/16184) a nukleotidové a předpovězené aminokyselinové sekvence jsou uvedeny na obr. 1 a 2. Díky strategii použité při klonování variabilní domény 39D10 těžkého řetězce není prvních pět aminokyselin rámečkových regionů známých. Nicméně byl dostupný těžký řetězec, který obsahuje leader sekvenci a prvních pět aminokyselin rámečku 1 z protilátky YTH 34.5HL, Riechmann a spol., (Nature, 332, 323-327 (1988)).

2. Molekulární biologické postupy

Byly použity postupy molekulární biologie jak popsal Maniatis a spol. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, druhé vydání, sv. 1 až 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press

(1989)).

3. Konstrukce genů rekombinantního těžkého a lehkého řetězce

Těžký řetězec

Vh region těžkého řetězce byl generován PCR za použití oligonukleotidů R3601 a R2155. Jejich sekvence jsou:

R3601 5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGAAG(A,T)TGTGGTTAAACTGGGTTTT3'

R2155 5'GCAGATGGGCCCTTCGTTGAGGCTG(A,C)(A,G)GAGAC(G,T,A)GTGA3'

Reakční směs (100 µl), obsahující 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01 hmotn./objem želatiny, 0,25 mM každého deoxyribonukleosid trifosfátu, 0,1 µg 39D10 DNA těžkého řetězce, 6 pmol R3601 a R2155 a 0,25 jednotek Taq polymerasy. Reakční směs byla zahřívána na 94 °C 5 minut a pak cyklována při 94 °C 1 minutu, 1 min při 55 °C a 1 min při 72 °C. Po 30 cyklech byla reakční směs extrahována se stejným objemem fenol/chloroformu (1:1 obj./obj.), potom s chloroformem před tím, než byla srážena přidávkem 2,5 objemu ethanolu. PCR produkt byl rozpuštěn ve vhodném pufru, štěpen s HindIII a ApaI, čištěn na agarosovém gelu a ligován do vektoru pMR14 (obr. 7), který pak byl také štěpen s HindIII a ApaI. Po transformaci do E.coli LM1035, rostly kolonie přes noc a plasmidová DNA byla analyzována na Vh inzerty. Nukleotidová sekvence vH regionu v plasmidu, pARH1217 je uvedena na obr. 1.

Lehký řetězec

Gen VI lehkého řetězce byl generován z původního VI jak je popsáno ve WO 93/16184, klonu PCR s oligonukleotidy R3585 a

náhradní list

R3597. Jejich sekvence jsou:

R3585 5'GGACTGTTCTGAAGCCGCCACCATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT3'

R3597 5'GGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTT3'

PCR byla provedena jak je popsáno výše. PCR produkt byl štěpen enzymy BstBI a SplI a po čištění ligován do pMR15.1 (obr. 8), který již byl dříve štěpen stejnými enzymy.

Byly identifikovány kolonie, po transformaci E.coli LM1035, které obsahují plasmid (pARH1215) s V1 inzertem. Nukleotidová sekvence V1 inzertu je uvedena na obr. 2.

CDR roubování 39D10

Za účelem zvolení nejvhodnějších lidských akceptorových rámečků pro CDR smyčky 39D10 byly aminokyselinové sekvence rámečků 1-3 39D10 porovnány se sekvencemi známých lidských kappa lehkých řetězců. 39D10 byl shledán jako nejvíce homologní k lidské skupině I lehkých řetězců. Na tomto základě bylo rozhodnuto použít rámečky lidské skupiny I zárodečné linie pro CDR roubování. Homologie mezi sekvencemi jsou uvedeny na obr. 3. Uvedena je také homologie mezi rámečkem 4 regionů 39D10 a souhlasná sekvence známých lehkých řetězců lidské skupiny I. Zbytky ve 39D10, které se liší od lidské souhlasné sekvence jsou podtrženy. Příspěvek, jak by se tyto zbytky mohly podílet na antigenové vazbě byl analyzován a dva geny byly konstruovány pro CDR roubovaný lehký řetězec. Byly to CTIL-5-gL5 a CTIL-5-gL6, ve kterých jako i v CDR zbytcích, buď zbytky 22, 68 a 71 nebo zbytky 68 a 71 byly také ze 39D10. Nukleotidové a aminokyselinové sekvence CTIL-5-gL6 jsou uvedeny na obr. 5.

Těžký řetězec

CDR roubování 39D10 těžkého řetězce bylo provedeno jak je popsáno pro lehký řetězec. Rámečkové regiony 39D10 byly nalezeny jako nejvíce homologní k regionům lidské skupiny III protilátek a, následně souhlasná sekvence rámečků genů lidské skupiny III zárodečné linie byla použita k akceptování CDR 39D10 těžkého řetězce. Jako dříve byla také zvolena souhlasná sekvence pro lidskou skupinu III rámečku 4 regionů. Porovnání těchto sekvencí je uvedeno na obr. 4 s podtrženými zbytky ve 39D10, které se liší od lidské souhlasné sekvence.

Byla provedena analýza rámečkových zbytků ve 39D10, které by mohly ovlivnit antigenovou vazbu a byly konstruovány dva geny, CTIL-5-9gH a CTIL-5-10gH, ve kterých buď zbytky 23, 24, 27 až 30, 37, 49, 73 a 76 až 78 nebo zbytky 24, 27-30, 37, 49, 73, 76 a 78 byly ze 39D10. Nukleotidová a aminokyselinová sekvence CTIL-5-10gH je uvedena na obr. 6.

Exprese a bioaktivita anti-IL-5 protilátek

Chimerní (kryší/lidský) a CDR roubovaný 39D10 byly vyrobeny pro biologické hodnocení přechodné exprese párů těžkého a lehkého řetězce po ko-transfekci do buněk vaječníků čínského křečka (CHO) za použití srážení fosforečnanem vápenatým.

Den před ko-transfekcí byly polo-konfluentní lahve CHO-L761h buněk (Cockett a spol., Nucl.Acids.Res., 19, 319-325, 1991) trypsinizovány, buňky byly spočteny a T75 lahve byly každá naplněny 10^7 buněk. Další den bylo kulivační medium vyměněno 3 hodiny před transfekcí. Pro transfekci byla připravena sraženina fosforečnanu vápenatého smísením 1,25 ml

0,25M CaCl₂, obsahující 50 µg každého z expresních vektorů těžkého a lehkého řetězce s 1,25 ml 2xHBS (16,36 g NaCl, 11,9 g HEPES a 0,4 g Na₂HPO₄ v 1 litru vody a pH upraveným na 7,1 pomocí NaOH) a ihned přidány do media buněk. Po 3 h při 37 °C v CO₂ inkubátoru byly medium a sraženina odstraněny a buňky šokovány přidavkem 15 ml 15% glycerinu ve fosfátem pufovaném salinickém roztoku (PBS) po 1 minutu. Glycerin byl odstraněn, buňky byly jednou promyty PBS a inkubovány 48-96 hodin ve 25 ml media, obsahujícího 10 mM butyrátu sodného. Protilátka byla čištěna z kultivačního media navázáním k a elucí z protein A - Sepharosy. Koncentrace protilátky byla stanovena za použití lidský Ig ELISA (viz dále).

ELISA

Expresa protilátky byla hodnocena transfekcí párů genů těžkého a lehkého řetězce a, po třech dnech inkubace, měřením množství protilátky nahromaděné v kultivačním mediu pomocí ELISA.

Pro ELISA, byly Nunc ELISA plotny potaženy přes noc při 4 °C F(ab')₂ fragmentem polyklonální kozí anti-lidský Fc fragment specifické protilátky (Jackson ImmunoResearch, kod 109-006-098) při 5 µg/ml v potahovacím pufru (15 mM uhličitan sodný, 35 mM hydrogenuhličitan sodný, pH 6,9). Nepotažená protilátka byla odstraněna promytím 5krát destilovanou vodou. Vzorky a čištěné standardy pro kvantifikaci byly zředěny na přibližně 1 µg/ml v konjugátovém pufru (0,1 Tris-HCl pH 7,0, 0,1M NaCl, 0,2% obj./obj. Tween 20, 0,2 % hmotn./obj. Hammersten kaseinu). Vzorky byly titrovány v mikrotitračních jamkách ve 2-násobných zředěním pro poskytnutí konečného objemu 0,1 ml v každé jamce a plotny byly inkubovány při teplotě místnosti 1 hodinu za třepání. Po prvním inkubačním stupni

byly plotny promyty 10krát destilovanou vodou a pak inkubovány 1 hodinu jako dříve s 0,1 ml myší monoklonální anti-lidské kappa(klon GD12) peroxidasa konjugované protilátky (The Binding Site, kod MP135) při ředění 1 v 700 v konjugátovém pufru. Plotny byly opět promyty a do každé jamky byl přidán substrátový roztok (0,1 ml). Substrátový roztok obsahuje 150 μ l N,N,N,N-tetramethylbenzidinu (10 mg/ml v DMSO), 150 μ l peroxidu vodíku (30% roztok) v 10 ml 0,1M octanu sodného/citrátu sodného, pH 6,0. Plotna byla vyvíjena 5 až 10 minut až absorbance při 630 nm byla přibližně 1,0 pro špičkový standard. Absorbance 630 nm byla měřena použitím plotnové čtečky a koncentrace vzorku stanovena porovnáním titračních křivek s křivkou standardu.

Stanovení afinitních konstant pro anti-IL-5 protilátky

Afinity chimerních a CDR roubovaných anti-IL-5 protilátek byly stanoveny za použití Biospecific Interaction Analysis (BIA). Protilátky byly produkovány v CHO buňkách transfekcí kombinací genů těžkého a lehkého řetězce a čištěny ze supernatantů kultury na Protein A Sepharose. Pro afinitní měření byla polyklonální anti-lidská Fc protilátka navázána k Pharmacia Biosensor chip (12150 relativní odezvové jednotky, RU) a použity k zachycení anti-IL-5, který prošel nad chipem při 5 μ g/ml v 10 mM HEPES, 0,15M NaCl, 3,4 mM EDTA, pH 7,4. Množství anti-IL-5 zachycené pro každý běh bylo přibližně 1600 RU. Rekombinantní lidský IL-5 pak prošel přes Sensorchip v různých koncentracích (0,6 až 5 μ g/ml) ve výše uvedeném pufru. Sensorchip byl čištěn po každém běhu pomocí 100 mM HCl a 100 mM kyseliny orthofosforečné pro odstranění navázaného IL-5 a protilátky. Generované sensogramy byly analyzovány za použití kinetického softwaru dostupného s přístrojem BIAcore.

Byly stanoveny hodnoty pro afinitní konstanty a asociační a disociační rychlosti dvou protilátek, chimerní 39D10 a CTIL-5-10gH/-gL6. Výsledky jsou uvedeny na obr. 9. Je možno vidět, že chimerní 39D10 má extrémně vysokou afinitu pro lidský IL-5 a že tato hodnota byla reprodukována v CTIL-5-10gH/-gL6.

Aktivita anti-IL-5 protilátek v in vitro bioeseji

Aktivity různých CDR roubovaných protilátek byly porovnány s aktivitami chimerní 39D10 v in vitro bioeseji za použití TF1 buněk. TF1 je erythroleukemická buněčná linie, která vyžaduje pro růst GM-CSF. GM-CSF může být nahrazen IL-5, ale v tomto případě buňky pouze přežívají a nemnoží se. Nicméně závislost na IL-5 pro přežití znamená, že TF1 buňky mohou být použity v bioeseji pro porovnání aktivit různých anti-IL-5 protilátek.

Neutralizace anti-IL-5 protilátkami byla měřena za použití konstantního množství IL-5 (2 ng/ml) a proměnných množství protilátky inkubované s 5×10^4 buňkami na jamku v 96 jamových plotnách s plochým dnem po 3 dny. Po poslední 4 hodiny jsou buňky kultivovány za přítomnosti Thiazolyl blue (MIT). Toto barvivo se konvertuje na nerozpustnou purpurovou formu mitochondriálními enzymy v životaschopných buňkách. Nerozpustný materiál byl rozpuštěn inkubací přes noc po přidavku 100 μ l 50% dimethylformamidu, 20% SDS pH 4,7 a množství přijatého barviva stanoveného spektrofotometricky. Hodnoty bioaktivního IL-5 zůstávajícího za přítomnosti protilátek se extrapoluje ze standardní křivky, vyjadřující příjem barviva ke koncentraci IL-5 koncentraci.

Aktivity různé kombinace těžkého a lehkého řetězce byly

hodnoceny za použití TF1 bioeseje. Výsledky jsou uvedeny na obr. 10. Je možno vidět, že všechny kombinace CDR roubovaného těžkého a lehkého řetězce produkují protilátky, které jsou ekvipotentní s chimerním 39D10. Tyto výsledky indikují, že ani zbytek 22 v lehkém řetězci ani zbytky 23 nebo 78 v těžkém řetězci nejsou vyžadovány aby 39D10 byl specifický pro optimální vázání. Kombinace s méně 39D10 specifickými zbytky je proto CTIL-5-10gH/-gL6.

Aktivita anti-IL-5 protilátek v kompetičních esejích

Rekombinantní lidský IL-5 byl ředěn na 1 $\mu\text{g/ml}$ ve fosfátem pufrovaném salinickém roztoku (PBS) a 100 μl podíly byly přidány na mikrotitrační plotny (Costar Amine Binding plates) a inkubovány přes noc při 4 °C. Plotny byly promyty třikrát s PBS, obsahujícím 0,5 % Tweenu 20 a jakákoliv zbývající aktivní místa blokována se 2 % hovězího serového albuminu (BSA) v PBS po 30 minut. Plotny pak byly odsáty a vyklepány dosucha. Pro porovnání relativní vazebné aktivity rodičovské krysí protilátky (39D10) s chimerní a roubovanou protilátkou byla připravena postupná ředění každé anti-IL-5 protilátky v PBS/1 % BSA a 50 μl bylo přidáno k duplicitním jamkám a ihned následováno 50 μl 39D10-biotin konjugátu při 0,125 $\mu\text{g/ml}$. Esej byla inkubována 2 hodiny při teplotě místnosti za míchání a pak dvakrát promyta PBS. Do všech jamek byla přidána křenová peroxidasa konjugovaná ke streptavidinu (1 $\mu\text{g/ml}$) a inkubována dalších 30 minut. Plotny byly čtyřikrát promyty a bylo přidáno 100 μl tetramethylbenzidinového (TMB) substrátu. Vývin barvy byl odečten při 630 nm (referenčních 490 nm) a OD (630-490) byla vynesena proti log (10) koncentrace protilátky.

Při porovnání aktivit krysího 39D10, chimerního 39D10 a

CTIL-5-10gH/gL6 ve výše uvedené competiční eseji, byly získány výsledky uvedené na obr. 11. Všechny tři protilátky soutěží stejně dobře s biotinylatovaným-39D1 pro navázání k IL-5, což indikuje, že CDR smyčky 39D10 byly úspěšně transferovány do lidských rámečků.

Vliv anti-IL-5 protilátky na opičí eosinofilii

Anti-IL-5 protilátka (CTIL-5-10gH/gL6) byla testována v opičím systému, který modeluje astmatické podmínky (viz Mauser P.J. a spol., Ann. Rev. Respir. Dis., v tisku). Při podání, jednu hodinu před podnětem s *Ascaris*, responzivním opicím, inhibuje CTIL-5-10gH/gL6 plicní výplach eosinofilie ze 75 % v dávce 0,3 mg/kg i.v. Tato sada opic není hyperresponzivní k histaminu takže účinky CTIL-5-10gH/gL6 na hyperresponzivní nemohly být stanoveny. Tři měsíce po této jediné dávce je akumulace eosinofilu v odpovědi na podnět s *Ascaris* ještě inhibována ze 75 %.

U alergické myši CTIL-5-10gH/gL6 inhibuje plicní eosinofilii při 1 mg/kg i.p.

Seznam sekvencí

(1) Obecná informace:

(i) Přihlašovatel:

- (A) Jméno: CELLTECH LIMITED
- (B) Ulice: 216 BATH ROAD
- (C) Město: SLOUGH
- (D) Stát: BERKSHIRE
- (E) Země: Velká Británie
- (F) Poštovní kod (ZIP): SLI 4EN
- (G) Telefon: 0753 534655
- (H) Telefax: 0753 536632
- (I) Telex: 848473

(ii) Název vynálezu: Interleukin-5 specifické rekombinantní protilátky

(iii) Počet sekvencí: 28

(iv) Počítačově čtecí forma:

- (A) Typ media: Floppy disk
- (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
- (C) Pracovní systém: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) Informace o SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 48 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

GCGCGCAAGC TTGCCGCCAC CATGAAGATT GTGGTTAAAC TGGGTTTT

48

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 41 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

GCAGATGGGC CCTTCGTTGA GGCTGACAGG AGACGTAGTG A

41

(2) Informace o SEQ ID NO: 3:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 44 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

GGACTGTECG AAGCCGCCAC CATGAGTGTG CTCACTCAGG TCCT

44

(2) Informace o SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 30 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

GGATACAGTT GGTGCAGCAT CCGTACGTTT

30

(2) Informace o SEQ ID NO: 5:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 333 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Rysy:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Lokace: 1..333

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

GAA	TCT	GGA	GGA	GGC	TTG	GTA	CAG	CCA	TCA	CAG	ACC	CTG	TCT	CTC	ACC	48
Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	
1				5				10						15		
TGC	ACT	GTC	TCT	GGG	TTA	TCA	TTA	ACC	AGC	AAT	AGT	GTG	AAC	TGG	ATT	96
Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Asn	Ser	Val	Asn	Trp	Ile	
			20					25						30		
CGG	CAG	CCT	CCA	GGA	AAG	GGT	CTG	GAG	TGG	ATG	GGA	CTA	ATA	TGG	AGT	144
Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Leu	Ile	Trp	Ser	
		35					40					45				
AAT	GGA	GAC	ACA	GAT	TAT	AAT	TCA	GCT	ATC	AAA	TCC	CGA	CTG	AGC	ATC	192
Asn	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	
	50					55					60					
AGT	AGC	GAC	ACC	TCG	AAG	AGC	CAG	GTT	TTC	TTA	AAG	ATG	AAC	AGT	CTG	240
Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	
65					70					75					80	
CAA	AGT	GAA	GAC	ACA	GCC	ATG	TAC	TTC	TGT	GCC	AGA	GAG	TAC	TAC	GGC	288
Gln	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Gly	
				85					90						95	
TAC	TTT	GAT	TAC	TGG	GGC	CAA	GGA	GTC	ATG	GTC	ACA	GTC	TCC	TCA		333
Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
			100					105						110		

(2) Informace o SEQ ID NO: 6:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 111 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr
 1 5 10 15
 Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu Thr Ser Asn Ser Val Asn Trp Ile
 20 25 30
 Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Leu Ile Trp Ser
 35 40 45
 Asn Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Ile Lys Ser Arg Leu Ser Ile
 50 55 60
 Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Gly
 85 90 95
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

(2) Informace o SEQ ID NO: 7:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 384 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Retězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Rysy:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Lokace: 1..384

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

ATG GCT GTG CCC ACT CAG CTC CTG GGG TTG TTG TTG CTG TGG ATT ACA	48
Met Ala Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Ile Thr	
1 5 10 15	
GAT GCC ATA TGT GAC ATC CAG ATG ACA CAG TCT CCA GCT TCC CTG TCT	96
Asp Ala Ile Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser	
20 25 30	
GCA TCT CTG GGA GAA ACT ATC TCC ATC GAA TGT CTA GCA AGT GAG GGC	144
Ala Ser Leu Gly Glu Thr Ile Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Gly	
35 40 45	
ATT TCC AGT TAT TTA GCG TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGG AAA TCT CCT	192
Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro	
50 55 60	
CAG CTC CTG ATC TAT GGT GCA AAT AGC TTG CAA ACT GGG GTC CCA TCA	240
Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser	
65 70 75 80	

CGG ATC AGT GGC AGT GGA TCT GCC ACA CAA TAT TCT CTC AAG ATC AGC	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser	
85 90 95	
AGC ATG CAA CCT GAA GAT GAA GGG GAT TAT TTC TGT CAA CAG AGT TAC	336
Ser Met Gln Pro Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr	
100 105 110	
AAG TTT CCG AAC ACG TTT GGA GCT GGG ACC AAG CTG GAA CTG AAA CGG	384
Lys Phe Pro Asn Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg	
115 120 125	

(2) Informace o SEQ ID NO: 8:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 128 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

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

(2) Informace o SEQ ID NO: 12:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 15 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Retězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

Tyr Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

(2) Informace o SEQ ID NO: 13:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 32 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Retězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

(2) Informace o SEQ ID NO: 14:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 32 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Retězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gln Tyr Ser
 1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Ser-Met Gln Pro Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys
 20 25 30

(2) Informace o SEQ ID NO: 21:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 32 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Řetězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 21:

```

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1           5           10           15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
          20           25           30

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 22:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 32 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Řetězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 22:

```

Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
1           5           10           15
Met Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Ala Arg
          20           25           30

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 23:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 11 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Řetězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 23:

```

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          5           10

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 24:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 11 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Řetězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 24:

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 5 10

(2) Informace o SEQ ID NO: 25:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 399 párů bází
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Rysy:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Lokace: 1..399

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 25:

TTC GAA GCC GCC ACC ATG TCT GTC CCC ACC CAA GTC CTC GGT CTC CTG	48
Phe Glu Ala Ala Thr Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu	15
1 5 10	
CTG CCG TGG CTT ACA GAT GCC AGA TGT GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC	96
Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser	30
20 25	
CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CCG GTC ACC ATC ACA TGT	144
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys	45
35 40	
CTA GCA AGT GAG GGC ATC TCC AGT TAC TTA GCG TGG TAC CAG CAG AAG	192
Leu Ala Ser Glu Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys	60
50 55 60	
CCC GCG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GGT GCG AAT AGC TTG CAG	240
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Asn Ser Leu Gln	80
65 70 75 80	

ACT GGA GTA CCA TCA AGA TTC AGT GGC TCA GGA TCC GCT ACA GAC TAC	288
Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Tyr	
85 90 95	
ACG CAC ACG ATC TCC AGC CTA CAG CCT GAA GAT TTC GCA ACG TAT TAC	336
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr	
100 105 110	
TGT GGA CAG TCG TAT AAG TTC CCG AAC ACA TTC GGT CAA GGC ACC AAG	384
Cys Gln Gln Ser Tyr Lys Phe Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys	
115 120 125	
GTC GGA GTC AAA CGT	399
Val Glu Val Lys Arg	
130	

(2) Informace o SEQ ID NO: 26:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 133 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 26:

Phe Glu Ala Ala Thr Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser

CCT GGC AAG GGT CTC GAG TGG GTT GGA CTA ATA TGG AGT AAT GGA GAC Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Leu Ile Trp Ser Asn Gly Asp 65 70 75 80	240
ACA GAT TAT AAT TCA GCT ATC AAA TCT CGA TTC ACA ATC TCT AGA GAC Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Ile Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp 85 90 95	288
ACT TCG AAG AGC ACC GTA TAC CTG CAG ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAA Thr Ser Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu 100 105 110	336
GAT ACG GCA GTC TAC TAC TGT GCT CGT GAG TAC TAT GGA TAT TTC GAC Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp 115 120 125	384
TAT TGG GGT CAA GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 130 135 140	420

(2) Informace o SEQ ID NO: 28:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 140 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 28:

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

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. RAM, mající afinitu pro lidský IL-5 antigen a obsahující antigen vázebné regiony získané z variabilních domén těžkého a/nebo lehkého řetězce donor protilátky, mající afinitu pro lidský IL-5, RAM, mající vazebnou afinitu podobnou afinitě donor protilátky.
2. Anti-IL-5 protilátková molekula podle nároku 1, obsahující kompozitní těžký řetězec a komplementární lehký řetězec, kde uvedený kompozitní těžký řetězec, mající variabilní doménu, obsahující převážně zbytky rámečku akceptoru protilátky těžkého řetězce a antigen-vázající zbytky protilátky donor těžkého řetězce, kde uvedená donor protilátka má afinitu pro lidský IL-5, přičemž uvedený kompozitní těžký řetězec obsahuje donor zbytky alespoň v polohách 31 až 35, 50 až 65 a 95 až 102 (podle Kabatova číslovacího systému).
3. Protilátková molekula podle nároku 2, kde aminokyselinové zbytky 24, 27 až 30, 37, 49, 73, 76 a 78 v uvedeném kompozitním těžkém řetězci jsou navíc donor zbytky.
4. Protilátková molekula podle nároku 2, kde aminokyselinové zbytky 23, 24, 27 až 30, 37, 49, 73 a 76 až 78 v uvedeném kompozitním těžkém řetězci jsou navíc donor zbytky.
5. Anti-IL-5 protilátková molekula podle nároku 1, obsahující kompozitní lehký řetězec a komplementární těžký řetězec, kde uvedený kompozitní lehký řetězec má variabilní doménu, obsahující převážně zbytky rámečku lehkého řetězce protilátky a antigen-vázající zbytky lehkého řetězce donor protilátky,

kde uvedená donor protilátka má afinitu pro lidský IL-5, přičemž uvedený kompozitní lehký řetězec obsahuje donor zbytky alespoň v polohách 24 až 34, 50 až 56 a 89 až 97 (podle Kabatova číslovacího systému) a kde uvedená anti-IL-5 protilátková molekula má vazebnou afinitu podobnou afinitě donor protilátky.

6. Protilátková molekula podle nároku 5, kde aminokyselinové zbytky 68 a 71 v uvedeném kompozitním lehkém řetězci jsou navíc donor zbytky.

7. Protilátková molekula podle nároku 5, kde aminokyselinové zbytky 22, 68 a 71 v uvedeném kompozitním lehkém řetězci jsou navíc donor zbytky.

8. Anti-IL-5 protilátková molekula, mající afinitu pro lidský IL-5, obsahující kompozitní těžký řetězec podle kteréhokoliv z nároků 5 až 7.

9. Protilátková molekula podle kteréhokoliv z nároků 2 až 8, obsahující převážně lidské akceptorové zbytky a ne-lidské donor zbytky.

10. Protilátková molekula podle kteréhokoliv z nároků 2 až 9, kde akceptorové zbytky pro kompozitní těžké a lehké řetězce jsou zbytky těžkého řetězce lidské skupiny III a lehkého řetězce lidské skupiny I a donor zbytky pro kompozitní těžké a lehké řetězce jsou zbytky krysího 39D10 těžkého a lehkého řetězce.

11. DNA sekvence, která koduje kompozitní těžký řetězec nebo kompozitní lehký řetězec protilátky podle kteréhokoliv z nároků 2 až 10.

12. Klonovací nebo expresní vektor, obsahující DNA sekvenci podle nároku 11.

13. Hostitelská buňka transformovaná DNA sekvencí podle nároku 11.

14. Způsob produkce anti-IL-5 protilátky, zahrnující expresi alespoň jedné DNA sekvence podle nároku 11 ve transformované hostitelské buňce.

15. Způsob produkce anti-IL-5 protilátkové molekuly, zahrnující:

(a) produkci operonu v expresním vektoru, majícího DNA sekvenci, která koduje kompozitní těžký řetězec podle kteréhokoliv z nároků 2 až 4;

(b) popřípadě produkci operonu v expresním vektoru, majícího DNA sekvenci, která koduje komplementární lehký řetězec, kterým může být kompozitní lehký řetězec podle kteréhokoliv z nároků 5 až 7;

(c) transfekci hostitelské buňky s vektorem nebo každým vektorem a

(d) kultivaci transfektované buněčné linie pro produkci protilátkového produktu.

16. Způsob produkce anti-IL-5 protilátkové molekuly podle nároku 15, kde DNA sekvence koduje kompozitní lehký řetězec a komplementární těžký řetězec.

17. Terapeutická nebo diagnostická kompozice, obsahující protilátkovou molekulu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem, ředidlem nebo přísadou.

18. Způsob terapie nebo diagnózy, zahrnující podání účinného množství protilátkové molekuly podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 lidskému nebo zvířecímu subjektu.

PV3712-96

1/12

PRIL
VLASTNICTV
PRMYSLOVEHO
URAD
17 XII 96
00\$00
0 9 2 9 7 4
2.1.

Obr. 1

5

GAA TCT GGA GGA GGC TTG GTA CAG CCA TCA CAG ACC CTG TCT CTC
 E S G G G L V Q P S Q T L S L>

ACC TGC ACT GTC TCT GGG TTA TCA TTA ACC AGC AAT AGT GTG AAC
 10 T C T V S G L S L T S N S V N>

TGG ATT CGG CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG ATG GGA CTA
 W I R Q P P G K G L E W M G L>

15 ATA TGG AGT AAT GGA GAC ACA GAT TAT AAT TCA GCT ATC AAA TCC
 I W S N G D T D Y N S A I K S>

CGA CTG AGC ATC AGT AGG GAC ACC TCG AAG AGC CAG GTT TTC TTA
 R L S I S R D T S K S Q V F L

20

AAG ATG AAC AGT CTG CAA AGT GAA GAC ACA GCC ATG TAC TTC TGT
 K M N S L Q S E D T A M Y F C>

GCC AGA GAG TAC TAC GGC TAC TTT GAT TAC TGG GGC CAA GGA GTC
 25 A R E Y Y G Y F D Y W G Q G V

ATG GTC ACA GTC TCC TCA
 M V T V S S>

2/12

PRŮMYSLOVÉHO ÚRAD VLASTNICTVÍ
17 XI 96
00510
092974
2.1.

Obr. 2

5

ATG GCT GTG CCC ACT CAG CTC CTG GGG TTG TTG TTG CTG TGG ATT
M A V P T Q L L G L L L L W I>

10

ACA GAT GCC ATA TGT GAC ATC CAG ATG ACA CAG TCT CCA GCT TCC
T D A I C D I Q M T Q S P A S>

CTG TCT GCA TCT CTG GGA GAA ACT ATC TCC ATC GAA TGT CTA GCA
L S A S L G E T I S I E C L A>

15

AGT GAG GGC ATT TCC AGT TAT TTA GCG TGG TAT CAG CAG AAG CCA
S E G I S S Y L A W Y Q Q K P>

GGG AAA TCT CCT CAG CTC CTG ATC TAT GGT GCA AAT AGC TTG CAA
G K S P Q L L I Y G A N S L Q>

20

ACT GGG GTC CCA TCA CGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GCC ACA CAA
T G V P S R F S G S G S A T Q

25

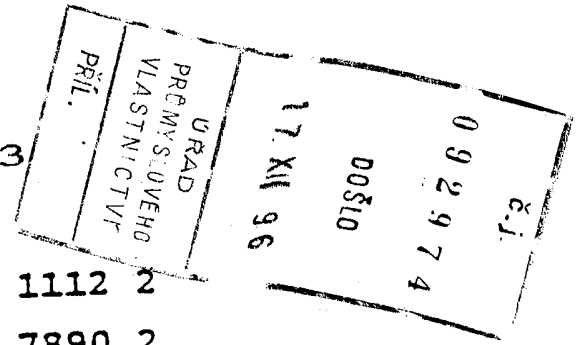
TAT TCT CTC AAG ATC AGC AGG ATG CAA CCT GAA GAT GAA GGG GAT
Y S L K I S S M Q P E D E G D>

TAT TTC TGT CAA CAG AGT TAC AAG TTT CCG AAC ACG TTT GGA GCT
Y F C Q Q S Y K F P N T F G A>

30

GGG ACC AAG CTG GAA CTG AAA CGG
G T K L E L K R>

3/12



5 | rámeček 1

Obr. 3

1 1112 2

9 5 7890 2

10 hu gp1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
 39D10 DIQMTQSPASLSASLGETISIEC

rámeček 2

4 4

15

3 5

hu gp1 WYQQKPGKAPKLLIY
 39D10 WYQQKPGKSPQLLIY

rámeček 3

20

6 777 7 7 888 8

8 012 4 8 345 7

hu gp1 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
 39d10 GVPSRFSGSGSATQYSLKISSMQPEDEGDYFC

25

rámeček 4

1 1 1

0 0 0

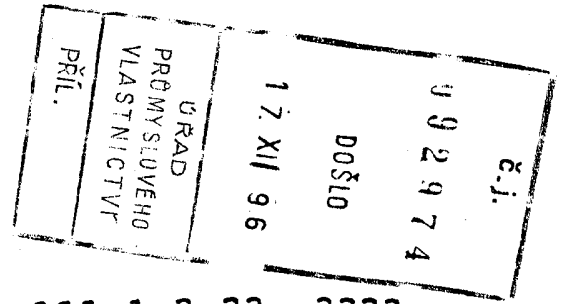
30

0 4 6

hu gp1 FGQGTKVEIKR
 39D10 FGAGTKLELKR

4/12

Obr. 4



5 : rámeček 1

111 1 2 22 2223
 567 9 1 34 7890

hu gp3 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
 39D10 ?????ESGGGLVQPSOTLSLTCTVSGLSLT

10

rámeček 2

3 4 44
 7 0 89

15 hu gp3 WVRQAPGKGLEWVS
 39D10 WIRQPPGKGLEWMG

: rámeček 3

20 66 7 7777 8 88 8 9
 78 3 6789 1 34 9 1

hu gp3 RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR
 39D10 RLSISRDTSKSOVFLKMNSLOSEDTAMYFCAR

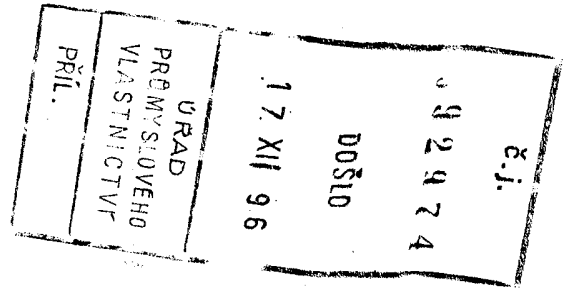
25

rámeček 4

11
 00
 78

30 hu gp3 WGQGTLVTVSS
 39D10 WGQGVMVTVSS

5/12



Obr. 5

5

TTCGAAGCCGCCACC ATG TCT GTC CCC ACC CAA GTC CTC GGT CTC CTG
M S V P T Q V L G L L>

10 CTG CTG TGG CTT ACA GAT GCC AGA TGT GAC ATT CAA ATG ACC CAG
L L W L T D A R C D I Q M T Q>

AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG GTC ACC ATC
S P S S L S A S V G D R V T I>

15 ACA TGT CTA GCA AGT GAG GGC ATC TCC AGT TAC TTA GCG TGG TAC
T C L A S E G I S S Y L A W Y>

CAG CAG AAG CCC GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GGT GCG
Q Q K P G K A P K L L I Y G A>

20

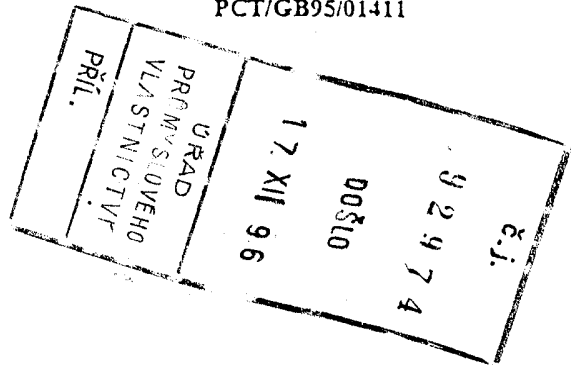
AAT AGC TTG CAG ACT GGA GTA CCA TCA AGA TTC AGT GGC TCA GGA
N S L Q T G V P S R F S G S G>

25 TCC GCT ACA GAC TAC ACG CTC ACG ATC TCC AGC CTA CAG CCT GAA
S A T D Y T L T I S S L Q P E>

GAT TTC GCA ACG TAT TAC TGT CAA CAG TCG TAT AAG TTC CCG AAC
D F A T Y Y C Q Q S Y K F P N>

30 ACA TTC GGT CAA GGC ACC AAG GTC GAA GTC AAA CGT
T F G Q G T K V E V K R>

6/12



Obr. 6

5

AAGCTTGCCGCCACC ATG GGC TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTA GTA
 M G W S C I I L F L V>

10 GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAG GTC CAA CTG GTA GAA TCT
 A T A T G V H S E V Q L V E S>

GGA GGT GGT CTC GTA CAG CCA GGA GGA TCT CTG CGA CTG AGT TGC
 G G G L V Q P G G S L R L S C>

15 GCC GTC TCT GGG TTA TCA TTA ACT AGT AAT AGT GTG AAC TGG ATA
 A V S G L S L T S N S V N W I>

CGG CAA GCA CCT GGC AAG GGT CTC GAG TGG GTT GGA CTA ATA TGG
 R Q A P G K G L E W V G L I W>

20 AGT AAT GGA GAC ACA GAT TAT AAT TCA GCT ATC AAA TCT CGA TTC
 S N G D T D Y N S A I K S R F>

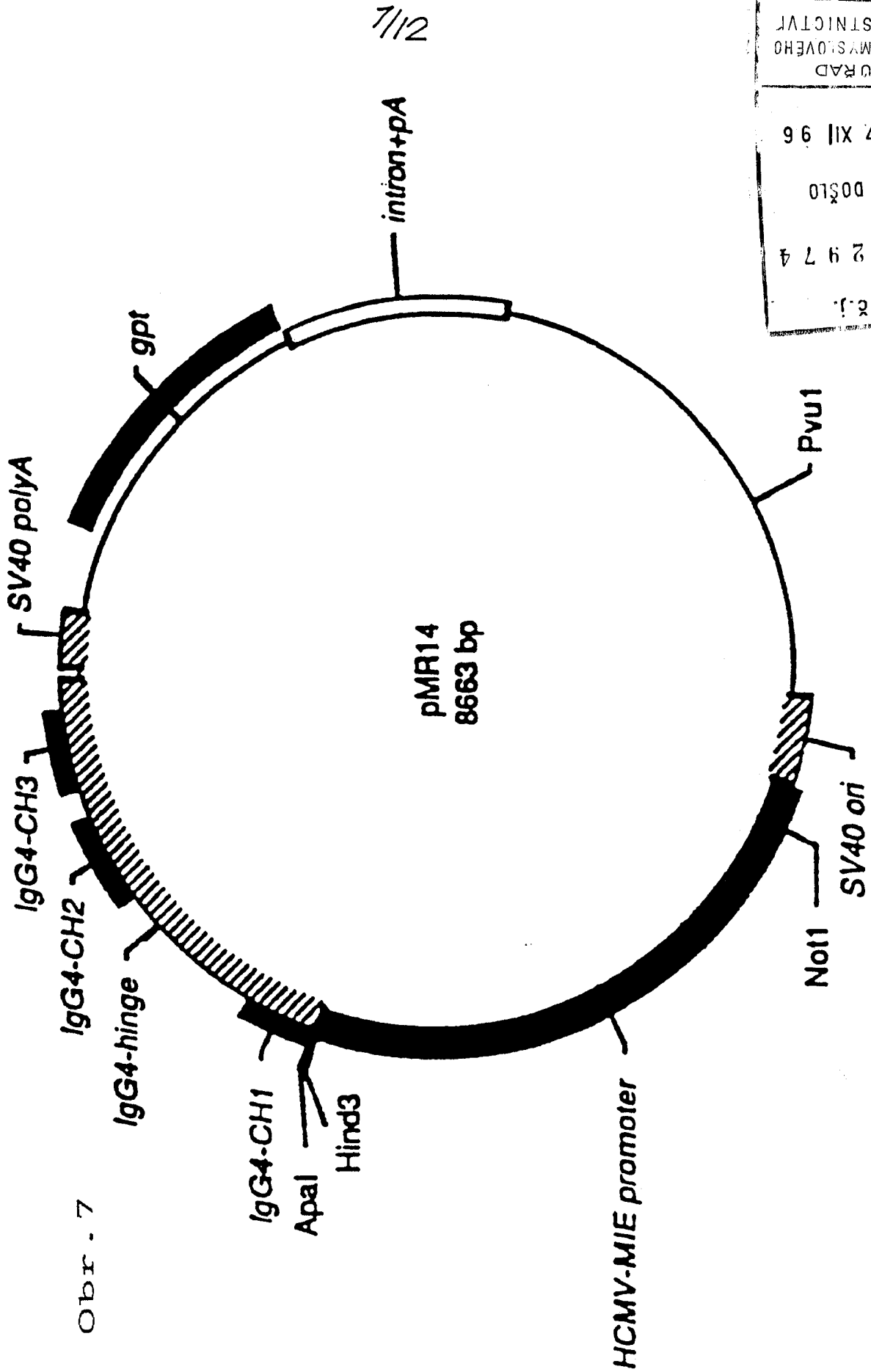
ACA ATC TCT AGA GAC ACT TCG AAG AGC ACC GTA TAC CTG CAG ATG
 25 T I S R D T S K S T V Y L Q M>

AAC AGT CTG AGA GCT GAA GAT ACT GCA GTC TAC TAC TGT GCT CGT
 N S L R A E D T A V Y Y C A R>

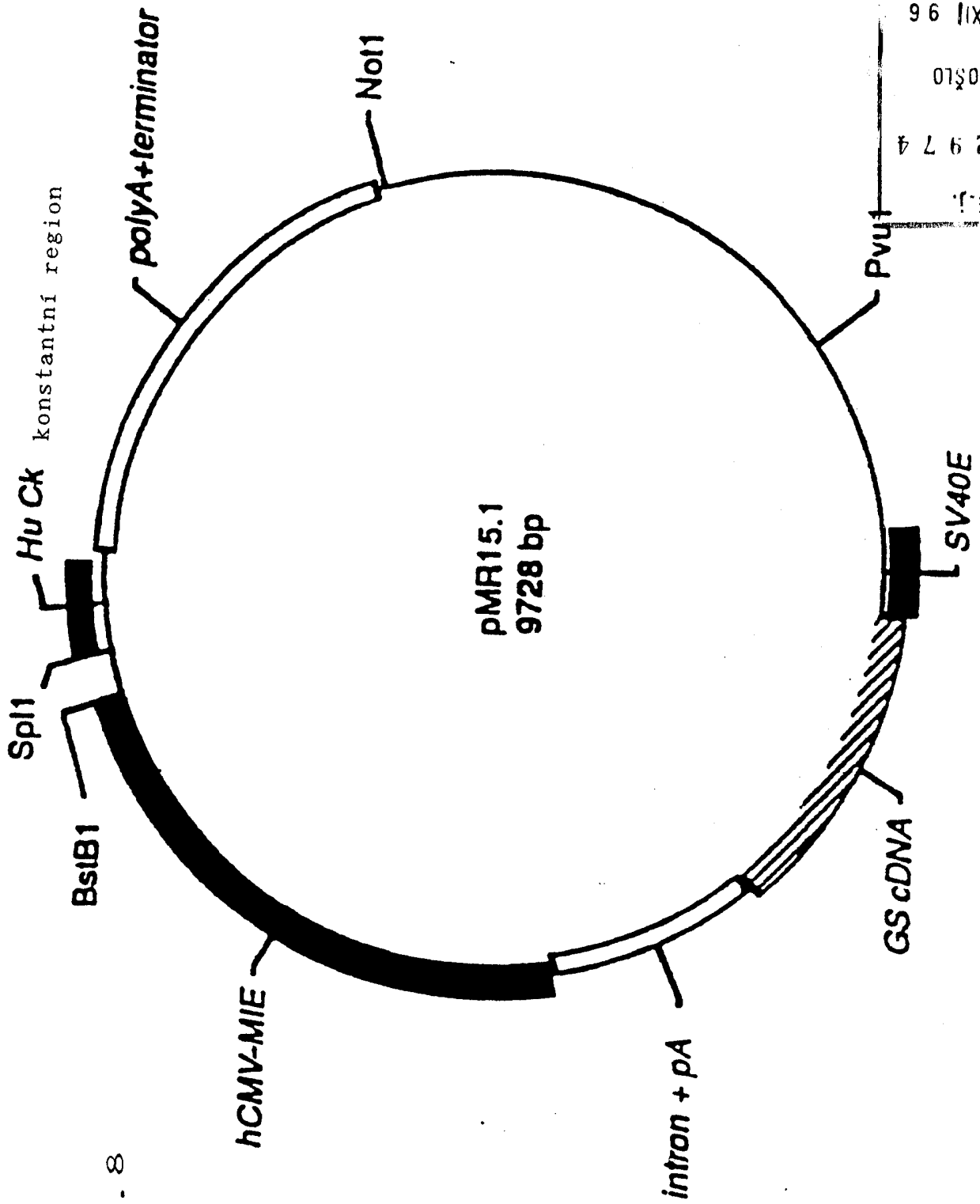
30 GAG TAC TAT GGA TAT TTC GAC TAT TGG GGT CAA GGT ACC CTA GTC
 E Y Y G Y F D Y W G Q G T L V>

ACA GTC TCC TCA
 T V S S>

PRIL.
VLASTNICTVI
PRŮMYSLOVÉHO
ÚRAD
17 XII 96
00810
092974
2.



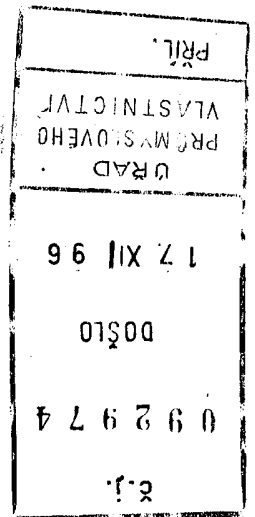
8/12



Obr. 8

PRIL.	0 9 2 9 7 4
PRŮMYSLOVÉHO	00510
VLASTNICTVÍ	1 7 XII 9 6
URAD	g.j.

9/12

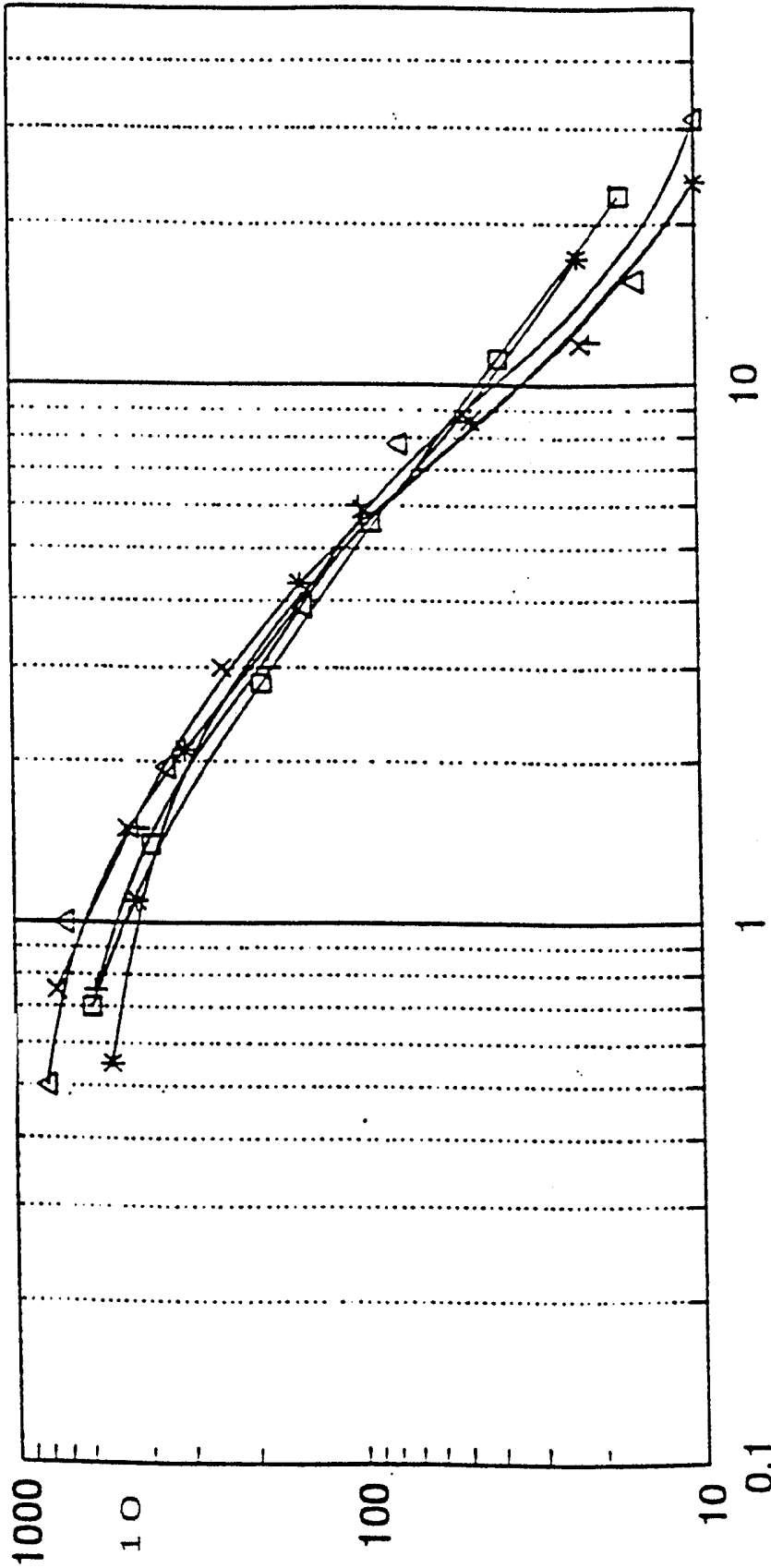


Obr. 9

Protilátka	<u>kd</u>	<u>kass</u>	
	($\times 10^{-10} M$)	($\times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$)	
5	Chimerická 39D10	1.14	5.77
		0.63	6.27
10	CTIL-5-10gH/gL6	0.89	4.55
		1.18	4.72

21/01

zbytkový IL-5 v pg/ml



Obr. 10

koncentrace protilátky v ng/ml

- + -9gH/-gL5
- x -10gH/-gL6
- * -9gH/-gL6
- △ CHIMERIC HLT29
- -10gH/-gL5

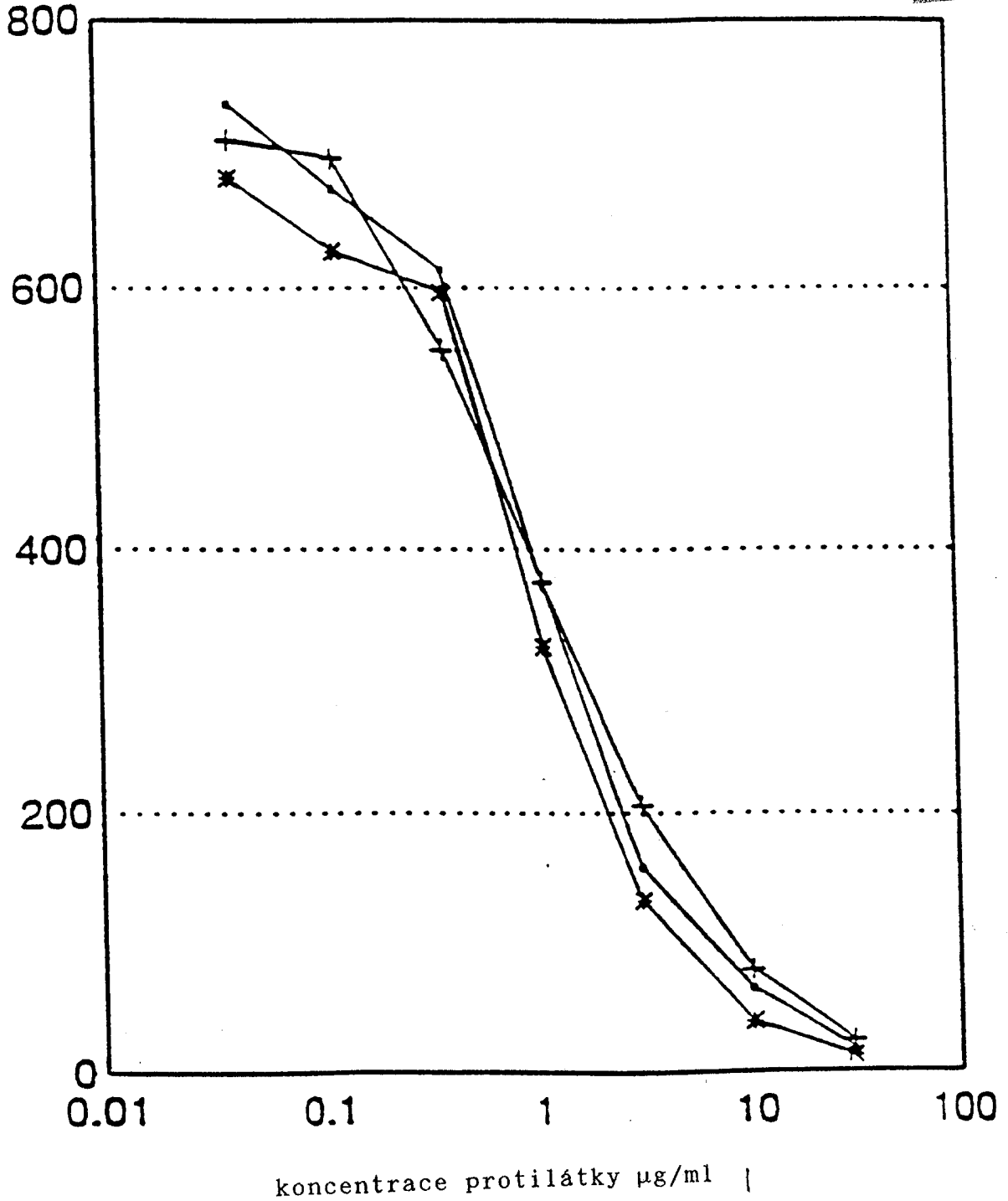
0 9 2 9 7 4	00510	1 7 XII 9 6	ÚRAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PRŮL.
-------------	-------	-------------	-------------------------------------	-------

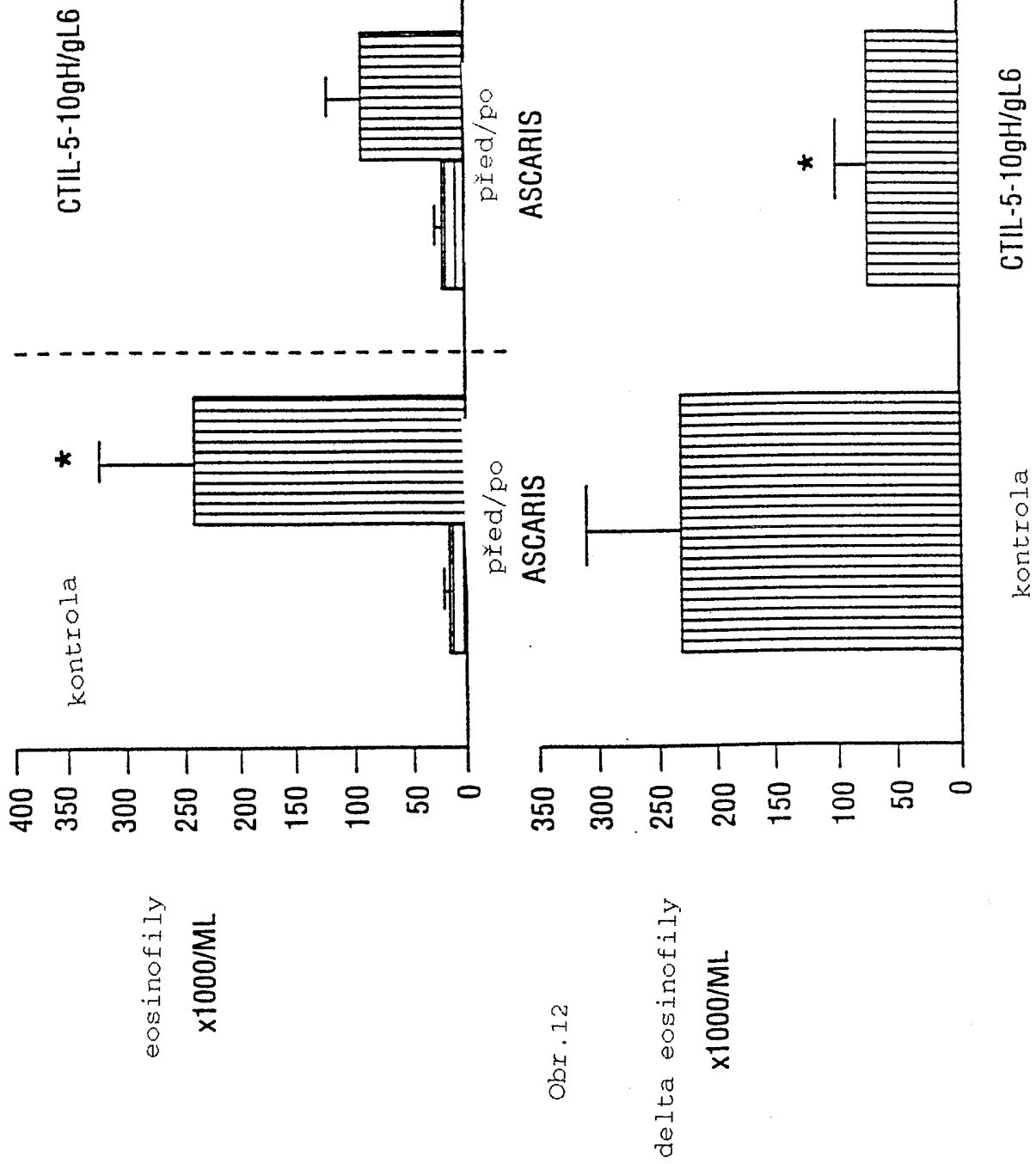
ÚRAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
17 XII 96
00500
9 2 9 7 4
č.j.

11/12

Obr. 11

OD 630-490





12/12

Obr. 12