(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

215 383 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 2734/91
(22) A bejelentés napja: 1990. 12. 21.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
8928874.0 1989. 12. 21. GB
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/GB 90/02017
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/09967

(40) A közzététel napja: 1992. 02. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2000. 03. 28.

(51) Int. Cl.[7]

C 12 P 21/08
C 12 N 15/62
C 12 N 5/10
C 12 N 15/13
A 61 K 39/395
C 07 K 16/18

(72) Feltalálók:
Adair, John Robert, High Wycombe, Buckinghamshire (GB)
Athwal, Diljeet Singh, London (GB)
Emtage, John Spencer, Marlow, Buckinghamshire (GB)

(73) Szabadalmas:
CELLTECH Ltd., Slough, Berkshire (GB)

(74) Képviselő:
DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) ## Humanizált antitest és eljárás előállítására

KIVONAT

A találmány tárgya antitestmolekula, amely meghatározott antigénre specifikus, és amely összetett nehézláncot és komplementer könnyűláncot tartalmaz. A találmány szerinti antitestmolekula jellemző vonása, hogy az összetett nehézlánc olyan változó domént tartalmaz, amely meghatározott helyeken akceptor antitest nehézlánckeret eredetű aminosavakat és donor antitest nehézlánc antigénkötő régió eredetű aminosavakat tartalmaz, és adott esetben a komplementer könnyűlánc egy összetett könnyűlánc, amely olyan változó domént tartalmaz, amely meghatározott helyeken akceptor antitest könnyűlánckeret eredetű aminosavakat és donor antitest könnyűlánc antigénkötő régió eredetű aminosavakat tartalmaz, ahol a donor antitest a meghatározott antigénre specifikus.

A találmány kiterjed a fenti antitestmolekula előállítására.

HU 215 383 B

A találmány tárgya eljárás humanizált antitestmolekulák előállítására.

A leírásban alkalmazott „humanizált antitestmolekula" kifejezés olyan molekulára vonatkozik, amely egy nem humán eredetű immunoglobulinból származó antigénkötő helyet, valamint humán eredetű immunoglobulinból származó további részeket tartalmaz. Az antigénkötő hely tipikusan olyan komplementaritásmeghatározó régiókat (Complementarity Determining Regions=CDRs) tartalmaz, amelyek meghatározzák az antitestmolekula kötőspecifikusságát, és a változó domének megfelelő keretrégióiban vannak. Minden nehéz és könnyűlánc változó doménjében három CDR (CDR1, CDR2 és CDR3) van.

A leírásban alkalmazott irodalmi hivatkozások listáját abc rendben sorszámozva a leíráshoz csatoljuk, és a szövegben a sorszámra hivatkozunk.

A régóta ismert természetes immunoglobulinok különböző enzimes hasításból származó fragmenteket, mint például a Fab, $(Fab')_2$ és Fc fragmenteket tartalmaznak. A természetes immunoglobulinok egy olyan, általában Y formájú molekulát tartalmaznak, amelynek mindkét felső karján, a vég irányában egy antigénkötő hely helyezkedik el. A szerkezet többi része, elsősorban az Y szára közvetíti az immunoglobulinok hatásfunkcióit.

A természetes immunoglobulinokat kísérletekben, diagnózisokban és kisebb mértékben gyógyászatban alkalmazzák. Ezeket az alkalmazásokat, különösen a gyógyászati felhasználást, azonban mostanáig a természetes immunoglobulinok poliklonális természete gátolta. Az immunoglobulinok gyógyszerként való potenciális alkalmazása irányában nagyon jelentős lépcsőnek tekinthető a meghatározott specifikusságú monoklonális antitestek (MAbs) előállítási eljárásának kidolgozása (1).

A MAb-ok előállítása azonban olyan hibridómákban történik, amelyek rágcsálólépsejtek és rágcsálómielomasejtek egyesülésével jönnek létre, ezért ezek többnyire rágcsálófehérjék. A humán MAb-ok termeléséről nagyon kevés irodalmi közlemény jelent meg.

Mivel a legtöbb, hozzáférhető MAb rágcsáló eredetű, az emberben természetesen antigén, és emiatt nem kívánt HAMA- (Human-Anti-Mouse-Antibody=humán antiegér antitest) válasznak nevezett immunválaszt vált ki. A rágcsáló MAb-ok emberben való alkalmazását az a tény korlátozza, hogy a MAb az emberben vagy azt teljesen eltávolító vagy hatását legalább részben csökkentő immunválaszt vált ki. A rágcsáló eredetű MAb-bal a beteg legfeljebb egy vagy néhány alkalommal kezelhető, mert a HAMA-válasz gyorsan kialakul, és a Mab-ot hatástalanná teszi, és emellett nem kívánt reakciókat vált ki. Például az OKT3 – amely egy, a T-sejt CD3-receptorkomplexben egy antigént felismerő, egér IgG2a/k MAb – alkalmazását az akut allograft elutasítás kezelésére alkalmas immunoszuppresszorként [Chatenoud és munkatársai (2) és Jeffers és munkatársai (3)] az egész világon jóváhagyták. Az ilyen és hasonló típusú MAb-ok alkalmazásakor azonban jelentős mértékű, többségében antiidiotípusú komponenst tartalmazó HAMA-válasz léphet fel. Nagyon kívánatos tehát ennek a nem kívánt HAMA-válasznak a csökkentése vagy megszüntetése, és ezáltal ezen nagyon hasznos antitestek alkalmazási területének kiszélesítése.

A nem humán MAb-ok emberekben való, kevésbé antigén alkalmazhatóságának fokozására különböző javaslatokat tettek. Ezeket általában „humanizációs" eljárásoknak nevezzük.

Ezek az eljárások általában magukban foglalják az antitestmolekula polipeptid láncait kódoló DNS-szekvenciák manipulálásához a rekombináns DNS-technológia alkalmazását.

A MAb-ok humanizálására alkalmazott korábbi eljárások magukban foglalnak egy olyan kimér antitest előállítási eljárást, amelyben egy antitest teljes változó doménjét tartalmazó antigénkötő hely egy másik antitestből származó állandó doménhez kapcsolódik. Ilyen kimerizációs eljárásokat ismertetnek a 0 120 694, 0 125 023, 0 171 496 és 0 173 497 számon közrebocsátott európai és a 86/01533 számon közrebocsátott PCT szerinti nemzetközi bejelentések. Ez utóbbiban egy olyan antitestmolekula előállítását ismertetik, amely egér MAb-ból származó változó doméneket és humán immunoglobulinból származó állandó doméneket tartalmaz. Az ilyen, humanizált kimér antitestek azonban még mindig jelentős arányú nem humán aminosavszekvenciákat, azaz teljes nem humán változó domént tartalmaznak, és ezért, különösen hosszabb idejű alkalmazáskor, kiválthatnak valamilyen HAMA-választ [Begent és munkatársai (4)].

Egy másik, a 0 239 400 számon közrebocsátott európai bejelentésben olyan eljárást ismertetnek, amelyben hosszú oligonukleotidokkal megvalósított helyspecifikus mutagenezissel egy egér MAb teljes kiegészítésmeghatározó régióit (CDRs) egy humán immunoglobulin változó doménjeinek keretébe ojtják.

A találmány a fenti eljárással előállított humanizált antitestmolekulára, azaz CDR-ojtott humanizált antitestmolekulákra vonatkozik. Az ilyen, CDR-ojtott humanizált antitestek sokkal kisebb nem humán aminosavszekvencia-tartalmuk következtében valószínűleg sokkal kisebb mértékű HAMA-választ váltanak ki, mint a humanizált kimér antitestek.

A CDR-ojtással megvalósított, legkorábbi MAb-humanizáló eljárások kivitelezését MAb-felismerő szintetikus antigénekkel, mint például az NP vagy NIP antigénekkel végezték. Olyan kísérleteket is ismertetnek azonban, amelyekben CDR-ojtással egy lizozim-felismerő egér MAb-ot és egy humán T-sejt antigénfelismerő patkány MAb-ot humanizálnak [Verhoeyen és munkatársai (5), illetőleg Riechmann és munkatársai (6)]. CDR-rel ojtott, humán T-sejt antigénfelismerő antitest előállítást ismertetnek a 89/07452 számon közrebocsátott nemzetközi bejelentésben is.

Riechmann és munkatársai (Medicial Research Conncil=Orvosi Kutatási Tanács) azt tapasztalták, hogy a CDR-régiók transzferálása [Kabat (7) és (8)] önmagában nem elegendő a CDR-ojtott termék megfelelő antigénkötő aktivitásának kialakítására. Riechmann és mun-

katársai azt tapasztalták, hogy javított antigénkötő aktivitású CDR-ojtott termék előállításához a humán szekvencia 27 helyén lévő szerincsoport megfelelő patkány fenil-alanin-csoporttá való átalakítására van szükség.

Ez a nehézlánc 27 helyzetében lévő csoport a CDR1-gyel szomszédos szerkezeti hurokban van. A nehézlánc 30 helyzetében lévő humán szerin patkánytirozinná való további változtatása eredményeként a kötőaktivitás nem sokkal jobban változik, mint ha a 27 helyzetben csak szerin–fenil-alanin átalakítást végzünk. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az összetettebb antigének felismerésére alkalmas CDR-ojtott antitestek hatásos antigénkötő aktivitásának létrehozásához szükséges lehet a CDR-régiókon kívül, elsősorban a CDR1-gyel szomszédos szerkezeti hurokban lévő csoportok megváltoztatása. A legjobb CDR-ojtott antitestek kötőaktivitása azonban még mindig kisebb volt, mint az eredeti MAb-é.

Legújabban Queen és munkatársai (9) olyan, az interleukin 2 receptorhoz kötődő humanizált antitest-előállítási eljárást ismertetnek, amelyben egy patkány MAb (anti-Tac) CDR-jeit humán immunoglobulinkerettel és állandó doménekkel kombinálják. A humán keretrégiók kiválasztása úgy történik, hogy az anti-Tac MAb-szekvenciával maximálisan homológ legyen. Emellett a CDR-ekkel vagy antigénnel valószínűleg kölcsönhatásban lévő keret aminosavainak azonosítását számítógépes modellezéssel végezték, és a humanizált antitestek ezekben a helyzeteiben egéraminosavat használtak.

Queen és munkatársai a 90/07861 számon közrebocsátott PCT szerinti nemzetközi bejelentésben a humanizált immunoglobulinokat négy kritériummal jellemzik.

Az első kritérium, hogy humán akceptorként egy olyan sajátos humán immunoglobulinkeretet kell alkalmazni, amely a humanizálandó, nem humán donor immunoglobulinnal homológ, vagy pedig a számos humán antitest közül egy együttműködő keretet kell alkalmazni.

A második kritérium, hogy ha a humán akceptorcsoport a szokásostól eltér, és a donorcsoport a keret egy specifikus csoportjánál a humán szekvenciákra tipikus, inkább a donor eredetű aminosavat, mint az akceptort alkalmazzuk.

A harmadik kritérium, hogy a CDR-ekkel közvetlen szomszédságban lévő akceptor helyett inkább a donor keret eredetű aminosavcsoportot alkalmazzuk.

A negyedik kritérium a donor aminosavcsoport abban a kerethelyzetben való alkalmazása, amelyben az aminosav egy oldalláncatomja egy háromdimenziós immunoglobulin modellben várhatóan a CDR-ek körülbelül 0,3 nm-es tartományán belül van, és képes az antigénnel vagy a humanizált immunoglobulin CDR-jeivel való kölcsönhatásra.

Azt javasolják, hogy az első kritériummal együtt vagy amellett a második, harmadik vagy negyedik kritérium önmagában vagy egymással kombinálva teljesüljön.

A 90/07861 számon közrebocsátott PCT szerinti nemzetközi bejelentésben egy olyan, egyetlen CDR-ojtott humanizált antitest-előállítási eljárást ismertetnek, amely az IL–2 receptor P55 Tac proteinre specifikus. A humanizált antitest tervezésénél a fenti négy kritérium mindegyikének kombinációját alkalmazták, és akceptorként az Eu humán antitest módosítható régiókeretet alkalmazták (7). Az így előállított humanizált antitestben a donor CDR Kabat és munkatársai (7) és (8) által meghatározott volt, és a módosítható tartománykeretekben a nehézlánc 27, 30, 48, 66, 67, 89, 91, 94, 103, 104, 105 és 107 helyzetekben és a könnyűlánc 48, 60 és 63 helyzetekben a humán akceptorcsoportok helyett egér donorcsoportokat alkalmaztak. Az így kapott humanizált anti-Tac antitest p55-re mutatott affinitása 3×10^9 mol^{-1}, ami az egér MAb-affinitás körülbelül egyharmada.

Mi tovább vizsgáltuk a CDR-ojtott és humanizált antitestmolekulák előállítási eljárását, és a változó domének keretén belül (azaz a Kabat-CDR-eken és a változó domének szerkezeti hurkán kívül) egy olyan pozícióhierarchiát azonosítottunk, amelyben a megfelelő kötőaffinitású CDR-ojtott termékek kialakításához fontos a csoportok aminosavazonossága. Ez olyan, kielégítő CDR-ojtott termékek előállítási eljárásának kidolgozását tette lehetővé, amely a donor immunoglobulin és az akceptorkeret közötti homológia mértékére való tekintet nélkül széles körben alkalmazható. Az általunk azonosított, kritikus fontosságú csoportelrendeződés nem azonos a Queen és munkatársai (9) által azonosítottakkal.

A fentieknek megfelelően a találmány egyik tárgya olyan antitestmolekula, amely meghatározott antigénre specifikus, és amely összetett nehézláncot és komplementer könnyűláncot tartalmaz. A találmány szerinti antitestmolekula jellemző vonása, hogy az összetett nehézlánc olyan változó domént tartalmaz, amely akceptor antitest nehézlánckeret eredetű aminosavakat és donor antitest nehézlánc antigénkötő régió eredetű aminosavakat tartalmaz, ahol a donor antitest a meghatározott antigénre specifikus, és ahol a Kabat-féle számozási rendszer szerint az összetett nehézláncban legalább az 5, 8, 10, 12–17, 19, 21, 22, 40, 42–44, 66, 68, 70, 74, 77, 79, 81, 83–85, 90, 92, 105, 109, 111 és 113 helyzetű aminosav akceptor eredetű, és legalább a 23, 24, 31–35, 49–58, 71, 73, 78 és 95–102 helyzetű aminosav donor eredetű.

A találmány egyik előnyös változatában az összetett nehézláncban a 26–30 és 59–65 helyzetű aminosav szintén donor eredetű.

Egy különösen előnyös változatban az összetett nehézláncban legalább egy az 1, 3 és 76 helyzetű aminosavak közül szintén donor eredetű. Az is különösen előnyös, ha az összetett nehézláncban legalább egy a 36, 94, 104, 106 és 107 helyzetű aminosavak közül szintén donor eredetű. A legelőnyösebb, ha az összetett nehézláncban legalább egy a 2, 4, 6, 38, 48, 67 és 69 helyzetű aminosavak közül szintén donor eredetű.

Az összetett nehézláncban a fentieken kívül adott esetben a 7, 9, 11, 18, 20, 25, 37, 39, 41, 45, 47, 48, 72, 75, 80, 82, 86–89, 91, 93, 103, 108, 110 és 112 helyzetű aminosav szintén donor eredetű.

A találmány tárgyát az olyan CDR-ojtott antitest termékek képezik, amelyek akceptorkeretet és donor

antigénkötő régiókat tartalmaznak. A CDR-ojtott antitestek általában a találmány tárgyát képezik. Ennek megfelelően a donor és akceptor antitestek ugyanazon fajta állatból, és akár ugyanazon antitestosztályból vagy -alosztályból származhatnak. Általánosan azonban a donor és akceptor antitestek különböző fajta állatokból származnak. A donor antitest tipikusan nem humán antitest; például egy rágcsáló MAb és az akceptor antitest egy humán antitest.

A találmány tárgyát képező CDR-ojtott antitesttermékek donor antigénkötő régiója tipikusan legalább egy donor antitest CDR-t tartalmaz. A donor antigénkötő régió általában a nehézlánc és/vagy könnyűlánc változó domének mindegyikéből legalább két, és előnyösen mind a három CDR-t tartalmazza. A CDR-ek lehetnek Kabat- és szerkezeti hurok CDR-ek vagy ezek bármilyen kombinációja. A CDR-ojtott nehézlánc változó domén antigénkötő régiók előnyösen olyan CDR-eket tartalmaznak, amelyek a CDR2-nél (55–65 csoportok) és CDR3-nál (95–100 csoportok) megegyeznek a Kabat-CDR-ekkel, és a CDR1-nél (26–35 csoportok) a Kabat- és a szerkezeti hurok CDR-ek kombinációi.

A fentiekben és a leírásban bárhol alkalmazott csoportjelölések a Kabat-féle számozással egyezőek [(7) és (8)]. Ennek megfelelően a csoportjelölések nem mindig követik az aminosavcsoportok lineáris számozását. A tényleges lineáris aminosavszekvencia az alap változó doménszerkezet szerkezeti komponense, kerete vagy CDR-je, rövidítés vagy beültetéssel való bővítés miatt kevesebb vagy több aminosavat tartalmazhat, mint a számozásnak megfelelő, szigorúan vett Kabat-csoport. Például a Queen és munkatársai (9) által ismertetett anti-Tac antitest nehézlánc módosítható régiója a CDR2, Kabat-számozás szerinti 52 csoport után egyetlen aminosavinszertet (52a), és a 82 keretcsoport után egy három aminosavas inszertet tartalmaz. A csoportok pontos Kabat-számozását egy adott antitest esetén úgy határozzuk meg, hogy az antitestszekvencia-homológ régiókat egy „standard" Kabat-számozású szekvencia mellé sorakoztatjuk.

A találmány értelmében a komplementer könnyűlánc előnyösen egy összetett könnyűlánc, amely olyan változó domént tartalmaz, amely akceptor antitest könnyűlánckeret eredetű aminosavakat és donor antitest könnyűlánc antigénkötő régió eredetű aminosavakat tartalmaz, ahol a donor antitest a meghatározott antigénre specifikus, és ahol a Kabat-féle számozási rendszer szerint az összetett könnyűláncban legalább az 5, 7–9, 11, 13–18, 20, 22, 23, 39, 41–43, 57, 59, 61, 72, 74–79, 81, 82, 84, 86, 88, 100, 104, 106 és 107 helyzetű aminosav akceptor eredetű, és legalább a 24–34, 46, 48, 50–56, 58, 71 és 89–97 helyzetű aminosav donor eredetű.

A találmány egyik előnyös változatában az összetett könnyűláncban az 1, 3 és 47 helyzetű aminosav szintén donor eredetű.

Egy különösen előnyös változatban az összetett könnyűláncban a 36, 44, 47, 85 és 87 helyzetű aminosav szintén donor eredetű. Az is különösen előnyös, ha az összetett könnyűláncban legalább egy a 2, 4, 6, 49, 62, 64–69, 98, 99, 101 és 102 helyzetű aminosavak közül szintén donor eredetű. A legelőnyösebb, ha az összetett könnyűláncban legalább egy az 1, 3, 10, 12, 21, 40, 60, 63, 70, 73, 80, 103 és 105 helyzetű aminosavak közül szintén donor eredetű.

ADR-ojtott könnyűlánc változó domén antigénkötő régiók előnyösen olyan CDR-eket tartalmaznak, amelyek a CDR1-nél (24–34 csoportok), CDR2-nél (50–65 csoportok) és CDR3-nál (89–97 csoportok) megegyeznek a Kabat-CDR-ekkel.

A találmány szerinti humanizált antitestmolekulák és láncok tartalmazhatnak:

- egy teljes antitestmolekulát, amely teljes hosszúságú nehéz- és könnyűláncokból áll;
- ezek fragmenseit, mint például Fab, $(Fab')_2$ vagy FV fragmenst;
- egy könnyűlánc vagy nehézlánc monomert vagy dimert;
- egy egyláncú antitestet, például olyan egyláncú FV-t, amelyben a nehéz és könnyűlánc változó doménrégiók peptid kapcsolócsoportokkal kapcsolódnak össze; vagy
- bármilyen más CDR-ojtott molekulát, amely az eredeti antitestdonorral megegyező tulajdonságokkal rendelkezik.

A CDR-ojtott nehéz és könnyűlánc változó doménrégiók szükség esetén egyéb antitesttartományokkal is kombinálhatók.

A találmány szerinti nehéz- vagy könnyűláncokhoz vagy humanizált antitestmolekulákhoz effektor- vagy riportermolekula is kapcsolható. Ez a molekula lehet például egy nehézfématom vagy toxinnal kelátképző makromolekula, mint például ricin, amely kovalens hídképző csoporttal kapcsolódik a lánchoz vagy molekulához. Rekombináns DNS-technológiai eljárásokkal olyan immunoglobulin molekula is előállítható, amelyben a teljes immunoglobulin molekula Fc fragmensét vagy DH3-tartományát egy funkcionális nem immunoglobulin fehérjével, mint például egy enzimmel vagy toxinmolekulával helyettesítjük vagy peptidkötéssel hozzákapcsoljuk.

Az antigénkötő régiók forrásaként alkalmazott donor antitest osztályának/típusának figyelembevételével bármilyen, megfelelő akceptor változó doménkeretet alkalmazhatunk. Az alkalmazott akceptor típusa előnyösen azonos/hasonló, mint a donor antitestosztály/típus. A keretkiválasztás előnyösen úgy történik, hogy a donor antitestszekvenciával való homológia különösen a CDR-ekhez közeli vagy ezekkel szomszédos helyeken maximális vagy optimális legyen. A találmány alkalmazásához azonban nem szükséges magas szintű donor- és akceptorszekvencia-homológia. A találmány azonban a keretcsoporthelyzetekben, amelyekben a donorcsoport fontos lehet, vagy megfelelő kötési tulajdonságokkal bíró CDR-ojtott antitestterméket kell előállítani, hierarchiát állapít meg. A CDR-ojtott termékek kötőaffinitása általában 10^5 mol^{-1}, előnyösen legalább 10^8 mol^{-1}, elsősorban 10^8–10^{12} mol^{-1}. A találmány elvileg, tekintet nélkül a szekvenciák közötti homológia mértékére, bármilyen donor- vagy akceptorantitest-kombinációhoz alkalmazható.

A találmány bármelyik, egyedi donor akceptor antitestpárhoz való alkalmazásához megfelelő előírást a következőkben részletesen ismertetjük. Humán keretként alkalmazhatunk például KOL-t, NEWM-t, REI-t, EU-t, LAY-t és POM-t [(4) és (5)]; vagy a nehézlánchoz például KOL-t és NEWM-t; a könnyűlánchoz REI-t; és mindkettőhöz EU-t, LAY-t és POM-t.

A találmány szerinti termék állandó régiótartományait is úgy választhatjuk ki, hogy figyelembe vesszük a javasolt antitestfunkciót, elsősorban az adott esetben kívánt effektorfunkciót. Az állandó régiótartományok lehetnek például humán IgA, IgE, IgG vagy IgM tartományok. Ha a humanizált antitestmolekulát gyógyászati célra szánjuk, és antitest effektorfunkciók szükségesek, elsősorban IgG humán állandó régiótartományokat, elsősorban az IgG1 és IgG2 izotípusokat alkalmazzuk. Abban az esetben, ha a humanizált antitestmolekulát gyógyászati célra szánjuk, és antitest effektorfunkciók nem szükségesek, például az egyszerű blokkoló vagy limfokin aktivitáshoz, az IgG2 és IgG4 izotípusokat alkalmazzuk.

Az antitestmolekula fennmaradó része nem szükségszerűen csak immunoglobulinokból származó fehérjeszekvenciákat tartalmaz. Szerkeszthető például egy olyan gén, amelyben egy humán immunoglobulin láncot részben kódoló DNS-szekvencia egy olyan DNS-szekvenciával egyesül, amely egy funkcionális polipeptidet, mint például egy effektort vagy riportermolekulát kódol.

A CDR-ojtott antitest nehéz és könnyűlánc, valamint az antitestmolekulatermékek előállítása előnyösen rekombináns DNS-technológiával történik.

A találmány további tárgyát képezi a CDR-ojtott nehéz és könnyűláncokat tartalmazó antitestmolekulák előállítási eljárása.

A vektorok szerkesztésére alkalmazható általános eljárások, transzfektáló eljárások és tenyésztési eljárások a szakterületen jól ismertek, és nem tartoznak a találmány oltalmi köréhez. Ilyen eljárásokat ismertetnek például a (10) és (11) irodalmi helyeken.

A donor aminosavat kódoló DNS-szekvencia előállítása valamilyen jól ismert eljárással történhet. Donor kódolószekvenciát előállíthatunk például genomiális klónozással, vagy megfelelő hibridóma sejtvonalakból cDNS-klónozással. A pozitív klónok vizsgálata az adott nehéz és könnyűlánchoz alkalmazható próbákkal történhet. PCR-klónozás is alkalmazható.

Akceptor-, például humán akceptorkódoló DNS-szekvenciák bármilyen, megfelelő eljárással előállíthatók. Az előnyös humán akceptorkereteket, mint például KOL, REI, EU és NEWM kódoló DNS-szekvenciák a megfelelő gyártóktól széles körben beszerezhetők.

A CDR-ojtott termékeket kódoló DNS-szekvenciák előállítása standard biológiai eljárásokkal történhet. Oligonukleotid-szintézissel a kívánt DNS-szekvenciák teljes egészében vagy részben előállíthatók. Alkalmazható helyspecifikus mutagenézis és polimeráz láncreakció (PCR) is. Alkalmazható oligonukleotid irányítású szintézis, például a Jones és munkatársai által ismertetett eljárás (20), és előre meglévő változó domén oligonukleotid irányítású szintézis a Verhoeyen és munkatársai által ismertetett eljárás (5) vagy a Riechmann és munkatársai által ismertetett eljárás. T4 DNS-polimeráz alkalmazásával hiányos oligonukleotid enzimfeltöltést is alkalmazhatunk; ilyen eljárást ismertetnek például Queen és munkatársai a (9) irodalmi helyen.

A CDR-ojtott nehéz és könnyűláncokat kódoló DNS-szekvenciák kifejezésére bármilyen, megfelelő gazdasejt/vektor rendszer alkalmazható. Antitest fragmentek, mint például FAb és $(FAb')_2$ fragmentek és elsősorban FV fragmensek és egyláncú antitestfragmensek, például egyláncú FV-k kifejezésére bakteriális E. coli és egyéb mikroorganizmusok alkalmazhatók. Nagyobb CDR-ojtott antitesttermékek, köztük teljes antitestmolekulák előállítására eukarióta, például emlős gazdasejt kifejezőrendszerek alkalmazhatók. Megfelelő emlős gazdasejtek a CHO sejtek és mieloma vagy hibridóma sejtvonalak.

A találmány tárgya a fentieknek megfelelően olyan eljárás rekombináns antigénkötő molekula előállítására, amely meghatározott antigénre specifikus, melynek során

1. meghatározzuk egy donor antitest, amely a meghatározott antigénre specifikus, nehézláncában található változó domén aminosavszekvenciáját,

2. meghatározzuk egy nem specifikus akceptor antitest nehézláncában található változó domén aminosavszekvenciáját,

3. egy antitestmolekulához szükséges összetett nehézláncot állítunk elő, amely akceptorkeret eredetű aminosavakat és donor antigénkötő régió eredetű aminosavakat tartalmaz, ahol a Kabat-féle számozási rendszer szerint legalább az 5, 8, 10, 12–17, 19, 21, 22, 40, 42–44, 66, 68, 70, 74, 77, 79, 81, 83–85, 90, 92, 105, 109, 111 és 113 helyzetű aminosav akceptor eredetű, és legalább a 23, 24, 31–35, 49–58, 71, 73, 78 és 95–102 helyzetű aminosav donor eredetű,

4. a 3. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

5. meghatározzuk a 4. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

6. ha az 5. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 3. lépés szerint egy nehézláncot állítunk elő, amelyben a 71, 73 és 78 helyzetű aminosav szintén donor eredetű,

7. a 6. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

8. meghatározzuk a 7. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

9. ha a 8. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 6. lépés szerint egy nehézláncot állítunk elő, amelyben a 26–30 helyzetű aminosav szintén donor eredetű,

10. a 9. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

11. meghatározzuk a 10. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

12. ha a 11. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 9. lépés szerint egy nehézláncot állítunk elő, amelyben az 1, 3 és 76 helyzetű aminosavak közül legalább egy szintén donor eredetű,

13. a 12. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

14. meghatározzuk a 13. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

15. ha a 14. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 12. lépés szerint egy nehézláncot állítunk elő, amelyben a 36, 94, 104, 106 és 107 helyzetű aminosavak közül legalább egy szintén donor eredetű,

16. a 15. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

17. meghatározzuk a 16. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

18. ha a 17. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 15. lépés szerint egy nehézláncot állítunk elő, amelyben a 2, 4, 6, 38, 48, 67 és 69 helyzetű aminosavak közül legalább egy szintén donor eredetű,

19. a 18. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő.

Előnyösen úgy járunk el, hogy további lépésként

1. meghatározzuk egy donor antitest, amely a meghatározott antigénre specifikus, könnyűláncában található változó domén aminosavszekvenciáját,

2. meghatározzuk egy nem specifikus akceptor antitest könnyűláncában található változó domén aminosavszekvenciáját,

3. egy antitestmolekulához szükséges összetett könnyűláncot állítunk elő, amely akceptorkeret eredetű aminosavakat és donor antigénkötő régió eredetű aminosavakat tartalmaz, ahol a Kabat-féle számozási rendszer szerint legalább az 5, 7–9, 11, 13–18, 20, 22, 23, 39, 41–43, 57, 59, 61, 72, 74–79, 81, 82, 84, 86, 88, 100, 104, 106–109 helyzetű aminosav akceptor eredetű, és legalább a 24–34, 46, 48, 50–56, 58, 71 és 89–97 helyzetű aminosav donor eredetű,

4. a 3. lépés szerint előállított könnyűláncot egy komplementer nehézlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

5. meghatározzuk a 4. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

6. ha az 5. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 3. lépés szerint egy könnyűláncot állítunk elő, amelyben az 1, 2, 3 és 47 helyzetű aminosav szintén donor eredetű,

7. a 6. lépés szerint előállított könnyűláncot egy komplementer nehézlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

8. meghatározzuk a 7. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

9. ha a 8. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 6. lépés szerint egy könnyűláncot állítunk elő, amelyben a 36, 44, 47, 85 és 87 helyzetű aminosav szintén donor eredetű,

10. a 9. lépés szerint előállított könnyűláncot egy komplementer nehézlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

11. meghatározzuk a 10. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

12. ha a 11. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 9. lépés szerint egy könnyűláncot állítunk elő, amelyben a 2, 4, 6, 49, 62, 64–69, 98, 99 és 101 helyzetű aminosavak közül legalább egy szintén donor eredetű,

13. a 12. lépés szerint előállított könnyűláncot egy komplementer nehézlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő.

A CDR-ojtott termék tartalmazhat csak nehéz vagy csak könnyűlánc eredetű polipeptidet; ebben az esetben a gazdasejtek transzfektálására csak nehézlánc vagy csak könnyűlánc polipeptidet alkalmazunk.

A nehéz vagy könnyűláncokat egyaránt tartalmazó termékek előállításához a sejtvonalat olyan két vektorral transzfektálhatjuk, amelyek közül az egyik egy könnyűlánc eredetű polipeptidet kódoló operont, a másik egy nehézlánc eredetű polipeptidet kódoló operont tartalmaz. A vektorok, a kódolószekvenciák és a szelektálható markerek kivételével, azonosak, hogy a polipeptidek mindegyike a lehető legnagyobb mértékben legyen kifejezve. Alkalmazhatunk egyetlen, a könnyű és nehézlánc eredetű polipeptideket egyaránt kódoló vektort is.

A könnyű és nehézláncokat kódoló szekvenciákban lévő DNS tartalmazhat cDNS-t vagy genomiális DNS-t vagy mindkettőt.

A találmány bármilyen megfelelő tulajdonságokkal bíró antitestekhez alkalmazható. A találmányt azonban előnyösen in vitro gyógyászatban vagy diagnózisban alkalmazható nem humán antitestek humanizálására alkalmazzuk. Ennek megfelelően az antitestek olyan helyspecifikus antitestek, mint például tumorspecifikus antitestek lehetnek, amelyek in vitro terápiában vagy diagnózisban, például tumorleképzésben alkalmazhatók. Sejtfelület-specifikus antitestek például az anti-T-sejt antitestek, mint például az anti-CD3 és CD4 és adhéziós molekulák, mint például a CR3, ICAM és ELAM. Az antitestek lehetnek interleukinokra (limfokin, növekedési és stimuláló faktor), hormonokra és egyéb biológiailag aktív hatóanyagokra vagy ezek bármelyikének receptoraira specifikusak. Így például specifikusak lehetnek az α–, β–, gamma-, vagy δ–interleukinokra, az IL1-re, IL2-re, IL3-ra vagy IL4-re, a TNF-re, GCSF-re, GMCSF-re, EPO-ra, hGH-ra vagy inzulinra.

A találmány további tárgyát képezik az olyan terápiás vagy diagnosztikai készítmények, amelyek találmány szerinti CDR-ojtott antitestmolekulát tartalmaznak gyógyszerészeti hordozóanyag, hígítóanyag vagy segédanyag mellett.

A találmány szerinti CDR-ojtott antitest nehéz vagy könnyűláncok előállítását a következőkben ismertetésre kerülő előírás és megfontolások segítségével végezhet-

jük. Az előírás és a megfontolások a találmány általános körét nem korlátozzák.

Előírás

Legelőször a donor antitest nehéz és könnyűlánc változó doménrégiók nehéz és könnyűlánc kódoló DNS-eit kell szekvenálni az aminosavszekvenciák meghatározására.

Az is lényeges, hogy ismert aminosavszekvenciák megfelelő akceptorának nehéz és könnyűlánc változó doménrégióit válasszuk. A CDR-ojtott láncot ezután az akceptorszekvencia alapján tervezzük. Fontos szempont, hogy bizonyos esetekben a donor és akceptor eredetű aminosavak egy adott helyzetben azonosak lehetnek, és ezért akceptorkeretbe tartozó aminosavak megváltoztatása nem szükséges.

1. Az első lépcsőben a CDR-ekben a donor eredetű aminosavakat az akceptor eredetű aminosavakkal helyettesítjük.

Erre a célra a CDR-eket a következőképpen definiáljuk:

Nehézlánc:	CDR1:	csoportok:	26–35
	CDR2:	csoportok:	50–65
	CDR3:	csoportok:	95–102
könnyűlánc:	CDR1:	csoportok:	24–34
	CDR2:	csoportok:	50–56
	CDR3:	csoportok:	89–93.

A keret azon helyzeteit, amelyeknél a donorcsoportokat az akceptorokra helyettesítjük, úgy választjuk ki, hogy először a nehézláncot, majd a könnyűláncot vesszük figyelembe.

2. *Nehézlánc*

2.1 A nehézlánc 23, 24, 49, 71, 73 és 78 helyzeteinek mindegyikében vagy a 23, 24 és 49 helyzetek mindegyikében választunk donorcsoportokat (a 71, 73 és 78 helyzetek mindig vagy teljes egészében donor- vagy teljes egészében akceptorcsoportok).

2.2 Ellenőrizzük, hogy a következő helyzetekben a donor- és akceptorszekvenciák aminosavja azonos-e, ha nem az, előnyösen a donort választjuk: 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94, 103, 104, 106 és 107.

2.3 Az affinitás további optimalizálásához a következő egy, néhány vagy valamelyik helyzetben vegyük fontolóra donorcsoportok választását.

i) 1, 3;
ii) 72, 76;
iii) ha a 48 a donor- és akceptorszekvenciák között különbözik, vegyük figyelembe a 69-et;
iv) ha a 48-ban donorcsoportot választottunk, vegyük figyelembe a 38 és 46 helyzeteket;
v) ha a 69-ben donorcsoportot választottunk, vegyük figyelembe a 80-at és azután a 20-at;
vi) 67;
vii) ha a 67-ben donorcsoportot választottunk, vegyük figyelembe a 82-t, majd a 18-at;
viii) 91;
ix) 88; és
x) 9, 11, 41, 87, 108, 110, 112.

3. *könnyűlánc*

3.1 Válasszunk donort a 46, 48, 58 és 71 helyzetekben.

3.2 Ellenőrizzük, hogy a következő helyzetekben a donor és akceptor aminosavszekvenciái azonosak-e, ha nem, válasszunk donort: 2, 4, 6, 35, 38, 44, 47, 49, 62, 64–69, 85, 87, 98, 99, 101 és 102.

3.3 Az affinitás további optimalizálásához a következő, egy, néhány vagy valamelyik helyzetben vegyük fontolóra a donorcsoportok választását:

i) 1, 3;
ii) 63;
iii) 60, ha a 60 és 50 potenciális sóhídképzésre képes;
iv) 70, ha a 70 és 24 potenciális sóhídképzésre képes;
v) 73 és 21, ha a 47 a donor és akceptor között különböző;
vi) 37 és 45, ha a 47 a donor és akceptor között különböző; és
vii) 10, 12, 40, 80, 103, 105.

Megfontolások

Valamely antitestkötő hely egy másik akceptorkeretbe való transzferálásához számos tényezőt kell figyelembe venni.

1. *A CDR-ek terjedelme*

A CDR-eket (Complementary Determining Regions=komplementáris meghatározó régiók) WU és Kabat [(4) és (5)] az antitest változó domének különböző régiói változékonyságának elemzésével határozta meg. Tartományonként három régiót határoztak meg. A könnyűláncban a 24–34, 50–56 és 89–97 Kabat szerinti számozású (4) régiót (köztük az Eu-t) és a nehézláncban a 31–35, 50–65 és 95–102 régiót adták meg.

Amikor egy antitest szerkezete ismertté válik, az is nyilvánvaló lesz, hogy ezek a CDR-régiók a könnyű és nehéz változó domének β-hengerkeretétől terjedő fő hurokrégióban összhangban vannak. A H1-nél, a H2-nél és az L2-nél azonban különbség van, ami abban mutatkozik, hogy a hurok rendre a 26–32, az 52–56 és az 50–53 helyzetekben van. A H1 kivételével azonban a CDR-régiók körülveszik a hurokrégiókat, és belenyúlnak a β-szálkeretbe. A H1-ben a 26 csoport többnyire szerin és a 27 fenil-alanin vagy tirozin, és a 29 csoport többnyire fenil-alanin. Az oldószernek kitett felületi 28 és 30 csoportok valószínű részt vesznek az antigén megkötésében. A H1 CDR óvatos meghatározása ennek megfelelően az lehet, hogy magában foglalja a 26–35 csoportokat azért, hogy a hurokrégiót és a 33–35 csoportokat is tartalmazza.

Érdemes megjegyezni Riechmann és munkatársai (3) munkáját, akik a CDR–H1-hez a 31–35 választást alkalmazták. Hatékony antigénkötés eléréséhez a donor (patkány) antitestből a 27 csoportot is be kell építeni.

2. *Az antigénkötésben részt vevő, nem CDR csoportok*

A hozzáférhető röntgensugár-felvételeken meglévő szerkezetekből számos olyan csoportot azonosítottunk, amelyek tiszta antigénkötő hatásúak lehetnek, és a kísérleti célokra alkalmazhatók. Ezek a csoportok különböző osztályokba sorolhatók.

2.1 *CDR-közeli felületi csoportok* [az összes számozás azonos a Kabat és munkatársai által megadottakkal (5)].

2.1.1 Nehézlánc – kulcscsoportok: 23, 71 és 73. A kisebb mértékben részt vevő egyéb csoportok lehetnek: 1, 3 és 76. A 25 csoportot általában megőrzik, de ha probléma van, egér- (murine) csoportot kell alkalmazni.

2.1.2 Könnyűlánc – számos, CDR-hez közeli csoportot, például a 63, 65, 67 és 69 csoportot konzerválnak. Ha a könnyűlánc felületi csoportok egyikét sem konzerválják, valószínű, hogy ezek hatása lesz az elsődleges. Ha az egércsoport jelenléte ezekben a helyzetekben szokatlan, a valószínű részvétel közelebbi elemzése megoldás lehet. A kötésben az 1 és 3 és a 60 és 70 csoportok részvételét is figyelembe vehetjük, ha ezekben és az 54 és 24 helyzetben, azaz a 60+54 és 70+24 helyzetben lévő csoportok potenciálisan sóhídképzők.

2.2 *CDR-ekhez közel lévő burkolócsoportok*

2.2.1 Nehézlánc – kulcscsoportok: 24, 49 és 78. További kulcscsoport lenne a 36, ha nem triptofán; a 94, ha nem arginin; a 104 és 106, ha nem glicin; és a 107, ha nem treonin. A nehézlánc stabil burkolásában részt vevő, és emiatt affinitáskövető, további csoportok a 2, 4, 6, 38, 46, 47 és 69. A 67 és 63 CDR-csoporttal szemben burkol, ez a pár vagy mindkettő egér vagy mindkettő humán eredetű. Végül a hosszabb tartományból ezt a régiót burkoló csoportok a 18, 20, 80, 82 és 86. A 82 a 67 ellen, a 18 a 82 ellen burkol. A 80 a 69 ellen, a 20 a 80 ellen burkol. A 86 a 38 és 46 csoportokkal H-kötéshálót képez. Az egér-humán különböző kapcsolatok nagy része, például a Leu–Ile kisebbségben jelenik meg, de a pontos burkolást kismértékben befolyásolhatja, és beolvashatja a CDR-ek megváltozott helyzetébe.

2.2.2 Könnyűlánc – kulcscsoportok: 48, 58 és 71. További kulcscsoport lehet a 6, ha nem glutamin, a 35, ha nem triptofán, a 62, ha nem fenil-alanin vagy tirozin, a 64, 66, 68, 99 és 101, ha nem glicin, és a 102, ha nem treonin. További részt vevő csoport lehet a 2, 4, 37, 45 és 47 csoport. Végül a hosszabb távolságból a burkolásban részt vevő, kisebbségi csoport a 73, 21 és 19.

2.3 A nehéz és könnyűláncok közötti változtatható tartomány natúr felületen lévő csoportok. A nem CDR felületi csoportokat mind a könnyű, mind a nehézláncokban konzerváljuk. Ha a konzervált csoportot egy eltérő karakterű, például méretű vagy töltésű csoporttal helyettesítjük, megfontolandó az egércsoportként való megtartása.

2.3.1 Nehézlánc – nem szükséges figyelembe venni a 37 csoportot, ha nem valin, de nagyobb mértékű oldallánc térfogata, töltése vagy kapacitása van, továbbá a 39 csoportot, ha nem glutamin, a 45-öt, ha nem leucin, a 47-et, ha nem triptofán, a 91-et, ha nem fenil-alanin, vagy tirozin, a 93-at, ha nem alanin és a 103-at, ha nem triptofán. A 89 csoport szintén a találkozási felületen van, de nem olyan helyzetben, ahol az oldallánc nagy hatású lehetne.

2.3.2 Könnyűlánc – nem szükséges figyelembe venni a 36-ot, ha nem tirozin, a 38-at, ha nem glutamin, a 44-et, ha nem prolin, a 46-ot, 49-et, ha nem tirozin, a 85-öt és 87-et, ha nem tirozin és a 98-at, ha nem fenil-alanin.

2.4 *Változó-állandó régiók határfelülete*

A változó és az állandó régiók közötti könyökszög a változó régió állandó régióval szembeni kulcscsoportokkal való burkolásának változásával megváltozhat, és ez megváltoztathatja a V_L és V_H egymáshoz viszonyított helyzetét. Emiatt nem számít, hogy a csoportok valószínűleg az állandó régióval érintkeznek. A nehézlánc felületi csoportok potenciálisan a módosítható régióval érintkeznek, és egér és humán antitestek között konzerválódnak, emiatt a változó régióval érintkező csoportok a V–C kölcsönhatást befolyásolhatják. A könnyűláncban az állandó régió számos érintkezési pontján megtalálható aminosavak változnak, és a V–C régiók nincsenek olyan szoros közelségben, mint a nehézláncban. Emiatt a könnyűlánc V–C határfelületi hatások kismértékűek.

2.4.1 Nehézlánc – érintkező csoportok a 7, 11, 41, 87, 108, 110 és 112.

2.4.2 Könnyűlánc – a könnyűláncban potenciálisan érintkező csoportok a 10, 12, 40, 80, 83, 103 és 105.

A fentiekben ismertetett „előírás" számos, különböző antitest CDR-ojtással kapcsolatos gyakorlati tapasztalatainkon alapul.

A mellékelt ábrák rövid ismertetése:

Az 1. ábrán az OKT3 könnyűlánc DNS- és aminosavszekvenciákat mutatjuk be.

A 2. ábrán az OKT3 nehézlánc DNS- és aminosavszekvenciákat mutatjuk be.

A 3. ábrán az OKT3 könnyűlánc változó régió aminosavszekvenciáját viszonyítjuk a humán REI antitest könnyű változó régiójához.

A 4. ábrán az OKT3 nehézlánc régió aminosavszekvenciát viszonyítjuk a humán KOL antitest nehézlánc régiójához.

Az 5. ábrán az OKT3, KOL és különböző, megfelelő CDR-ojtványok nehézlánc változó régió aminosavszekvenciáját mutatjuk be.

A 6. ábrán az OKT3, REI és a különböző, megfelelő CDR-ojtványok könnyűlánc változó régió aminosavszekvenciáit mutatjuk be.

A 7. ábrán a különböző ojtott OKT3 antitest kötési kísérleti eredményeit mutatjuk be.

A 8. ábrán a különböző ojtott OKT3 antitestek blokkolási kísérleti eredményeit mutatjuk be.

A 9. ábrán a fentihez hasonló blokkolási kísérlet eredményeit mutatjuk be.

A 10. ábrán a fentiekhez hasonló kötési és blokkolási kísérlet eredményeit mutatjuk be.

A 11. ábrán a fentiekhez hasonló kötési és blokkolási további kísérlet eredményeit mutatjuk be.

A 12. ábrán olyan, kompetitív kísérleti eredményeket mutatunk be, amelyeket minimálisan ojtott OKT3 antitest és az OKT3 egér referenciastandard összehasonlításával kaptunk.

A 13. ábrán a fentiekhez hasonló olyan, kompetitív kísérleti eredményeket mutatunk be, amelyeket egy teljesen ojtott OKT3 antitest és az egér referenciastandard összehasonlításával kaptunk.

A találmány részletes ismertetése

1. példa

OKT3 CDR-ojtás

Anyag és eljárások

1. *Kiindulási sejtek*

OKT3 antitesttermelő hibridómasejteket az Ortho-eljárással állítottunk elő (magrészlet: 4882.1), és glutaminnal és 5%-os magzati borjúszérummal kiegészített, antibiotikum-mentes Dulbecco-féle módosított Eagles-közegben (Dulbecco's Modified Eagles Medium=DMEM) növesztettük, két részre osztottuk; mindkét részből értékelési célú túlnövesztett felülúszót és RNS-extrahálásra sejteket állítottunk elő. A túlnövesztett felülúszó 250 μg/ml egér IgG2a/kappa antitestet tartalmazott. A felülúszó egér lambda könnyűláncra és IgG1, IgG26, IgG3, IgA és IgM nehézláncra negatív volt. 20 ml felülúszóból megállapítottuk, hogy a jelenlévő antitest az OKT3.

2. *Molekuláris biológiai eljárások*

A molekuláris biológiai eljárásokat a bizonyos esetekben kismértékben módosított, Maniatis és munkatársai által ismertetett eljárással (9) végeztük. A DNS-szekvenálást a Sanger és munkatársai (11) által és az Amersham International Plc szekvenálási kézikönyvben ismertetett eljárásokkal folytattuk le. A helyspecifikus mutagenézist a Kramer és munkatársai által és az Anglia Biotechnology Ltd. kézikönyvben ismertetett eljárással végeztük. A COS sejtkifejezési és anyagcsere jelölési kísérleteket a Whittle és munkatársai által ismertetett eljárással (13) folytattuk le.

3. *Kutatási kísérletek*

3.1 *Összeállítási kísérletek*

Az összeállítási kísérleteket transzfektált COS sejtekből származó felülúszóval végeztük a jelen lévő, sértetlen IgG-mennyiség meghatározására.

3.1.1 Egér OKT3 génekkel transzfektált COS sejtek

A COS sejt felülúszóban lévő sértetlen egérsejtek ELISA-elrendezését a következőképpen alakítottuk ki.

Egy 96 lyukú mikrolemezt $F(ab')_2$ kecske antiegér IgGFc-vel vontunk be. A lemezeket vízben mostuk, és a hozzáadott mintákat 1 órán át szobahőmérsékleten tartottuk. A lemezeket mostuk, és $F(ab')_2$ kecske antiegér $IgGF(ab')_2$-t (HRPO konjugált) adtunk hozzá. A reakciót megjelenítő anyaggal láthatóvá tettük. Standardként egy egér IgG2a mieloma UPC10-t alkalmaztunk.

3.1.2 Kimér vagy CDR-ojtott OKT3 génekkel transzfrektált COS és CHO sejtek

A COS sejt felülúszóban lévő kimér vagy CDR-ojtott antitestek ELISA-elrendezését a következőképpen alakítottuk ki.

Egy 96 lyukú mikrolemezt $F(ab')_2$ kecske antihumán IgGFc-vel vontuk be. A lemezeket mostuk, a mintákat hozzáadtuk, és 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A lemezeket mostuk, és monoklonális egér antihumán kappa-láncot adtunk hozzá, majd 1 órán át, szobahőmérsékleten tartottuk. A lemezeket mostuk, és $F(ab')_2$ kecske antiegér IgGFc-t (HRPO-konjugált) adtunk hozzá. A reakciót enzim hozzáadással tettük láthatóvá.

Standardként B72.3 (IgG4) (13) alkalmaztunk. A monoklonális anti-kappa-lánc ebben az elrendezésben való alkalmazása a kimér standardról leolvasható ojtott antitestek előállítását teszi lehetővé.

3.2 *Antigénkötés-aktivitás meghatározása*

Az OKT3 antigén CD3 pozitív sejtekre mutatott, közvetlen elemzéssel mért aktivitását COS sejtfelülúszókból nyert anyaggal mértük. Az eljárást a következőképpen folytattuk le.

Tenyészetben karbantartottunk HUT 78 sejteket (humán T-sejtvonal, CD3 pozitív). A HUT 78 sejtek monorétegeit poli-L-lizin és glutáraldehid alkalmazásával 96 lyukú ELISA-lemezekre preparáltuk. A monorétegekhez hozzáadtuk a mintákat, és 1 órán át szobahőmérsékleten tartottuk. A lemezeket PBS-ben enyhén mostuk. A humanizált vagy egérmintákhoz megfelelő $F(ab')_2$ kecske antihumán IgGFc (HRPO-konjugált) vagy $F(ab')_2$ kecske antiegér IgGFc-t (HRPO-konjugált) adtunk hozzá. A reakciót megjelenítő anyaggal láthatóvá tettük. A sejtbázisú mérés negatív kontrolljaként kimér B72.3-t alkalmaztunk. Pozitív kontrollként egér Orthomune OKT3-t, és, ha hozzáférhető volt, kimér OKT3-t alkalmaztunk. Ezt az elemzést nehezen tudtuk lefolytatni, ezért egy érzékenyebb és könnyebben kivitelezhető CDR-ojtott OKT3-kísérletet is elvégeztünk.

Ebben a kísérletben COS sejtek által termelt CDRF-ojtott OKT3 CD3-pozitív HPB–ALL (humán perifériás vérakut limfocitikus leukémia) sejtvonalhoz való kötőképességét vizsgáltuk. Azt is megvizsgáltuk, hogy mennyire képesek az egér OKT3 ezekhez a sejtekhez való kötésének blokkolására.

A kötésvizsgálatot a következő eljárással folytattuk le.

Szövettenyészetből HPB–ALL sejteket gyűjtöttünk. A sejteket különböző vizsgált antitest, pozitív kontroll antitest- vagy negatív kontroll antitesthígításokkal 4 °C-on 1 órán át inkubáltuk. A sejteket mégegyszer mostuk, majd 4 °C-on, 1 órán át, FITC-jelzett kecske antihumán IgG-vel (Fc-specifikus, egérabszorbeált) inkubáltuk. A sejteket kétszer mostuk, és citofluorográfiásan elemeztük. A közvetlen kötés pozitív kontrolljaként kimér OKT3-t alkalmaztunk. A sejteket hamis transzfektált COS sejt felülúszóval, majd negatív kontrollal előállított FITC-jelölt kecske antihumán IgG-vel inkubáltuk. A CDR-ojtott OKT3-t az egér OKT3 kötésblokkoló képességének vizsgálatához 4 °C-on különböző vizsgáló és kontroll antitesthígításokkal inkubáltuk 1 órán át. Az elegyhez meghatározott telítési mennyiségű FITC OKT3-t adtunk. A mintákat 4 °C-on, 1 órán át inkubáltuk, kétszer mostuk, és citofluorográfiásan elemeztük. A maximális kötés meghatározásához pozitív kontrollként FITC-jelzett OKT3-t alkalmaztunk. Negatív kontrollként adott esetben hamis transzfektált sejt felülúszóval együtt alkalmazott, nem foltos sejteket alkalmaztunk. Először a kimér OKT3 nehézlánccal kombinációban a CDR-ojtott OKT3 könnyűlánc CD3-pozitiv sejtekhez való kötőképességét és az egér OKT3 kötésblokkoló képességét vizsgáltuk. A kimér OKT3 nehézlánc az egér OKT3 változó régióból és a humán IgG4 állandó régióból épül fel. A kimér nehézlánc gén a CDR-ojtott gének kifejezésére alkalmazott vektorban kerül ki-

fejezésre. A CDR-ojtott könnyűlánckifejező vektort és a kimér nehézlánckifejező vektort COS sejtekbe kotranszfektáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a teljesen kimér OKT3 antitest (kimér könnyűlánc és kimér nehéz lánc) teljesen képes a CD3-hoz való kötődésre, és az egér OKT3 ezekhez a sejtekhez való kötődésének blokkolására.

3.3 *Relatív kötőaffinitás meghatározása*

A CDR-ojtott anti-CD3 monoklonális antitestek relatív kötőaffinitását kompetitív kötéselemzéssel határoztuk meg (6). CD3 antigénforrásként a HPB–ALL humán T-sejtvonalat és nyomjelző antitestként ismert kötőaffinitású fluoreszceinkonjugált egér OKT3-t (F1–OKT3) alkalmaztunk. Az F1–OKT3 nyomjelző antitest kötőaffinitását közvetlen kötéselemzéssel határoztuk meg úgy, hogy az F1–OKT3-t növekvő mennyiségben 5% magzati borjúszérummal kiegészített HPB–ALL PBS-oldattal (5×10^5) 60 percen át, 4 °C-on inkubáltuk. A sejteket mostuk, és a fluoreszcenciaintenzitást kvantitatív mikrogyöngystandardokkal kalibrált FASC-can áramlásos citométerrel (Flow Cytometry Standards, Research Triangle Park, NC) mértük. A fluoreszcenciaintenzitás/antitestmolekula (F/p) aránymeghatározást előre meghatározott számú egér IgG antitestkötő helyet tartalmazó mikrogyöngyökkel (egyszerű, Flow Cytometry Standard sejtgyöngyök) végeztük. Az F/p számot úgy kapjuk, hogy az F1–OKT3-mal telített gyöngyök fluoreszcenciaintenzitását osztjuk a gyöngyönkénti kötőhelyek számával. A kötött és szabad F1–OKT3 mennyiségét a sejtenkénti átlagos fluoreszcenciaintenzitásról számoljuk, és a kötött/szabad értékeket a kötött antitestek mólszáma függvényében ábrázoljuk. A kötésaffinitás-meghatározást lineáris illesztéssel (az abszolút meredekséggel) végeztük.

A kompetitív kötéshez egy közepes telítési mennyiségű F1–OKT3-hoz növekvő mennyiségű antitestet adtunk, és 5% magzati borjúszérummal kiegészített, 200 ml PBS-ben 5×10^5 HPB–ALL-t tartalmazó elegyben 4 °C-on, 60 percig inkubáltuk. A sejtek fluoreszcens intenzitását kvantitatív mikrogyöngystandardokkal kalibrált FACS-can áramlásos citométerrel mértük. Kiszámoltuk a kötött és szabad F1–OKT3 koncentrációkat. A kompetitív antitestek affinitását a

$$[X]-[OKT3]=(1/Kx)-(1/Ka)$$

egyenletből számoltuk. Az egyenletben az egér OKT3 affinitás

Kx jelentése az X kompetitoraffinitás,

[] jelentése az a kompetitor antitest-koncentráció, amelynél a kötött/szabad érték R/2, és

R jelentése a maximális kötött/szabad érték.

4. *cDNS-könyvtár szerkesztés*

4.1 *mRNS-előállítás és cDNS-szintézis*

OKT3-termelő sejteket növesztettünk a fentiekben ismertetett eljárással, begyűjtöttünk $1{,}2 \times 10^9$ sejtet, és guanidinium/LiCl extrakciós eljárással mRNS-t extraháltunk. Oligo–dT-ből a teljes hosszúságú cDNS-előállításhoz először cDNS-t állítottunk elő. A cDNS-t metileztük, és a klónozáshoz EcoRI kapcsolócsoportokat adtunk hozzá.

4.2 *Könyvtárszerkesztés*

A cDNS-könyvtárat EcoRI-gyel vágott pSP65 vektor DNS-sé ligáltuk, és borjúbél-foszfatázzal (EcoR1/CIP) az 5' foszfátot eltávolítottuk. A ligálást a nagy transzformációs hatékonyságú Escherichia coli (E. coli) HB101 transzformálására alkalmazzuk. cDNS-könyvtárat készítettünk. A könnyűlánchoz 3600 kolóniát, a nehézlánchoz 10 000 kolóniát szkrineltünk.

5. *Szkrinelés*

A nehéz- vagy könnyűláncpróbákra pozitív E. coli kolóniákat oligonukleotid szkrineléssel, a következő oligonukleotidok alkalmazásával azonosítottuk:

– a könnyűláncra az

5'TCCAGATGTTAACTGCTCAC, amely egy, az egér kappa állandó tartományban lévő szekvenciával komplementer; és

– a nehézláncra az

5'CAGGGGCCAGTGGATGGATAGAC, amely egy, az egér IgG2 állandó CH1 tartományrégióban lévő szekvenciával komplementer.

12 könnyűlánc és 9 nehézlánc klónt azonosítottuk, és ezeket második szkrinelésnek vetettük alá. A második szkrinelésből kapott pozitív klónok növesztésével DNS-t állítottunk elő. A géninszertek méretét gélelektroforézissel mértük, és a teljes hosszúságú DNS befogadására képes méretű inszerteket DNS-szekvenálásra M13-má szubklónoztuk.

6. *DNS-szekvenálás*

Az M13-ban négy méretcsoportba sorolható könnyű és nehézláncot képviselő klónokat kaptunk. Előállítottuk az 5' nem leolvasott régió, a szignálszekvencia, a változó régió és a teljes hosszúságú cDNS 3' nem leolvasott régió DNS-szekvenciákat (1a. és 2a. ábrák), és várhatóan a megfelelő aminosavak képződnek (1b. és 2b. ábrák).

Az 1a. ábrán a nem leolvasott régiókat nagybetűvel jelöltük, és mindkét ábrán a szignálszekvenciákat húzzuk alá.

7. *cDNS kifejező vektor szerkesztése*

A sejttechnológiai kifejező vektorok alapja a PEEG4CMV-plazmid (14). A humán Cytomegalovirus (4CMV) fő közbülső korai promoter/fokozó után a kifejezendő gén inszertálásához egy polilinkert (polikapcsolót) ültettünk be. A transzfektált eukarióta sejtekben lévő plazmid szelektálására szolgáló markergéneket BamHI kazettákként a PEEG4CMV egyetlen BamHI helyére ültettük be; például a neomarkerrel a pEEG4CMV neo-t állítunk elő. A neo- és gpt-markerek szóban forgó génbeültetés előtti beültetése szokásos eljárás, amelyben a kazettában lévő belső EcoRI helyek jelenléte miatt a GS-markert ültetjük be utoljára. A szelektálható markereket az utolsó SV40-promoterből fejezzük ki, amely ismét egy replikációt indít, és így a vektorok a COS sejt tranziens kifejezési rendszerben kifejezésre alkalmazhatók.

Az egérszekvenciák a fentiekben EcoRI fragmensként ismertetett M13-bázisú vektorokból származnak, és/vagy a nehézlánc pEEG–4CMV-neo vagy a könnyűlánc EEGk4CMV-gpt helyeken kerülnek kifejezésre, és így pJA136, illetőleg pJA135 vektorok képződnek.

8. *cDNS COS sejtekben való kifejezése*

A pJA135 és pJA136 plazmidokat COS sejtekbe kotranszfektáltuk, és a tranziens kifejezési kísérletből származó felülúszó olyan összeállítású antitestet tartalmaz, amely limfocitákban gazdag T-sejthez kötődik. A ^{35}S metionin alkalmazásával lefolytatott jelzéskísérlet a nehéz és hosszú láncok kifejezését és összeszerkesztését mutatta.

9. *Kimér gén szerkesztése*

A kimér gén szerkesztését a fentiekben ismertetett stratégia alapján végeztük [Whittle és munkatársai (13)]. A változó doménszekvencia 3' vég közelében egy restrikciós helyet azonosítottunk, és a fennmaradó egér változó domént kódoló oligonukleotid adapterkapcsolásra használtuk; és egy megfelelő restrikciós helyet azonosítottunk a kiválasztott állandó domén kapcsolására.

9.1 *Könnyűláncgén szerkesztése*

Olyan egér könnyűlánc cDNS-szekvenciát állítottunk elő, amely a változó régió 3' közelében egy AvaI-helyet tartalmaz (1a. ábra). A változó régiószekvencia nagyobb részét 396 bp EcoRI–AvaI fragmensként izoláltuk. Az AvaI-hely változó régió fennmaradó 3' része helyett egy oligonukleotid adaptert terveztünk, amely magába foglalja a humán állandó régió 5' csoportot, és egy olyan magában álló NarI helyet tartalmaz, amelyet korábban építettünk be az állandó régióba.

A kapcsolócsoport beültetéshez egy HindIII helyet ültettünk be markerként.

A kapcsolócsoportot a V_L fragmenthez ligáltuk, és a ligáló elegyből tisztítással elválasztottuk a 413 bp EcoRI–NarI adaptált fragmenst. Az állandó régiót egy M13 NW361 klónból izoláltuk NorI–BamHI fragmensként, és egy háromutas reakcióban a DNS változó régióval egy EcoRI/BamHI/ClPpSP65 kezelt vektorba ligáltuk, és így Ja143 plazmidot kaptunk. A klónokat E. coliba való transzformálással elválasztottuk, és a kapcsoló és keresztező szekvenciákat a HindIII hely jelenlétével és DNS-szekvenálással megerősítettük.

9.2 *Könnyűláncgén szerkesztése*

Az első kimér könnyűláncgén szerkesztése egy egér és egy humán aminosavszekvencia változó-állandó régió kapcsolódással létrejövő egyesülésével jön létre. Az OKT3 könnyűlánc esetén a kimér kereszteződésnél lévő aminosavak a következők:

.....Leu-Glu-Ile-Asn-Arg/ -/Thr-Val-Ala -Ala
változtatható konstans

Ezzel a szekvenciaelrendeződéssel a V–C kereszteződésnél egy, az aszparaginhoz (Asn) kapcsolt (N-kapcsolt) glikozilációhoz alkalmas potenciális helyet ültetünk be.

Így a kimér könnyűlánc oligonukleotid adapter egy olyan, második változatát terveztük meg, amelyben a humán állandó régió első aminosavját, a treonint (Thr) az egér állandó régió ekvivalens aminosavjával, az alaninnal (Ala) helyettesítettük.

A két kimér könnyűláncgén megkülönböztetéséhez ebbe az adapterbe nem építettünk be belső HindIII helyet.

A változó régiófragmenst 376 bp EcoRI–AvaI fragmensként izoláltuk. Az oligonukleotid kapcsolócsoportot a NarI pNW361 hasítással ligáltuk, majd az EcoRI-gyel módosított pNW361 újrahasítása után az adaptált 396 bp állandó régiót elválasztottuk. A változó régiófragmenst és a módosított állandó régiófragmenst közvetlenül az EcoRI/ClP kezelt pEEG4CMWneo-ba ligáltuk, és így pJA137-t kaptunk. Kezdetben az összes vizsgált klón a beültetést nem megfelelő irányban tartalmazta. Emiatt a beültetést újraizoláltuk, és a beültetés megfordítására újraklónoztuk, és így pJA141 plazmidot kaptunk.

Így számos, megfelelő helyzetben lévő beültetést tartalmazó klónt kaptunk, és az adapterszekvenciát DNS-szekvenálással megerősítettük.

9.3 *Nehézláncgén szerkesztése*

9.3.1 *Nehézlánc-izotípus kiválasztása*

A nehézlánchoz alkalmas állandó régióizotípusként a humán IgG4-t választottuk.

9.3.2 *Gén szerkesztése*

A nehézlánc cDNS-szekvencia a változó régió 3' vég közelében egy BanI helyet mutat (2a. ábra). A változó régiószekvencia nagyobb részét 426 bp EcoRI/ClP/BanI fragmensként izoláltuk. A BanI hely változó régió fennmaradó 3' része helyett egy oligonukleotid adaptert terveztünk, amely egy olyan, egyetlen HindIII helyet foglal magában, amit az állandó régió első két aminosavjába már korábban beépítettünk.

A kapcsolócsoportot a V_H fragmenshez kapcsoltuk, és a ligáló elegyből az EcoRI–HindIII adaptált fragmenst tisztítással elválasztottuk. A változó régiót pJA91 EcoRI-gyel való vágásával az állandó régióhoz ligáltuk, a HindIII-at az intronfragmenstől elválasztottuk, és V_H-val helyettesítettük, és így pJA142-t kaptunk. A klónokat E. coli JM101-be való transzformálással elválasztottuk, és a kapcsoló- és keresztezőszekvenciákat DNS-szekvenálással megerősítettük (megjegyzés: a klónozáskor a HindIII hely elveszett).

10. *Kimér kifejező vektor szerkesztése*

10.1 *Neo- és gpt-vektorok*

A kimér könnyűláncot (1. változat) a pJA143-tól EcoRI-fragmensként elválasztottuk, és az EcoRI/ClP-kezelt pEEG4CMVneo kifejező vektorba klónoztuk. Így pJA145-t kaptunk. A megfelelő elhelyezkedésű beültetéseket tartalmazó klónokat restrikciós térképzéssel azonosítottuk.

A kimér könnyűláncot (2. változat) a fentiekben ismertetettek szerint szerkesztettük. A kimér nehézláncgént 2,5 Kbp EcoRI/BamHI fragmensként a pJA142-ből izoláltuk, és az EcoRI/Bcl1/ClP-kezelt pEEG4CMVgpt származék vektorfragmensébe klónoztuk. Így pJA144 plazmidot kaptunk.

10.2 *GS külön vektorok*

A pJA141 és pJA144 GS változatokat úgy szerkesztettük, hogy a plazmidok BamHI/Sall/Cl kezelésével a neo- és gpt-kazettákat helyettesítettük, a vektorfragmenst elválasztottuk, és a pR049 plazmidból származó, GS-tartalmú fragmenshez kapcsoltuk. Így a pJA179 könnyűláncvektort és a pJA180 nehézláncvektort kaptuk.

10.3 *GS szingli vektor szerkesztése*

Olyan szingli vektorszerkezeteket hoztunk létre, amelyek egy plazmidban tartalmazzák a cL-t (kimér könnyűlánc), a cH-t (kimér nehézlánc) és a GS géneket,

amelyek rendje cL–cH–GS vagy cH–cL–GS, és a gének leolvasásával úgynevezett fejtől farokig, például cL>cH>GS szerkezetet szerkesztettünk. Ezeket a plazmidokat úgy állítottuk elő, hogy pJA179-t vagy pJA180-t BamHI/C1P-vel kezeltünk, és egy BglII/HindIII hCMV promoter kazettában a HindIII/BamHI fragmenst a pJA182 plazmid cH–cL–GS előállítására a pJA141-ből a pJA180-ba vagy a pJA181 plazmid cL–cH–GS előállítására a pJA144-ből a pJA179-be ligáltuk.

11. *Kimér gén kifejezése*

11.1 *Kifejezés COS sejtekben*

A pJA145 kimér antitest plazmidot (cL) és a pJA144-t (cH) COS sejtekbe kotranszformáltuk. Az ideiglenes kifejezési kísérletből származó felülúszó olyan összeállítású antitestet tartalmaz, amely a HUT 78 humán T-sejtvonalhoz kapcsolódik. A ^{35}S-metioninnal végzett anyagcserejelzés-kísérletek a kifejezést és a nehéz és könnyűláncok kapcsolódását igazolják. A könnyűlánc redukált géleken mért mozgékonysága azt jelenti, hogy a potenciális glikozilezési hely glikozileződött. A tunicamicin jelenlétében végzett COS sejtekben való kifejezés a könnyűlánc méretcsökkenését mutatja a kontroll kimér antitestekhez és az OKT3 egér könnyűlánchoz képest. Ezért Ja141-t szerkesztettünk, és kifejeztük. Ebben az esetben a könnyűlánc nem mutatott rendkívüli mozgékonyságot vagy a tunicamicin jelenlététől függő méreteltolódást. Ez a második kimér könnyűláncváltozat, ha kifejezését kimér nehézlánccal (cH) végezzük, olyan antitestképződést eredményez, ami HUT 78 sejtekhez jó kapcsolódást mutat. Az antigénkötődés mindkét esetben az egér antitesttel ekvivalens.

11.2 *Kifejezés kínaihörcsögpetefészek-sejtekben (CHO)*

Stabil sejtvonalakat állítottunk elő a pJA141/pJA144 és pJA179/pJA180, pJA181 és pJA182 plazmidokból CHO sejtekké való transzfektálásával.

12. *CDR-ojtás*

A kísérletben egy humán változó régiókeretbe megpróbáltunk annyi egér eredetű csoportot bejuttatni, amennyi az egér és a kimér antitestekkel összehasonlítható antigénkötő aktivitást mutat.

12.1 *Változó régió elemzése*

Antitestszerkezetek és antigén-antitest komplexek kis adatbázisának elemzéséből nyilvánvaló, hogy csak kis számú antitestcsoport kerül közvetlen érintkezésbe az antigénekkel. Az egyéb csoportok úgy vehetnek részt az antigénkötésben, hogy a kontaktcsoportokat kedvező konfigurációkká pozicionálják, vagy az egyedi változó régiókat stabilan burkolják, és a könnyű és nehézlánc változó régiók egymással stabil kölcsönhatásban vannak. A transzferálásra kiválasztott csoportokat a következő eljárásokkal azonosíthatjuk.

a) Az antitest röntgensugár kristályszerkezet-elemzésekor azt tapasztaljuk, hogy az antigénkötő felület elsődlegesen régiónként három olyan huroksoron helyezkedik el, amely a B hengerkeretből kinyúlik.

b) Az antitest változó régiószekvenciák elemzésével úgynevezett hipervariábilitást [a meghatározást a komplementaritásmeghatározó régiók (CDR)-nél WU és Kabat (5) értelmezte] mutattunk ki. A legtöbb, de nem mindegyik esetben ezek a CDR-ek megfelelnek a fentiekben ismertetett hurokrégióknak, de kevéssel ezek mögé nyúlnak.

c) Az a) és b) eljárásokkal nem azonosított csoportok az antigénkötő hely topológiabefolyásolásával közvetlenül vagy közvetve vagy az egyedi változó régiók stabil burkolásával, és a változó régiók belső kölcsönhatásának stabilizálásával vehetnek részt az antigénkötésben. Ezeket a csoportokat úgy azonosíthatjuk, hogy ezeket a szekvenciákat egy ismert szerkezetű, adott antitestre helyezzük és megfigyeljük, a kulcscsoportok hogyan vesznek részt az antigén kötésében; vagy a szekvenciákat sorba állítjuk, és megjegyezzük a „kóros" csoportokat, majd megvizsgáljuk szerkezeti elhelyezkedésüket és valószínű hatásukat.

12.1.1 Könnyűlánc

A 3. ábrán a humán keret REI-régió- és az OKT3 könnyű változó régiószekvenciák sorba állítását láthatjuk. A feltételezhetően az antigénkötő régiónak megfelelő szerkezeti hurkokat (LOOP) és CDR-eket (KABAT) jelöltük. Az antigénkötésben a 12c. pontban ismertetettek szerint szintén részt vevő, számos egyéb csoportot is megjelöltünk. A 3. ábrán a szekvencia felett feltüntetett csoport típus mindegyik csoport oldalláncának térbeli elhelyezkedését jelzi, amelyet röntgensugár kristályelemzéses eljárásból kapott rezolvált szerkezetek vizsgálatával határoztunk meg.

Az ilyen típusú csoportok jelölési kulcsai a következők:

N =CDR mellett (röngtensugár-elemzés)
P =burkolás
S =felület
I =határfelület
B =beépített – nem burkolt
E =exponált
* =határfelület
=burkolás/ráhatás
? =nem CDR-csoport, amely egérszekvenciaként szükség szerint fennmaradhat.

A 3. ábrán aláhúzott csoportok aminosavak. Humán keretként REI-t választottunk, mert a könnyűlánc egy kappa-lánc, és a kappa változó régiók az egérszekvenciákkal nagyobb homológiát mutatnak, mint a lambda könnyű változó régiók, például KOL (lásd a későbbiekben). Az REI-választás az egyéb kappa könnyűláncokhoz képest azért előnyös, mert a könnyűlánc röntgensugár szerkezetét úgy határoztuk meg, hogy az egyedi csoportok szerkezeti elemzését elvégezhessük.

12.1.2 Nehézlánc

A 4. ábrán a humán keret KOL-régió- és az OKT3 nehézláncrégió-szekvenciák sorba állítását láthatjuk. A feltételezhetően az antigénkötő régiónak megfelelő szerkezeti hurkokat és CDR-eket jelöltük. Az antigénkötésben a 12c. pontban ismertetettek szerint szintén részt vevő, számos egyéb csoportot is megjelöltünk. A 4. ábrán a csoportok jelölésére alkalmazott kulcsok és egyéb jelek a 3. ábrán alkalmazott jelölésekkel azonosak.

Nehézlánckeretként KOL-t választottunk, mert a röntgensugár szerkezet szerint jobb megoldást biztosít, mint például a NEWM, és az OKT3 nehéz változó ré-

giószekvencia sorba állítása is jobb homológiát mutat a KOL-lal, mint a NEWM-mal.

12.2 *Változó gének tervezése*

A változó régiótartományokat egér változó régió optimális kodonb alkalmazással terveztük [Grantham és Perrin (15)], és a B723 szignálszekvenciákat alkalmaztuk [Whittle és munkatársai (13)]. A szekvenciákat úgy terveztük, hogy az állandó régióhoz úgy kapcsolódjanak, mint a fentiekben ismertetett kimér géneknél. Néhány szerkezet a „Kozak-konszenzusszekvenciá"-t [Kozak (16)] tartalmazza, amely közvetlenül a génben lévő szignálszekvencia 5'-hez kapcsolódik. Ez a szekvenciaminta, feltételezésünk szerint, segít az eukarióta szervezetekben a leolvasás indításában.

12.3 *Génszerkesztés*

A változó régió építéséhez különböző stratégiákat alkalmazhatunk. A szekvenciák összeillesztését végezhetjük oligonukleotidok alkalmazásával, a Jones és munkatársai (17) által ismertetett eljárással; vagy az összes CDR vagy hurokrégió oligonukleotid irányítású helyspecifikus mutagenézissel való egyidejű helyettesítésével, a Verhoeyen és munkatársai (2) által ismertetett eljárással. Mindkét stratégiát alkalmaztuk, és az így kialakított szerkezeteket az 1. és 2. táblázatban és a 4. és 5. ábrán foglaljuk össze. Néhány esetben megfigyeltük, hogy a mutagenézis deléciókhoz és a génben való átrendeződés újramodellezéséhez vezetett, az összeépítés pedig nagyon érzékeny volt az oligonukleotid minőségére.

13. *Kifejezővektorok szerkesztése*

M13-ból vagy SP65-bázisú intermedier vektorokból izolált géneket a könnyűlánchoz pEEG4CMVneoba, a nehézlánc előállításhoz pedig pEEG4CMVgpt-be klónoztunk. Az eljárást a kimér géneknél fentiekben ismertetettek szerint folytattuk le.

1. táblázat

CDR-ojtott génszerkesztés

Kód	Egérszekvencia-tartalom	Szerkesztési eljárás	Kozak-szekvencia	
			–	+
Könnyűlánc	Összes humán keret RE1			
121	26–32, 50–56, 91–96	SDM és gén-összekapcs.	–	n. d.
121A	26–32, 50–56, 91–96 +1, 3, 46, 47	részleges gén-összekapcs.	n. d.	+
121B	26–32, 50–56, 91–96 +46, 47	részleges gén-összekapcs.	n. d.	+
221	24–24, 50–56, 91–96	részleges gén-összekapcs.	+	+
221A	24–34, 50–56, 91–96 +1, 3, 46, 47	részleges gén-összekapcs.	+	+
221B	24–34, 50–56, 91–96 +1, 3	részleges gén-összekapcs.	+	+
221C	24–34, 50–56, 91–96	részleges gén-összekapcs.	+	+
Nehézlánc	Összes humán keret KOL			
121	26–32, 50–56, 95–100B	gén-összekapcs.	n. d.	+
131	26–32, 50–58, 95–100B	gén-összekapcs.	n. d.	+
141	26–32, 50–65, 95–100B	részleges gén-összekapcs.	+	n. d.
321	26–35, 50–56, 95–100B	részleges gén-összekapcs.	+	n. d.
331	26–35, 50–58, 95–100B	részleges gén-összekapcs. gén-összekapcs.	+	+
341	26–35, 50–65, 95–100B	SDM részleges gén-összekapcs.	+	+
341A	26–35, 50–65, 95–100B +6, 23, 24, 48, 49, 71, 73, 76, 78, 88, 91 (+63 – humán)	gén-összekapcs.	n. d.	+
341B	26–35, 50–65, 95–100B +48, 49, 71, 73, 76, 78, 88, 91, (+63 – humán)	gén-összekapcs.	n. d.	+

A kifejezések jelentése:

n. d. = nincs előállítva.

SDM = helyspecifikus mutáció.

gén-összekapcs.: a változó régió összekapcsolása teljes egészében oligonukleotidokból történik.

részletes összekapcs.: a változó régió összekapcsolása olyan restrikciós fragmentekkel való kombinálással történik, amelyek eredetileg SDM- és gén-összekapcsolással előállított, egyéb génekből származnak; vagy amelyek a változó régió oligonukleotidos összekapcsolásával és olyan restrikciós fragmensekkel való rekonstrukcióval állíthatók elő, amelyek eredetileg SDM- és gén-összekapcsolással előállított, egyéb génekből származnak.

14. *CDR-ojtott gének kifejezése*

14.1 *Ojtott könnyűlánc- (gL) tartalmú antitest egér nehézlánccal (mH) vagy kimér nehézlánccal (cH) való előállítása*

A gL láncok mindegyike mH- vagy cH-társítással jelentős mennyiségű antitestet termel. Az ATG 5'-helyzetbe beépített Kozak-konszenzusszekvencia (kgL-szerkezetek) azonban a tiszta kifejezés 2–5-szörös javítását eredményezi. A kgL/cH vagy kgL/mH kombinációknál a kísérleti kifejezés mértékét nagyszámú kísérleti sorozattal 200 ng/ml értékről körülbelül 500 ng/ml-re növeltük.

Az antigén HUT 78 sejtekhez való közvetlen kötés meghatározásakor a gL121 hurokbázisú egérszekvenciát magában foglaló szerkezet mH-val vagy cH-val való társítása nem eredményez aktív antitestet. Azonban, ha a 12.1 pontban ismertetettek figyelembevételével az 1, 3, 46 és 47 keretcsoportokat a humán csoportról az OKT3 egércsoportra cseréltük, és a két új, 121A és 221A jelű konstrukciókat cH-val közösen kifejeztük, az antigénkötés egyértelműen kimutatható volt. Ezeknek a csoportoknak a részletesebb vizsgálata azt mutatta, hogy az 1 és 3 csoportok nem fő résztvevő-csoportok, mert a gL221B gén cH-val való társításával kapott termék kevésbé detektálható kötőaktivitást mutat. A gL221c könnyűlánctermék, amelyben az egérszekvenciák a 46 és 47 helyen vannak a cH-val társítva, jó kötőaktivitást mutat.

14.2 *Ojtott nehézlánc- (cL) tartalmú antitest kimér lánccal (cL)*

A gH gének kifejezése sokkal nehezebbnek bizonyult, mint a gL géneké. Először is a Kozak-szekvenciabeépítés a gH gének kifejezését nem nagyon befolyásolta. A kifejezés kismértékben javult, de a javulás nem volt azonos az ojtott könnyűláncnál tapasztaltakkal.

A CDR1-nél alkalmazott hurok (26–32 aminosav), például gH121, 131, 141 sem eredményezte a várt anyagmennyiséget, és ezekből a szerkezetekből nem vonható le megfelelő következtetés.

Emellett a gH341 gén cL-lel vagy mL-lel való közös kifejezése módosítható lett, és kisebb mennyiségű antitestet eredményezett, mint a cH/cL vagy mH/mL kombinációk. A gH341, gH341A és gH341B változatokra irányuló módosítása jobb kifejezést eredményezett.

Ez vagy a változó régió egérszekvencia-frakció általános növekedésének, vagy a 63 helyzet változásnak, amelyben a csoport a humán keretmaradékkal kapcsolatos felső burkolási problémák elkerülésére a fenilalanin (Phe)-ről a humán valin aminosavra (Val) tér vissza, köszönhető. Abban az esetben, ha a gH321-t vagy gH331-t cL-lel társítva fejeztük ki, antitest termelődött, de antitestkötő aktivitás nem volt detektálható.

Ha a sokkal konzerválóbb gH341-t alkalmaztuk, a cL-lel vagy mL-lel társítva antitestkötő aktivitást érzékeltünk, de ez csak kismértékben volt nagyobb, mint a háttér szintje. Amikor a 12.1 pont szerint további egércsoportokat helyettesítettünk, a kgH341A és kgH341B cL-lel való kifejezésekor előállított antitestek egyértelmű kötőaktivitást mutattak.

14.3 *Teljesen CDR-ojtott antitest előállítása*

A kgL221 gént kgH341, kgH341A vagy kgH341B alkalmazásával fejeztük ki. A kgH221A/kgH341 kombináció normál COS sejtkifejezéssel nagyon kevés anyagot eredményezett.

A kgL221A/kgH341A vagy kgH221A/kgH341B kombinációk a gL/cH-hoz hasonló mennyiségű antitestképződést eredményeztek.

A kgH221A/gH341 vagy kgH221A/kgH341 kombinációkkal végzett néhány kísérletben antigénkötő aktivitást nem tapasztaltunk, de a kifejezési szint is alacsony volt.

A kgH221A/kgH341A vagy kgH221A/kgH341B kombinációk kifejezésekor antigénkötő aktivitást mértünk.

A kgL221A/kgH341A kombinációval előállított antitest antigénkötő aktivitása a kimér antitestéhez hasonló.

A fentiekben ismertetett eredmények elemzése

15. *CDR-ojtási eredmény értékelése*

A teljesen humanizált antitesttervezés célja az volt, hogy egy humán antitestkeretbe antigénkötésre képes, minimális számú egér aminosavat vigyünk be.

15.1 *Könnyűlánc*

15.1.1 A CDR-ek terjedelme

A könnyűláncban az antigénekkel érintkező csoportokat tartalmazó, egyéb antitestek szerkezeti tanulmányozásával ismert hurkokat meghatározó csoportok, és a Kabat és munkatársai által a komplementaritásmeghatározó régiókként (CDR-ek) meghatározott hipervariábilis csoportok a CDR-rel ekvivalensek. A CDR-nél a hipervariábilis régió a 24–34 csoportokat, míg a szerkezeti hurok a 26–32 csoportokat foglalja magában.

Az OKT3-nál a két változat között csak egyetlen aminosavkülönbség van. Ez a 24. aminosav, ahol az egérszekvencia szerint, és az REI humán keret glutamint tartalmaz.

A CDR3 estén a hurok a 91–96 csoportokat, a Kabat hipervariábilis csoport pedig a 89–97 csoportokat foglalja magába. A 89, 90 és 97 OKT3-aminosavak az OKT3 és az REI között azonosak (3. ábra). Ha a CDR1 hurokváltozaton (gL121) és a Kabat-változaton (gL221) alapuló szerkezeteket állítjuk elő, és mH-val vagy cH-val fejezzük ki, a gL121 esetén nem tapasztalható antigénkötő aktivitás, de a gL221-nél nyomnyi aktivitás kimutatható. Ez utóbbi azt jelenti, hogy az ojtott változórégióban egyetlen többlet egércsoport is eredményezhet némi érzékelhető hatást. A tranziens kifejező rendszerben mindkét gén kiemelkedően jól kifejezhető.

15.1.2 Keretcsoportok

Tovább vizsgáltuk a fennmaradó keretcsoportokat is, elsősorban a CDR-ekhez közeli, egyéb antitestek röntgensugár-elemzéséből ismert aminosavakat, valamint az OKT3-ban az együttműködő keret és az egér alcsoport (VI alcsoport) között, amellyel az OKT3 a legnagyobb homológiát mutatja, található különböző aminosavakat. Az 1, 3, 46 és 47 helyzeteket azonosítottuk, és megvizsgáltuk az antigénkötő aktivitáshoz való lehetséges hozzájárulásukat. A vizsgálatot úgy végeztük, hogy a humán aminosavat mindegyik helyzetben

egér aminosavval helyettesítettük. Így gL221A-t (gL221+D1Q, Q3V, L4GR, L47W; 3. ábra, 1. táblázat) állítottunk elő, EEG4CMVneo-ban klónoztuk, és cH-val együtt kifejeztük (pJA144). Az így kapott antitest jól kifejeződött, és jó kötőaktivitást mutatott. Előállítottuk a gL21B-t (G1221+D1Q, Q3V) és gL221C-t (gL221+L46R, L47W) is, és a fentiekhez hasonlóan megvizsgáltuk, azt tapasztaltuk, hogy mindkét antitest együttes kifejezésekor antitest képződött, de csak a gL221C/cH kombináció mutatott antigénkötő aktivitást. A gL121A (gL121+D1Q, D3Q, Q3V, L46R, L47W) előállítása és cH-val való együttes kifejezése is antigénhez kötődő antitestképződést eredményezett.

15.2 *Nehézlánc*

15.2.1 A CDR-ek terjedelme

A nehézlánc esetén a hurok és a hipervariábilitáselemzés csak a CDR3-ben azonos. A CDR1-nél a hurokrégió a 26–32 csoportokat, míg a Kabat-CDR a 31–35 csoportokat foglalja magában. A CDR2 hurokrégió az 50–58 csoportokat, míg a hipervariábilis régió az 50–65 csoportokat foglalja magában. A CDR2 huroknál az 56–58 csoportok körül a végpont-meghatározás némi bizonytalanságot mutatott, ezért olyan humanizált antitestet szerkesztettünk, amelyhez KOL antitestből származó keretet és ezekhez a CDR-változatoknak a különböző kombinációit, beleértve a CDR2 50–56 rövidebb változatot is, alkalmaztuk.

A CDR1 hurokváltozatok esetén, például a gH121, gH131 és gH141-nél a tenyészet felülúszóban csak nagyon kevés antitest képződött. Mivel szabad könnyűláncot nem érzékeltünk, arra a meggyőződésre jutottunk, hogy az antitest kialakult, és a sejt belsejében összekapcsolódott, de a nehézlánc valamilyen módon eltorzult, valószínűleg nem pontosan sokszorozódott, és így az antitest belül lebomlott. Némelyik kísérletben ^{35}S jelzésvizsgálattal nyomnyi mennyiségű antitestet észleltünk.

Amikor azonban a CDR1-nél a hurokváltozatot és a Kabat-változatot (26–35 egér aminosavcsoportok) vizsgáltuk, és a 31 (Ser–Arg), 33 (Ala–Thr) és 35 (Tyr–His) csoportokban a humán csoportokat az egércsoportokra cseréltük, a gH321, kgH331 és kgH341 cL-lel való együttes kifejezése antitestet eredményezett. A kifejezés általában kismértékű volt, és a Kozak-féle együttműködő szekvencia 5' gén szignálszekvencia ATG-be való beültetése sem javította jelentősen, pedig a gL gén esetén az ilyen beültetés a tiszta antitesttermelés 2–5-szörös növekedését eredményezte. Azonban csak a gH341/mL vagy a kgH341/cL esetén tudtunk valamennyi kötőaktivitást érzékelni. A kgH341 gén kgL221A-val való együttes kifejezésekor a tiszta antitestképződés túl kevés volt ahhoz, hogy a háttér mellett kötőaktivitást érzékelhessünk.

15.2.2 *Keretcsoportok*

Könnyűláncok esetén a nehézlánckereteket újravizsgáltuk. Ha az egér és humán nehéz változó régiók közötti kismértékű kezdeti homológiát a könnyűlánchoz hasonlítjuk, valószínűleg több aminosav lehet érdekes. Két gént, a kgH341A és kgH231B géneket szerkesztettünk úgy, hogy a 11 és 8 humán csoportokat a gH341-hez egércsoportokkal helyettesítettük, és a CDR2 63 csoportot visszaváltoztattuk a tartományburkolás javítására. cL-lel vagy kgL221A-val kombinálva mindkét változat antigénkötő aktivitást mutatott, a kgH341A gén összes 11 csoportjának változtatása pedig kiváló változatnak bizonyult.

15.3 *Közbülső következtetések*

Az OKT3-mal tehát bebizonyítottuk, hogy az antigénkötő képesség humanizált antitestbe való transzferálásához a könnyű és nehézláncban egyaránt a Kabat-féle hipervariábilitási vagy szerkezeti hurokváltozattal meghatározott CDR-régiókon kívüli egércsoportok szükségesek. A könnyűlánchoz, valószínűleg az egér és a humán kappa módosítható régiók közötti nagyobb kezdeti homológia következtében kevesebb többletcsoport szükséges. Az egyéb antitestszerkezeteknél szerzett ismeretekből két változatnál (a könnyűláncnál 1 és 3 és a nehézláncnál 6, 23, 71, 73 és 76) várható részleges vagy antitest felületi hatás. Itt azt láttuk, hogy a könnyűlánc 1 és 3 csoportok nem szükségszerűen egércsoportok; és a nehézláncok közül csak a gH341B nehézlánc 221A könnyűlánccal való kombinálása csak gyenge kötőaktivitást eredményez. Emiatt az egér antitesthez hasonló kötőaffinitás fenntartásához a 6, 23 és 24 cserék fontosak. Emiatt szükségessé vált további, 8 kgH341A-beli egércsoport egyedi részvételének kgH341-hez viszonyított tanulmányozása is.

16. *További CDR-ojtási kísérletek*

A további CDR-ojtott nehézláncgéneket lényegében a fentiekben ismertetett eljárással állítottuk elő. A 2. táblázatban összefoglalt további nehézláncgéneket a gH341 (pJA178 plazmid) és gH341A (pJA185 plazmid) alapján az egér OKT3 vagy a humán KOL 6, 23, 24, 48, 49, 63, 71, 73, 76, 78, 88 és 91 csoportoknál alakítottuk ki. Ezekben a további kísérletekben alkalmazott CDR-ojtott könnyűláncgének a fentiekben ismertetett gL221, gL221A, gL221B és gL22C volt.

2. táblázat

OKT3 nehézlánc CDR-ojtványok

1. gH341 és származékaik

RES NUM	6	23	24	48	49	63	71	73	76	78	88	91	
OKT3vh	Q	K	A	I	G	F	T	K	S	A	A	Y	
gH341	E	S	S	V	A	F	R	N	N	L	G	F	JA178
gH341A	Q	K	A	I	G	V	T	K	S	A	A	Y	JA185
gH341E	Q	K	A	I	G	V	T	K	S	A	G	G	JA198

2. táblázat (folytatás)

RES NUM	6	23	24	48	49	63	71	73	76	78	88	91	
gH341*	Q	K	A	I	G	V	T	K	N	A	G	F	JA207
gH341*	Q	K	A	I	G	V	R	N	N	A	G	F	JA209
gH341D	Q	K	A	I	G	V	T	K	N	L	G	F	JA197
gH341*	Q	K	A	I	G	V	R	N	N	L	G	F	JA199
gH341C	Q	K	A	V	A	F	R	N	N	L	G	F	JA184
gH341*	Q	S	A	I	G	V	T	K	S	A	A	Y	JA203
gH341*	E	S	A	I	G	V	T	K	S	A	A	Y	JA205
gH341B	E	S	S	I	G	V	T	K	S	A	A	Y	JA183
gH341*	Q	S	A	I	G	V	T	K	S	A	G	F	JA204
gH341*	E	S	A	I	G	V	T	K	S	A	G	F	JA206
gH341*	Q	S	A	I	G	V	T	K	N	A	G	F	JA208
KOL	E	S	S	V	A		R	N	N	L	G	F	

OKT3 könnyűlánc CDR-ojtványok
2. gL221 és származékaik

RES NUM	1	3	46	47	
OKT3v1	Q	V	R	W	
GL221	D	Q	L	L	DA221
gL221A	Q	V	R	W	DA221A
gL221B	Q	V	L	L	DA221B
GL221C	D	Q	R	W	DA221C
RE1	D	Q	L	L	

Az egércsoportok vannak aláhúzva.

A CDR-ojtott nehéz- és könnyűláncgéneket egyik a másikkal való különböző kombinációban vagy a megfelelő egér és kimér nehéz- és könnyűláncgénekkel közösen fejezzük ki, lényegében a fentiekben ismertetett eljárással, COS sejtekben. Ezután a HPB–ALL sejtekkel, a fenti eljárással megvizsgáltuk a kapott antitesttermékek kötő- és blokkolóképességét.

A különböző ojtott nehézláncok gL221C könnyűlánccal való együttes kifejezésének eredményeit a 7. és 8. ábrákon (a 2. táblázatban a JA184, JA185, JA197 és JA183, JA184, JA185 és JA197 szerkezet látható), a 10. ábrán (a kimér JA185, JA199, JA204, JA205, JA207, JA208 és JA209 szerkezetekre) és a 11. ábrákon (a JA183, JA184, JA185, JA198, JA203, JA205 és JA206 szerkezetekre).

Megvizsgáltuk a módosítható keretekben humánról egérre való változtatást nem tartalmazó, alap ojtott termékek, azaz a gL221 gh341-gyel (JA178) együtt kifejezett termékének és a humán legnagyobb részének egérre való változtatásával nyert, „teljesen ojtott" termékek, azaz a gL221C gh341A-val (JA185) együtt kifejezett termékének viszonylagos kötőaffinitását, amelyet HPB-sejtek alkalmazásával az egér OKT3 referencia standard elleni kompetitív vizsgálattal mértünk. A vizsgálatot a fentiekben ismertetett 3.3 pont szerint végeztük. Az alap ojtott termékre kapott eredményeket a 12. ábrán, a teljesen ojtott termékre kapott eredményeket a 13. ábrán ábrázoljuk. Az eredményekből láthatjuk, hogy az alap ojtott termék kötőképessége az OKT3 egér referenciastandardéhoz viszonyítva elhanyagolható; míg a „teljesen ojtott" termék kötőképessége az OKT3 egér referenciastandardéhoz nagyon hasonló.

A kötő- és blokkolóaktivitás-vizsgálatok eredményei a következőket mutatják.

A JA198 és JA207 szerkezetek kötőkarakterisztikája a legjobb, és mindkettő kötőképessége lényegében a kimér és teljesen ojtott gH341A termékével azonos. Ez azt jelenti, hogy a 88 és 97, valamint a 76 helyzet az OKT3-kötőképesség fenntartásához nem túl kritikus; míg a 6, 23, 24, 48, 49, 71, 73 és 78 helyzetek közül legalább néhány nagyobb fontossággal bír.

Ez úgy derült ki, hogy a JA209 és JA199, amelyek egymáshoz viszonyított kötőképessége azonos, kötőképessége kisebb, mint a JA198 és JA207 szerkezeteké. Ez azt mutatja, hogy a 71, 73 és 78 helyzetekben, amelyekben a JA199 és JA209 szerkezetek esetén teljes egészében vagy részlegesen humán csoportok vannak, fontos az egércsoportok jelenléte.

Ezen túlmenően, ha a JA205 és JA183 szerkezetekkel kapott eredményeket összehasonlítjuk, azt láthatjuk, hogy a kötőképesség a JA205 szerkezettől a JA183 szerkezet irányába csökken. Ez a JA205 és JA183 szerkezetek között egyetlen különbséget mutató 23 egércsoport jelenléte fontosságára utal.

Ezek és más eredmények is arra a következtetésre vezettek, hogy a gH341A (JA185) szerkezetben alkalmazott 11 egér keretcsoport mellett az egércsoportok jelenléte a 6, 23, 24, 48 és 49, valamint a maximális kötőaffinitás eléréséhez a 71, 73 és 78 helyzetek mindegyikében fontos.

Hasonló kísérleteket végeztünk számos olyan rágcsáló antitest CDR-ojtásával, amelyek specifikusak a CD4-re (OKT4), ICAM–1-re (RG–5), TAG72-re (B72.3) és a TNFα-ra (61E71, 101.4, 4TNF1, 4TNF2 és 4TNF3).

2. példa

Egér anti-CD4 T-sejt receptor antitest, OKT4A CDR-ojtás

Anti OKT4 CDR-ojtott nehéz- és könnyűláncgéneket állítottunk elő, majd ezeket kifejeztük és megvizsgáltuk lényegében az 1. példában a CDR-ojtott OKT3-előállításnál ismertetett eljárással. A CDR-ojtott OKT4A részletes ismertetését megtaláljuk a PCT/GB90... számú (Ortho) nemzetközi szabadalmi bejelentésben. Számos CDR-ojtott OKT4-antitestet állítottunk elő. A CDR-ojtott OKT4A-változat jelenleg az LCDR2-ojtott könnyűlánc és a HCDR10-ojtott nehézlánc kombinációja.

A könnyűlánc

Az ojtott könnyűlánchoz alkalmazott humán akceptorkeret RE1 volt. Az előnyös LCDR2 könnyűláncban a szerkezeti hurok CDR-eken kívül a 33, 34, 38, 49 és 89 helyzetekben tartalmaznak a humán csoportok helyett egércsoportokat. Ezek közül a 33, 34 és 89 kicserélt helyzetek a találmány oltalmi köréhez tartozó, előnyös terjedelmű CDR-ek jellemzői (a CDR1-ben a 33 és 34 helyzetek és a CDR3-ban a 89 helyzet). A 38 és 49 helyzetekben történt humánról egércsoportra való csere olyan helyzetekben valósult meg, amelyekben a találmány szerint előnyösen donor egér aminosavcsoport van.

A donor egér könnyűlánc változó régió és az RE1 humán akceptor könnyűlánc változó régió aminosavszekvenciáinak összehasonlítása nyilvánvalóvá teszi, hogy az egér és humán csoportok az összes 46, 48 és 71, valamint a 2, 4, 6, 35, 36, 44, 47, 62, 64–69, 85, 87, 98, 99, 101 és 102 helyzetekben azonosak. Azonban az LCDR2 58 helyzetében az aminosavcsoport a humán RE1 keretcsoport, és nem a találmány szerint előnyös egér OKT4-csoport.

A nehézlánc

Az ojtott nehézláncokhoz alkalmazott humán akceptorkeret a KOL volt. Az előnyös CDR-ojtott HCDR10 nehézláncban a szerkezeti hurok CDR-eken kívül a 24, 35, 57, 58, 60, 88 és 91 helyzetekben tartalmaznak humán csoportok helyett egércsoportokat. Ezek közül a 35 (CDR1) és 57, 58 és 60 (CDR2) helyzetek a találmány oltalmi köréhez tartozó, előnyös terjedelmű CDR-ek jellemzői. A 24 helyzetben megvalósult humánról egércsoportra való csere olyan helyzetekben valósult meg, amelyekben az aminosavcsoport a találmány szerint előnyösen donor egércsoport. Ezen túlmenően a 88 és 91 helyzetekben megvalósult humánról egércsoportra való csere olyan csoportokban valósult meg, amelyekben az aminosavcsoportok adott esetben donor egércsoportok.

Az egér OKT4A és humán KOL nehéz módosítható aminosavszekvenciák összehasonlítása azt mutatja, hogy az egér és humán csoportok az összes 23, 49, 71, 73 és 78, valamint a 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94, 103, 104, 106 és 107 helyzetekben azonosak.

Ennek megfelelően az OKT4A CDR-ojtott nehézlánc HCDR10 a találmány oltalmi köréhez tartozó szerkezetek különösen előnyös változatát képezi.

3. példa

Antimucin-specifikus egér antitest, B72,3, CDR-ojtás

A B72,3 antimucin-specifikus egér monoklonális antitestkódoló gének klónozását és a B72,3 egér-humán kimér antitestek előállítását a (13) irodalmi helyen és a 89/01783 számon közrebocsátott nemzetközi bejelentésben ismertetik.

a) *B72,3 könnyűlánc*

Ennek a könnyűláncnak a CDR-ojtását úgy végeztük, hogy az egér CDR-eket közvetlenül a humán könnyűlánc RE1-be transzferáljuk.

A transzferált régiók:

CDR szám	csoportok
1	24–34
2	50–56
3	90–96

A kapott ojtott könnyűlánc-aktivitást a következő génkombinációk COS sejtekben való együttes kifejezésével mértük:

B72,3cH/B72,3cL

B72,3CH/B72,3gL.

Meghatároztuk a felülúszók antitest-koncentrációját, valamint az antitestek mucinnal bevont mikrotiterlemezekhez való kötőképességét. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a B72,3cH lánc mind a B72,3cL-lel, mind a B72,3gL-lel való kombinációja hasonló kötési tulajdonságokat eredményez.

A B72,3 egér és REI könnyűlánc aminosavszekvenciák összehasonlítása azt mutatja, hogy a csoportok a 46, 58 és 71 helyzetekben azonosak, és a 48 helyzetben különböznek. Ennek megfelelően, ha a 48 helyzetben a humán csoportot kicseréljük a donor egércsoportra, a találmány szerinti CDR-ojtott könnyűlánc (B72,3gL) további javulása várható.

b) *B72,3 nehézlánc*

i) *Keretváltozat*

Először egy humán keretváltozatot állítottunk elő. A kérdés leegyszerűsítése a következő volt.

Olyan antitestből származó keretrégiókat kell alkalmazni, amelyek kristályszerkezete ismert, vagy valami más kritériumot kell választani? A B72,3 nehézláncnál bebizonyosodott, hogy miközben a szerkezet ismerete nagyon fontos, a CDR-ek egérből humán keretekbe való transzferálása a donor- és receptorkeretek teljes homológiájának maximalizálásával elősegíthető.

A B72,3 nehézlánc-szekvencia és a Kabat (4) humán nehézlánc-szekvencia összehasonlítása azt mutat-

ja, hogy a B72,3 a KOL-lal csekély, de az EU nehéz lánccal nagyon jó homológiát mutat.

Emiatt a CDR-ojtáshoz EU-t választottunk, és CDR-ekként a következő csoportokat transzferáltuk:

CDR szám	csoport
1	27–36
2	50–63
3	93–102

Azt is megfigyeltük, hogy az EU FR4 régió semelyik más humán (vagy egér) antitesthez nem hasonlított. Emiatt az ojtott nehézláncgénekben az „együttműködő" humán szekvencia kialakításához ezt is kicseréltük. (Az előzetes kísérletek azt mutatták, hogy az EU FR4 szekvenciát tartalmazó ojtott nehézláncgének kifejezése tranziens kifejező rendszerekben nagyon gyenge.)

ii) *Az ojtott nehézláncgénekkel kapott eredmények*

Az összes humán keretrégiót tartalmazó ojtott nehézláncgének akár gL, akár cL génekkel való kifejezésével kapott ojtott antitestek kismértékű mucinhez való kötőképességgel jellemezhetők. Az ojtott antitest kimér antitesthez viszonyított aktivitása körülbelül 1%. Ezekben a kísérletekben azonban azt is tapasztaltuk, hogy az ojtott antitestek aktivitása pH=2–3,5 mellett a B72,3-énak körülbelül 10%-ára növelhető.

Ez a megfigyelés a kulcsa, hogy hogyan növelhető az ojtott antitest aktivitása savkezelés nélkül. Ez alapján a savkezelés a savcsoportok protonálását idézi elő (aszparaginsav pKa=3,86 és glutaminsav pKa=4,25), amely azután a CDR-hurkok szerkezetében változást okoz, vagy jobb antigén-hozzáférhetőséget tesz lehetővé.

A B72,3 (13) és az EU (4) és (5) szekvenciák összehasonlításából nyilvánvaló, az egérkeretről a humán keret irányában haladva csak két helyzetben történt csere, amely savcsoportok beültetésével valósult meg. Ezek a helyzetek a 73 és 81 voltak, és a K-ról E-re, illetve a Q-ról E-re való csere valósult meg. A helyzetek fontossága megítélésére a KOL antitest kristályszerkezet vizsgálatot alkalmaztuk. A KOL nehézláncban a 81 akár a CDR hurkoktól is jó távol van. A CDR-ek 1 és 3 helyzetéhez egyaránt közel levő 73 helyzetben megvalósított K-ról E-re történő csere rontja a végső antigénkötő hatást.

iii) *Keretcserék a B72,3 gH génekben*

A fentiekben ismertetett elemzés alapján az E73-t lizinre (K) változtattuk. Azt tapasztaltuk, hogy ez a változtatás drámai hatással volt az ojtott Ab mucinhoz való kötőképességére. Emellett a megváltoztatott gH/gL kombinációval előállított gLH B72,3 mucinhoz való kötőképessége a B72,3 kimér antitestéhez hasonló.

iv) *Egyéb keretváltoztatások*

A nehézlánckeret-régiókban a fenti kísérletek tapasztalatai alapján egyéb változtatásokat is végeztünk. A kísérleti pontosságon belül a változások egyike sem mutatkozott előnyösnek sem önmagában, sem kombinációban.

v) *Egyebek*

Az ojtott Ab mucinhoz való kötőképességének mérésére alkalmazott összes eljárás egészében azt mutatja, hogy a 73 helyzet egyetlen keretcsoport-változása is elegendő a B72,3-éhoz hasonló kötőképesség kialakításához.

A B72,3 egér- és EU nehézláncszekvenciák összehasonlítása azt mutatja, hogy az egér- és humán csoportok a 23, 24, 71 és 78 helyzetekben azonosak.

Ennek megfelelően a megváltoztatott CDRF-ojtott B72,3 nehézlánc a találmány oltalmi köréhez tartozó szerkezetek egy előnyös változatát képezi.

4. példa

Egér anti-ICAM–1 monoklonális antitest CDR-ojtás

RG–5–D6 egér antitestet (0 31486.3 számú európai közrebocsátási irat), amely sejtközi adhéziós molekula 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1=ICAM–1), specifikus CDR-rel ojtottunk lényegében a fentiekben ismertetett eljárásokkal. Az eljárás részletesebb ismertetését megtaláljuk a 90 09 549.8 számú brit szabadalmi bejelentésben is.

Akceptorkeretként mind a nehéz, mind a könnyűlánchoz a humán EU-t alkalmaztuk. A gL221A ojtott könnyűlánc és a gH341D ojtott nehézlánc együttes kifejezésével kapott CDR-ojtott antitestváltozat ICAM–1-hez viszonyított kötőaffinitása a megfelelő egér-humán kimér antitest kötőaffinitásának 75%-a.

Könnyűlánc

A gL221A egér CDR-eket tartalmazott a 24–34 helyzetekben (CDR1), 50–56 helyzetekben (CDR2) és a 89–97 helyzetekben (CDR3). Emellett néhány keretcsoport is egér aminosav volt. Ezeknek a csoportoknak a kiválasztása úgy történt, hogy megfontoltuk ezeknek a csoportoknak a lehetséges részvételét a tartományburkolásban és az antigénkötő régió stabilitásának kialakításában. Megtartottuk az egércsoportokat a 2, 3, 48(?), 60, 84, 85 és 87 helyzetekben. Az egér anti-ICAM–1 és humán EU könnyűlánc aminosavszekvenciák összehasonlítása azt mutatja, hogy az egér- és humán csoportok a 46, 58 és 71 helyzetekben azonosak.

Nehézlánc

A gH341 D egér CDR-eket tartalmazott a 26–35 helyzetekben (CDR1), az 50–56 helyzetekben (CDR2) és 94–100B helyzetekben (CDR3). Emellett a gH341D 24, 48, 69, 71, 73, 80, 88 és 91 helyzetekben is egércsoportokat alkalmaztunk. Az egér anti-ICAM–1 és a humán EU nehézlánc aminosavszekvenciák a 23, 49 és 78 helyzetekben azonosak.

5. példa

Egér anti-TNFa antitestek CDR-ojtása

Számos anti-TNFa monoklonális antitestet CDR-rel ojtottunk lényegében a fentiekben ismertetett eljárásokkal. Ezek között az antitestek között vannak a 61E71, hTNF1, hTNF1, hTNF3 és 101,4 egér monoklonális antitestek.

A következőkben röviden ismertetjük ezeknek az antitesteknek a CDR-ojtását.

61E71

A 61E71-re elvégeztük a fentiekben ismertetett elemzést (1. példa, 12.1 pont), és potenciális egércso-

port-megtartó helyzetként a 23, 24, 48, 49, 68, 69, 71, 73, 75 és 88 helyzeteket azonosítottuk. Ezt és a hTNF3 és 101,4 antitesteket a könnyűláncban az RE1 és a nehézláncban a KOL humán keretcsoportokkal való CDR-ojtással állítottuk elő.

Három gént állítottunk elő. Az első a 23, 24, 48, 49, 71 és 73 [gH341(6)] egércsoportokat tartalmazta. A második gén 75 és 88 egércsoportokat [gH341(8)] is, míg a harmadik gén még a 68, 69, 75 és 88 egércsoportokat [gH341(10)] is tartalmazta. Mindegyiket a minimum ojtott könnyűlánccal, a gL221-gyel fejeztük ki. A gL221/gH341(6) és gL221/gH341(8) antitestek éppen olyan jól kötődnek a TNF-hez, mint a 61E71. A gL221/gH341(10) antitest nem fejeződött ki, ezért ezt nem vittük tovább.

Ezt követően a gL221/gH341(6) antitestet L929 sejtkompetitív vizsgálatnak vetettük alá. A vizsgálatban az antitest az L929 sejt TNF-receptorral szembeni TNF-kötőképességét vizsgáltuk oldatban. A vizsgálatban a gL221/gH341(6) antitest az egér 61E71 antitestaktivitásának megközelítően 10%-át mutatta.

hTNF1

A hTNF olyan, monoklonális antitest, amely felismeri a humán TNF-epitópot. A nehéz és könnyűlánc változó régiók CDR-ojtását EU humán kerettel végeztük.

Nehézlánc

A CDR-ojtott nehézláncban (ghTNF1) egér CDR-eket alkalmaztunk a 26–35 (CDR1), 50–65 (CDR2) és 95–102 (CDR3) helyzetekben. Egércsoportokat alkalmaztunk a 48, 67, 69, 71, 76, 89, 91, 94 és 108 helyzetekben is.

A TNF1 egér és EU humán nehézlánc csoportok összehasonlítása azt mutatja, hogy ezek a 23, 24, 29 és 78 helyzetekben azonosak.

Könnyűlánc

A CDR-ojtott könnyűláncban (gLhTNF1) egér CDRF-eket alkalmaztunk a 24–34 (CDR1), 50–56 (CDR2) és 89–97 (CDR3) helyzetekben. Emellett egércsoportokat alkalmaztunk a 3, 42, 48, 49, 83, 106 és 108 helyzetekben is.

A hTNF1 egér és EU humán könnyűlánccsoportok összehasonlítása azt mutatja, hogy ezek a 46, 58 és 71 helyzetben azonosak.

Az ojtott hTNF1 nehézláncot a kimér könnyűlánccal együtt fejeztük ki, és a termék TNF-kötőképességét a kimér könnyűlánc/kimér nehézlánc termék TNF-kötőképességével hasonlítottuk össze.

Az ojtott nehézlánc TNF-kötőképessége valamivel jobb, mint a teljesen kimér terméké.

Ehhez hasonlóan az ojtott nehézlánc/ojtott könnyűlánc együttes kifejezését is elvégeztük, és a termék kötőképességét a teljesen kimér termékéhez hasonlítottuk. Azt tapasztaltuk, hogy a két kötőképesség majdnem azonos.

hTNF3

A hTNF3 egy humán TNF–α felismerő antitest. A hTNF3-szekvencia és a 61E71 antitest a könnyű és a nehézlánc változó régiókban csak 21 különbséget mutat; 10-et a könnyűláncban (2-t a CDR-ekben, ezek az 50 és 96 helyzetek; és 8-at a keretben, ezek az 1, 19, 40, 45, 46, 76, 103 és 106 helyzetek); és 11-et a nehézláncban (3-at a CDR-régiókban, az 52, 60 és 95 helyzetekben; 8-at a keretben, az 1, 10, 38, 40, 67, 73, 87 és 105 helyzetekben). A 61E71 és hTNF3 kimér antitestek könnyű és nehézláncok a közvetlen kötőképesség romlása nélkül cserélhetők. Azonban a 61E71 TNF-receptorral szembeni L929 sejt TNF-kötőképessége egy nagyságrenddel kisebb, mint a hTNF3-é. A 61E71 CDR-ojtási adatokon alapuló hTNF3-ra épített gL221 és gH341 (+23, 24, 48, 49, 71 és 73 egércsoportok) gének vizsgálata azt mutatja, hogy a kapott ojtott antitest jó TNF-kötőképességű, de az L929 kompetitív vizsgálatban rosszabb eredményeket mutat. Lehetséges, hogy az OKT3-programban azonosított keretcsoportok ennek az antitestnek is növelik a kompetitív kötőképességét.

101,4

A 101,4 egy olyan további, egér monoklonális antitest, amely a humán TNF–a felismerésére képes. Az antitest nehézlánca jó homológiát mutat a KOL-lal, ezért a könnyűlánc CDR-ojtást RE1, a nehézlánc CDR-ojtást pedig KOL alkalmazásával végezzük. Számos olyan ojtott nehézláncú gént szerkesztettünk, amelyekben a CDR-eket (gH341) megőriztük, és amelyek egér aminosavként csak egy vagy kevés nem CDR-csoportot tartalmaztak a 73, 78 vagy 77–79 csoportokban. Ezek együttes kifejezését cL-lel vagy gL221-gyel végeztük. A TNF-kötőképesség minden esetben a kimér antitestével azonos, és a cL-lel való együttes kifejezéssel előállított antitestek az L929 vizsgálatban jó eredményeket mutatnak. Azonban a gL221-gyel kapott antitestek legalább egy nagyságrenddel kevésbé TNF-kötőképesek, mint az L929 sejt TNF-receptorok.

A nehézlánc egyéb helyzetében, például a 23 és 24-ben együtt vagy a 76 helyzetben alkalmazott egércsoportok az L929-vizsgálatban az ojtott antitest kompetitív kötőképességéhez képest nem mutatnak javulást.

A találmány szerinti eljárással számos egyéb antitest sikeres CDR-ojtását valósítottuk meg. Ilyenek az interleukin-specifikus antitestek, például az IL1- és a rákmarkerek, mint például a karcinoembrionikus antigén (CEA), például az A5B7 monoklonális antigén (21).

A fentiekben ismertetett példák természetesen csak a találmány jobb megértését szolgálják, a találmány terjedelmét nem korlátozzák. Az ismertetett eljárás módosított és megváltoztatott változatai is a találmány oltalmi köréhez tartoznak.

Irodalmi hivatkozások:

1. Kohler és Milstein: Nature *265*, 295–497 (1975);
2. Chatenoud és munkatársai: J. Immunol. *137*, 830–838 (1986);
3. Jeffers és munkatársai: Transplantation, *41*, 572–578, (1986);
4. Begent és munkatársai: Br. J. Cancer *62*, 487 (1990);
5. Verhoeyen és munkatársai: Science *239*, 1534–1536 (1988);
6. Riechmann és munkatársai: Nature *332*, 323–324 (1988);
7. Kabat, E. A., Wu, T. T., Reid–Miller, M., Perry, H. M., Gottesman, K. S.: Sequences of Proteins of

Immunological Interest, US Department of Health and Human Service, NIH, USA, (1987);
8. Wu, T. T., és Kabat, E. A.: J. Exp. Med. *132*, 211–250 (1970);
9. Queen és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *86*, 10029–10033 (1989) és WO 90/07861 számon közrebocsátott nemzetközi bejelentés;
10. Maniatis és munkatársai: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, New York (1989);
11. Primrose és Old: Principles of Gene Manipulation, Blackwell, Oxford (198);
12. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *74*, 5463 (1977);
13. Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H. W., Kramer, B., Plugfelder, M., Fritz, H–J.: Nucl. Acids Res. 12, 9441 (1984);
14. Whittle, N., Adair, J., Lloyd, J. C., Jenkins, E., Devine, J., Schlom, J., Raubitshek, A., Colcher, D., Bodmer, M.: Protein Engineering *1*, 499 (1987);
15. Sikder, S. S., Akolkar, P. N., Kaledas, P. M., Morrison, S. L., Kabat, E. A.: J. Immunol. *135*, 4215 (1985);
16. Wallick, S. C., Kabat, E. A., Morrison, S. L.: J. Exp. Med. *168*, 1099 (1988);
17. WO 89/01036 számon közrebocsátott nemzetközi bejelentés;
18. Granthan és Perrin: Immunology Today, *7*, 160 (1986);
19. Kozak, M.: J. Mol. Biol. *196*, 947 (1987);
20. Jones, T. P., Dear; P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., Winter, G.: Nature *321*, 947 (1986);
21. Harwood és munkatársai: Br. J. Cancer. *54*, 75–82 (1986).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Antitestmolekula, amely meghatározott antigénre specifikus, és amely összetett nehézláncot és komplementer könnyűláncot tartalmaz, *azzal jellemezve,* hogy az összetett nehézlánc olyan változó domént tartalmaz, amely akceptor antitest nehézlánckeret eredetű aminosavakat és donor antitest nehézlánc antigénkötő régió eredetű aminosavakat tartalmaz, ahol a donor antitest a meghatározott antigénre specifikus, és ahol a Kabat-féle számozási rendszer szerint az összetett nehézláncban legalább az 5, 8, 10, 12–17, 19, 21, 22, 40, 42–44, 66, 68, 70, 74, 77, 79, 81, 83–85, 90, 92, 105, 109, 111 és 113 helyzetű aminosav akceptor eredetű, és legalább a 23, 24, 31–35, 49–58, 71, 73, 78 és 95–102 helyzetű aminosav donor eredetű.

2. Az 1. igénypont szerinti antitestmolekula, *azzal jellemezve,* hogy a összetett nehézláncban a 26–30 és 59–65 helyzetű aminosav szintén donor eredetű.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti antitestmolekula, *azzal jellemezve,* hogy az összetett nehézláncban legalább egy az 1, 3 és 76 helyzetű aminosavak közül szintén donor eredetű.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti antitestmolekula, *azzal jellemezve,* hogy az összetett nehézláncban legalább egy, a 36, 94, 104, 106 és 107 helyzetű aminosavak közül szintén donor eredetű.

5. A 4. igénypont szerinti antitestmolekula, *azzal jellemezve,* hogy az összetett nehézláncban legalább egy, a 2, 4, 6, 38, 48, 67 és 69 helyzetű aminosavak közül szintén donor eredetű.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti antitestmolekula, *azzal jellemezve,* hogy az összetett nehézláncban a 7, 9, 11, 18, 20, 25, 37, 39, 41, 45, 47, 48, 72, 75, 80, 82, 86–89, 91, 93, 103, 108, 110 és 112 helyzetű aminosav szintén donor eredetű.

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti antitestmolekula, *azzal jellemezve,* hogy a komplementer könnyűlánc egy összetett könnyűlánc, amely olyan változó domént tartalmaz, amely akceptor antitest könnyűlánckeret eredetű aminosavakat és donor antitest könnyűlánc antigénkötő régió eredetű aminosavakat tartalmaz, ahol a donor antitest a meghatározott antigénre specifikus, és ahol a Kabat-féle számozási rendszer szerint az összetett könnyűláncban legalább az 5, 7–9, 11, 13–18, 20, 22, 23, 39, 41–43, 57, 59, 61, 72, 74–79, 81, 82, 84, 86, 88, 100, 104, 106 és 107 helyzetű aminosav akceptor eredetű, és legalább a 24–34, 46, 48, 50–56, 58, 71 és 89–97 helyzetű aminosav donor eredetű.

8. A 7. igénypont szerinti antitestmolekula, *azzal jellemezve,* hogy az összetett könnyűláncban az 1, 3 és 47 helyzetű aminosav szintén donor eredetű.

9. A 7. vagy 8. igénypont szerinti antitestmolekula, *azzal jellemezve,* hogy az összetett könnyűláncban a 36, 44, 47, 85 és 87 helyzetű aminosav szintén donor eredetű.

10. A 7–9. igénypontok bármelyike szerinti antitestmolekula, *azzal jellemezve,* hogy az összetett könnyűláncban legalább egy a 2, 4, 6, 49, 62, 64–69, 98, 99, 101 és 102 helyzetű aminosavak közül szintén donor eredetű.

11. A 7–10. igénypontok bármelyike szerinti antitestmolekula, *azzal jellemezve,* hogy az összetett könnyűláncban legalább egy az 1, 3, 10, 12, 21, 40, 60, 63, 70, 73, 80, 103 és 105 helyzetű aminosavak közül szintén donor eredetű.

12. Terápiás vagy diagnosztikai készítmény, *azzal jellemezve,* hogy az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti antitestmolekulát tartalmaz gyógyszerészeti hordozóanyag, hígítóanyag vagy segédanyag mellett.

13. Eljárás humanizált, rekombináns antitest előállítására, amely meghatározott antigénre specifikus, *azzal jellemezve,* hogy

1. meghatározzuk egy donor antitest, amely a meghatározott antigénre specifikus, nehézláncában található változó domén aminosavszekvenciáját,

2. meghatározzuk egy nem specifikus akceptor antitest nehézláncában található változó domén aminosavszekvenciáját,

3. egy antitestmolekulához szükséges összetett nehézláncot állítunk elő, amely akceptorkeret eredetű aminosavakat és donor antigénkötő régió eredetű aminosavakat tartalmaz, ahol a Kabat-féle számozási rendszer szerint legalább az 5, 8, 10, 12–17, 19, 21, 22, 40, 42–44, 66, 68, 70, 74, 77, 79, 81, 83–85, 90, 92, 105,

109, 111 és 113 helyzetű aminosav akceptor eredetű, és legalább a 23, 24, 31–35, 49–58, 71, 73, 78 és 95–102 helyzetű aminosav donor eredetű,

4. a 3. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

5. meghatározzuk a 4. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

6. ha az 5. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitestaffinitásával, akkor a 3. lépés szerint egy nehézláncot állítunk elő, amelyben a 71, 73 és 78 helyzetű aminosav szintén donor eredetű,

7. a 6. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

8. meghatározzuk a 7. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

9. ha a 8. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 6. lépés szerint egy nehézláncot állítunk elő, amelyben a 26–30 helyzetű aminosav szintén donor eredetű,

10. a 9. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

11. meghatározzuk a 10. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

12. ha a 11. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 9. lépés szerint egy nehézláncot állítunk elő, amelyben az 1, 3 és 76 helyzetű aminosavak közül legalább egy szintén donor eredetű,

13. a 12. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

14. meghatározzuk a 13. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

15. ha a 14. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 12. lépés szerint egy nehézláncot állítunk elő, amelyben a 36, 94, 104, 106 és 107 helyzetű aminosavak közül legalább egy szintén donor eredetű,

16. a 15. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

17. meghatározzuk a 16. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

18. ha a 17. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 15. lépés szerint egy nehézláncot állítunk elő, amelyben a 2, 4, 6, 38, 48, 67 és 69 helyzetű aminosavak közül legalább egy szintén donor eredetű,

19. a 18. lépés szerint előállított nehézláncot egy komplementer könnyűlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a komplementer könnyűlánc előállítása során

1. meghatározzuk egy donor antitest, amely a meghatározott antigénre specifikus, könnyűláncában található változó domén aminosavszekvenciáját,

2. meghatározzuk egy nem specifikus akceptor antitest könnyűláncában található változó domén aminosavszekvenciáját,

3. egy antitestmolekulához szükséges összetett könnyűláncot állítunk elő, amely akceptorkeret eredetű aminosavakat és donor antigénkötő régió eredetű aminosavakat tartalmaz, ahol a Kabat-féle számozási rendszer szerint legalább az 5, 7–9, 11, 13–18, 20, 22, 23, 39, 41–43, 57, 59, 61, 72, 74–79, 81, 82, 84, 86, 88, 100, 104, 106–109 helyzetű aminosav akceptor eredetű, és legalább a 24–34, 46, 48, 50–56, 58, 71 és 89–97 helyzetű aminosav donor eredetű,

4. a 3. lépés szerint előállított könnyűláncot egy komplementer nehézlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

5. meghatározzuk a 4. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

6. ha az 5. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 3. lépés szerint egy könnyűláncot állítunk elő, amelyben az 1, 2, 3 és 47 helyzetű aminosav szintén donor eredetű,

7. a 6. lépés szerint előállított könnyűláncot egy komplementer nehézlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

8. meghatározzuk a 7. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

9. ha a 8. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 6. lépés szerint egy könnyűláncot állítunk elő, amelyben a 36, 44, 47, 85 és 87 helyzetű aminosav szintén donor eredetű,

10. a 9. lépés szerint előállított könnyűláncot egy komplementer nehézlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő,

11. meghatározzuk a 10. lépésben előállított antitestmolekula affinitását a meghatározott antigénre,

12. ha a 11. lépésben meghatározott affinitás nem ekvivalens a donor antitest affinitásával, akkor a 9. lépés szerint egy könnyűláncot állítunk elő, amelyben a 2, 4, 6, 49, 62, 64–69, 98, 99 és 101 helyzetű aminosavak közül legalább egy szintén donor eredetű,

13. a 12. lépés szerint előállított könnyűláncot egy komplementer nehézlánchoz kapcsolva egy antitestmolekulát állítunk elő.

```
  1 GAATTCCCAA AGACAAAatg gattttcaag tgcagatttt cagcttcctg
 51 ctaatcagtg cctcagtcat aatatccaga ggacaaattg ttctcaccca
101 gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc accatgacct
151 gcagtgccag ctcaagtgta agttacatga actggtacca gcagaagtca
201 ggcacctccc ccaaaagatg gatttatgac acatccaaac tggcttctgg
251 agtccctgct cacttcaggg gcagtgggtc tgggacctct tactctctca
301 caatcagcgg catggaggct gaagatgctg ccacttatta ctgccagcag
351 tggagtagta acccattcac gttcggctcg gggacaaagt tggaaataaa
401 ccgggctgat actgcaccaa ctgtatccat cttcccacca tccagtgagc
451 agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac
501 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa
551 tggcgtcctg aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca
601 gcatgagcag caccctcacg ttgaccaagg acgagtatga acgacataac
651 agctatacct gtgaggccac tcacaagaca tcaacttcac ccattgtcaa
701 gagcttcaac aggaatgagt gtTAGAGACA AAGGTCCTGA GACGCCACCA
751 CCAGCTCCCA GCTCCATCCT ATCTTCCCTT CTAAGGTCTT GGAGGCTTCC
801 CCACAAGCGC tTACCACTGT TGCGGTGCTC tAAACCTCCT CCCACCTCCT
851 TCTCCTCCTC CTCCCTTTCC TTGGCTTTTA TCATGCTAAT ATTTGCAGAA
901 AATATTCAAT AAAGTGAGTC TTTGCCTTGA AAAAAAAAAA AAA
```

1(a). ábra

```
  1 MDFQVQIFSF LLISASVIIS RGQIVLTQSP AIMSASPGEK VTMTCSASSS
 51 VSYMNWYQQK SGTSPKRWIY DTSKLASGVP AHFRGSGSGT SYSLTISGME
101 AEDAATYYCQ QWSSNPFTFG SGTKLEINRA DTAPTVSIFP PSSEQLTSGG
151 ASVVCFLNNF YPKDINVKWK IDGSERQNGV LNSWTDQDSK DSTYSMSSTL
201 TLTKDEYERH NSYTCEATHK TSTSPIVKSF NRNEC*
```

1(b). ábra

```
   1 GAATTCCCCT CTCCACAGAC ACTGAAAACT CTGACTCAAC ATGGAAAGGC
  51 ACTGGATCTT TCTACTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCCCAG
 101 GTCCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCTGAACTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT
 151 GAAGATGTCC TGCAAGGCTT CTGGCTACAC CTTTACTAGG TACACGATGC
 201 ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT GGACAGGGTC TGGAATGGAT TGGATACATT
 251 AATCCTAGCC GTGGTTATAC TAATTACAAT CAGAAGTTCA AGGACAAGGC
 301 CACATTGACT ACAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG CAACTGAGCA
 351 GCCTGACATC TGAGGACTCT GCAGTCTATT ACTGTGCAAG ATATTATGAT
 401 GATCATTACT GCCTTGACTA CTGGGGCCAA GGCACCACTC TCACAGTCTC
 451 CTCAGCCAAA ACAACAGCCC CATCGGTCTA TCCACTGGCC CCTGTGTGTG
 501 GAGATACAAC TGGCTCCTCG GTGACTCTAG GATGCCTGGT CAAGGGTTAT
 551 TTCCCTGAGC CAGTGACCTT GACCTGGAAC TCTGGATCCC TGTCCAGTGG
 601 TGTGCACACC TTCCCAGCTG TCCTGCAGTC TGACCTCTAC ACCCTCAGCA
 651 GCTCAGTGAC TGTAACCTCG AGCACCTGGC CCAGCCAGTC CATCACCTGC
 701 AATGTGGCCC ACCCGGCAAG CAGCACCAAG GTGGACAAGA AAATTGAGCC
 751 CAGAGGGCCC ACAATCAAGC CCTGTCCTCC ATGCAAATGC CCAGCACCTA
 801 ACCTCTTGGG TGGACCATCC GTCTTCATCT TCCCTCCAAA GATCAAGGAT
 851 GTACTCATGA TCTCCCTGAG CCCCATAGTC ACATGTGTGG TGGTGGATGT
 901 GAGCGAGGAT GACCCAGATG TCCAGATCAG CTGGTTTGTG AACAACGTGG
 951 AAGTACACAC AGCTCAGACA CAAACCCATA GAGAGGATTA CAACAGTACT
1001 CTCCGGGTGG TCAGTGCCCT CCCCATCCAG CACCAGGACT GGATGAGTGG
1051 CAAGGAGTTC AAATGCAAGG TCAACAACAA AGACCTCCCA GCGCCCATCG
1101 AGAGAACCAT CTCAAAACCC AAAGGGTCAG TAAGAGCTCC ACAGGTATAT
1151 GTCTTGCCTC CACCAGAAGA AGAGATGACT AAGAAACAGG TCACTCTGAC
1201 CTGCATGGTC ACAGACTTCA TGCCTGAAGA CATTTACGTG GAGTGGACCA
1251 ACAACGGGAA AACAGAGCTA AACTACAAGA ACACTGAACC AGTCCTGGAC
1301 TCTGATGGTT CTTACTTCAT GTACAGCAAG CTGAGAGTGG AAAAGAAGAA
1351 CTGGGTGGAA AGAAATAGCT ACTCCTGTTC AGTGGTCCAC GAGGGTCTGC
1401 ACAATCACCA CACGACTAAG AGCTTCTCCC GGACTCCGGG TAAATGAGCT
1451 CAGCACCCAC AAAACTCTCA GGTCCAAAGA GACACCCACA CTCATCTCCA
1501 TGCTTCCCTT GTATAAATAA AGCACCCAGC AATGCCTGGG ACCATGTAAA
1551  AAAAAAAAAA AAAGGAATTC
```

2(a). ábra

DNS szekvenciából származó OKT3 nehéz lánc fehérje szekvencia

```
  1 MERHWIFLLL LSVTAGVHSQ VQLQQSGAEL ARPGASVKMS CKASGYTFTR
 51 YTMHWVKQRP GQGLEWIGYI NPSRGYTNYN QKFKDKATLT TDKSSSTAYM
101 QLSSLTSEDS AVYYCARYYD DHYCLDYWGQ GTTLTVSSAK TTAPSVYPLA
151 PVCGDTTGSS VTLGCLVKGY FPEPVTLTWN SGSLSSGVHT FPAVLQSDLY
201 TLSSSVTVTS STWPSQSITC NVAHPASSTK VDKKIEPRGP TIKPCPPCKC
251 PAPNLLGGPS VFIFPPKIKD VLMISLSPIV TCVVVDVSED DPDVQISWFV
301 NNVEVHTAQT QTHREDYNST LRVVSALPIQ HQDWMSGKEF KCKVNNKDLP
351 APIERTISKP KGSVRAPQVY VLPPPEEEMT KKQVTLTCMV TDFMPEDIYV
401 EWTNNGKTEL NYKNTEPVLD SDGSYFMYSK LRVEKKNWVE RNSYSCSVVH
451 EGLHNHHTTK SFSRTPGK*
```

2(b) ábra

```
                1                   23                  42
                NN      N             N       N     N
CSOPORT TIPUS   SBspSPESssBSbSsSssPSPSPsPSsse*s*p*Pi^ISsSe
  Okt3v1        QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS.SVSYMNWYQQKSGT
  REI           DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIIKYLNWYQQTPGK
                ? ?
                  CDR1   (HUROK)          *******
                  CDR1   (KABAT)       ***********


                        56                              85
              N  NN
CSOPORT TIPUS *IsiPpIeesesssSBEsePsPSBSSEsPspsPsseesSPePb
  Okt3v1      SPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAAT
  REI         APKLLIYEASNLQAGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIAT
              ?  ??                        ?  ?
                    *******  CDR2  (HUROK/KABAT)


                          102   108
CSOORT TIPUS  PiPIPies**iPIIsPPSPSPSS
  Okt3v1      YYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR
  REIv1       YYCQQYQSLPYTFGQGTKLQITR
                          ?    ?
                 ******        CDR3   (HUROK)
               *********       CRD3   (KABAT)
```

3. ábra

```
            NN N                    23 26    32 35 N39  43
 CSOPORT TIPUS SESPs^SBssS^sSSsSpSpSPsPSEbSBssBePiPIpiesss
  Okt3h      QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQ
  KOL        QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSSYAMYWVRQAPGK
                  ?                ??
                                        ******    CDR1 (HUROK)
                                           ***** CDR1 (KABAT)

                      52a      60  65     N N  N    82abc     89
CSOPORT TIPUSIIeIppp^sssssss^ps^pSSsbSpseSsSseSp^pSpsSBssS^ePb
  Okt3vh   GLEWIGYINPSRGYTNTNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV
  KOL      GLEWVAIIWDDGSDQHYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGV
              ??                      ? ?  ?  ?            ?
                 ************          CDR2  (HUROK)
                 ********************  CDR2  (KABAT)

              92 N                   107    113
CSOPORT TIPUS  PiPIEissssiiisssbibi*EIPIP*spSBSS
  Okt3vh       YYCARYYDDHY.......CLDYWGQGTTLTVSS
  KOL          YFCARDGGHGFCSSASCFGPDYWGQGTPVTVSS
                  ****************** CRD3 (KABAT/HUROK)
```

4. ábra

OKT 3 nehéz lánc CDR ojtványok

1. gh341 és származékok

```
          1                          26        35  39  43
Okt3vh    QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQ
gH341     QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA178
gH341A    QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA185

gH341E    QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA198
gH341*    QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA207
gH341*    QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA209
gH341D    QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA197
gH341*    QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA199
gH341C    QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA184

gH341*    QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCSASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA203
gH341*    QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA205
gH341B    QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA183
gH341*    QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCSASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA204
gH341*    QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA206
gH341*    QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCSASGYTFTRYTMHWVRQAPGK   JA208
KOL       QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSSYAMYWVRQAPGK
```

5(i). ábra

```
        44    50                  65                        83
Okt3vh  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLT
gH341   GLEWVAYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNSKNTLFLQMDSLR JA178
gH341A  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLR JA185

gH341E  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLR JA198
gH341*  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKNTAFLQMDSLR JA207
gH341*  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLR JA209
gH341D  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKNTLFLQMDSLR JA197
gH341*  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTLFLQMDSLR JA199
gH341C  GLEWVAYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNSKNTLFLQMDSLR JA184

gH341*  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLR JA207
gH341*  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLR JA205
gH341B  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLR JA183
gH341*  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLR JA204
gH341*  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKSTAFLQMDSLR JA206
gH341*  GLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISTDKSKNTAFLQMDSLR JA208
KOL     GLEWVAIIWDDGSDQHYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMDSLR
```

5(ii). ábra

	84 95 102 113	
Okt3vh	SEDSAVYYCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	
gH341	PEDTGVYFCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA178
gH341A	PEDTAVYYCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA185
gH341E	PEDTGVYFCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA198
gH341*	PEDTGVYFCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA207
gH341D	PEDTGVYFCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA197
gH341*	PEDTGVYFCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA209
gH341*	PEDTGVYFCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA199
gH341C	PEDTGVYFCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA184
gH341*	PEDTAVYYCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA203
gH341*	PEDTAVYYCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA205
gH341B	PEDTAVYYCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA183
gH341*	PEDTGVYFCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA204
gH341*	PEDTGVYFCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA206
gH341*	PEDTGVYFCARYYDDHY.....CLDYWGQGTTLTVSS	JA208
KOL	PEDTGVYFCARDGGHGFCSSASCFGPDYWGQGTPVTVSS	

5(iii). ábra

OKT3 könnyü lánc CDR ojtás

1. gL221 és származékai

```
          1                          24         34       42
Okt3v1    QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS.SVSYMNWYQQKSGT
gL221     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASS.SVSYMNWYQQTPGK
gL221A    QIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASS.SVSYMNWYQQTPGK
gL221B    QIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASS.SVSYMNWYQQTPGK
gL221C    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASS.SVSYMNWYQQTPGK
REI       DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIIKYLNWYQQTPGK

          43      50     56                              85
Okt3v1    SPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAAT
gL221     APKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIAT
gL221A    APKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIAT
gL221B    APKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIAT
gL221C    APKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIAT
REI       APKLLIYEASNLQAGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIAT

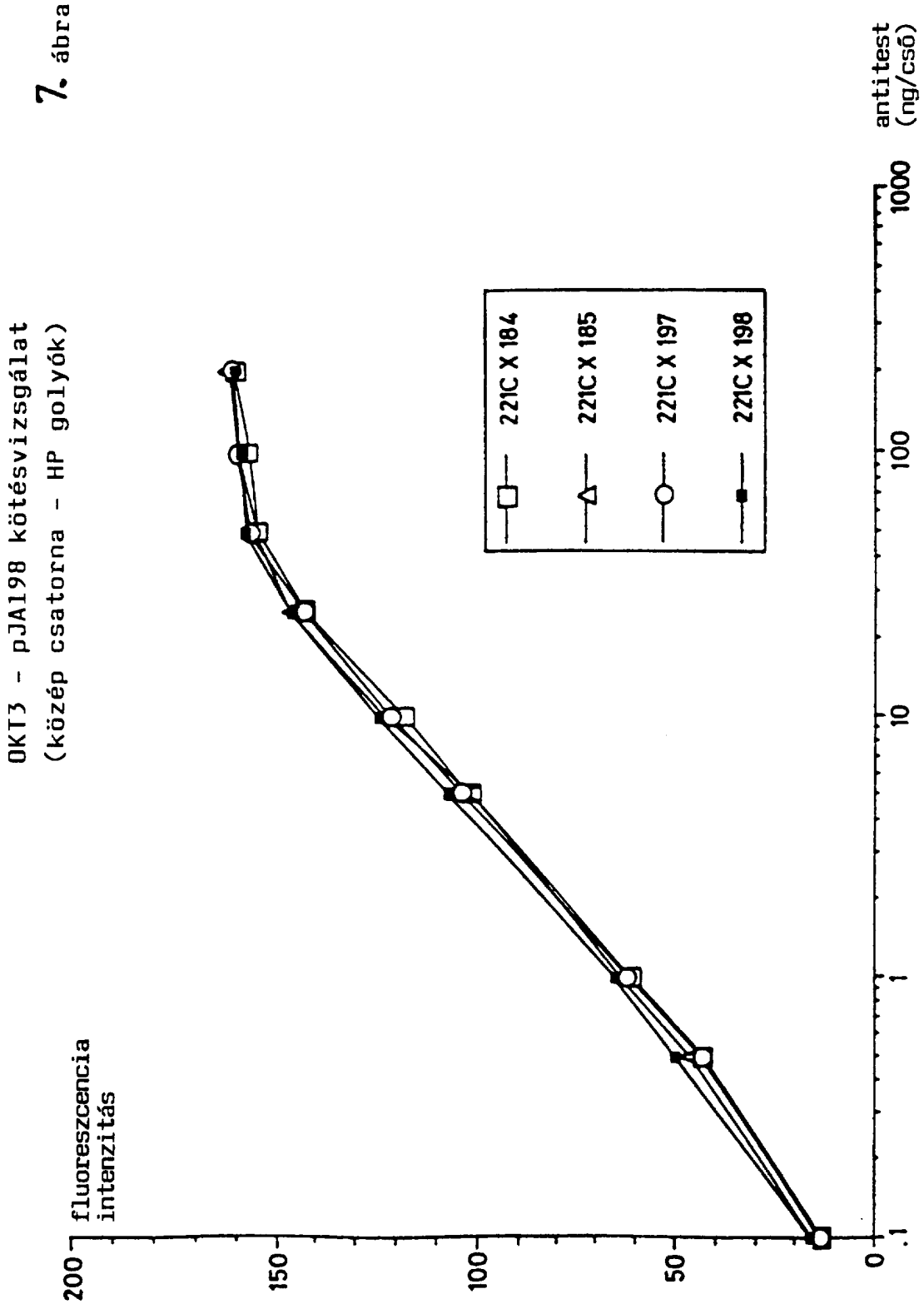
         86    91    96          108
Okt3v1   YYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR
gL221    YYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR
gL221A   YYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR
gL221B   YYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR
gL221C   YYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR
REI      YYCQQYQSLPYTFGQGTKLQITR
```

CDR aláhuzva

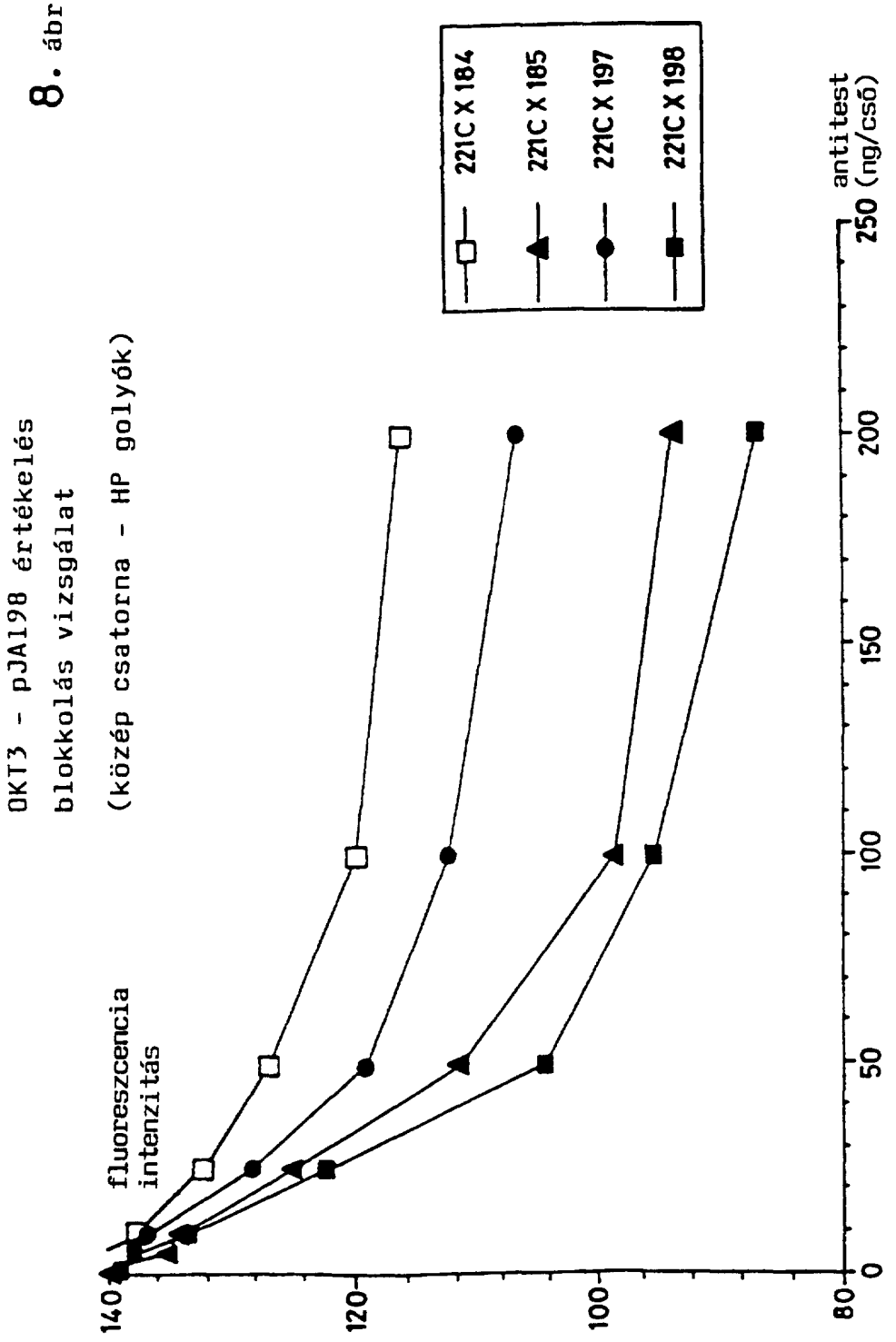
A génben lévő keretcsoportok kétszeresen aláhuzva.

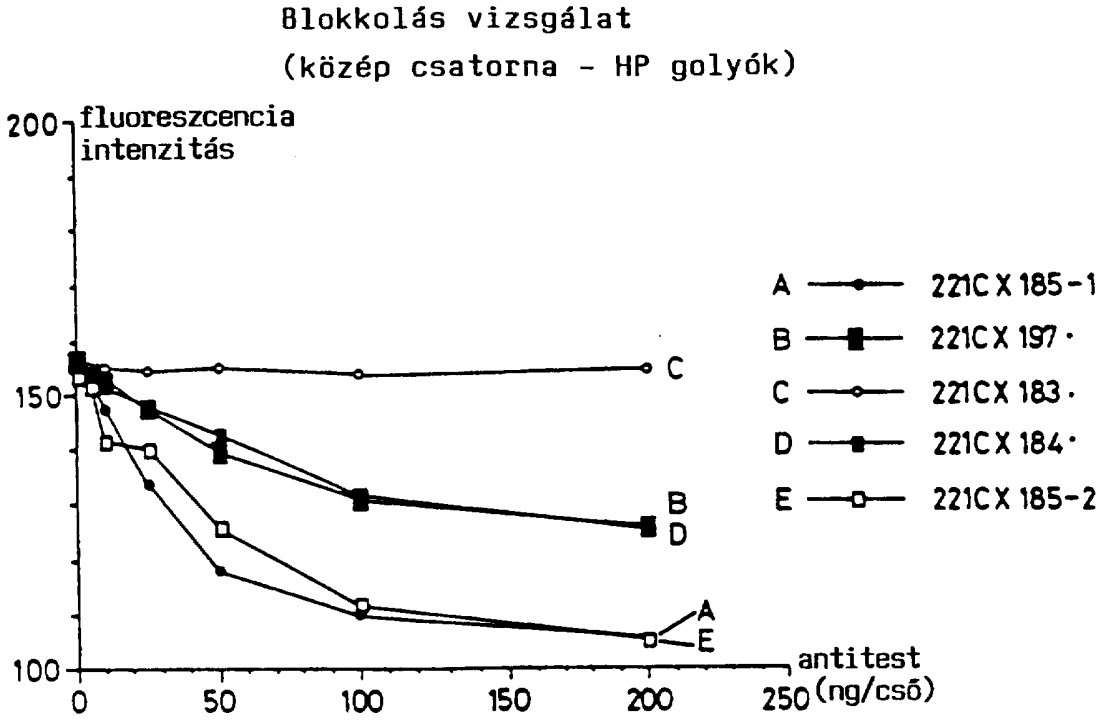
6. ábra

7. ábra


OKT3 - pJA198 kötésvizsgálat
(közép csatorna - HP golyók)
fluoreszcencia intenzitás
200
150
100
50
0
.1
1
10
100
1000
antitest (ng/cső)
221C X 184
221C X 185
221C X 197
221C X 198

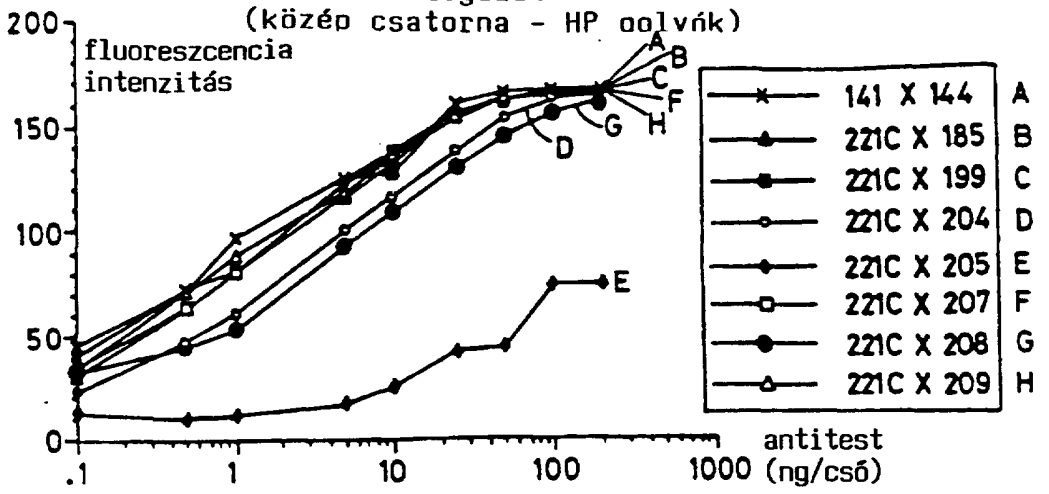
8. ábra


OKT3 - pJA198 értékelés
blokkolás vizsgálat
(közép csatorna - HP golyók)
fluoreszcencia intenzitás
140
120
100
80
0
50
100
150
200
250
antitest (ng/cső)
221C X 184
221C X 185
221C X 197
221C X 198

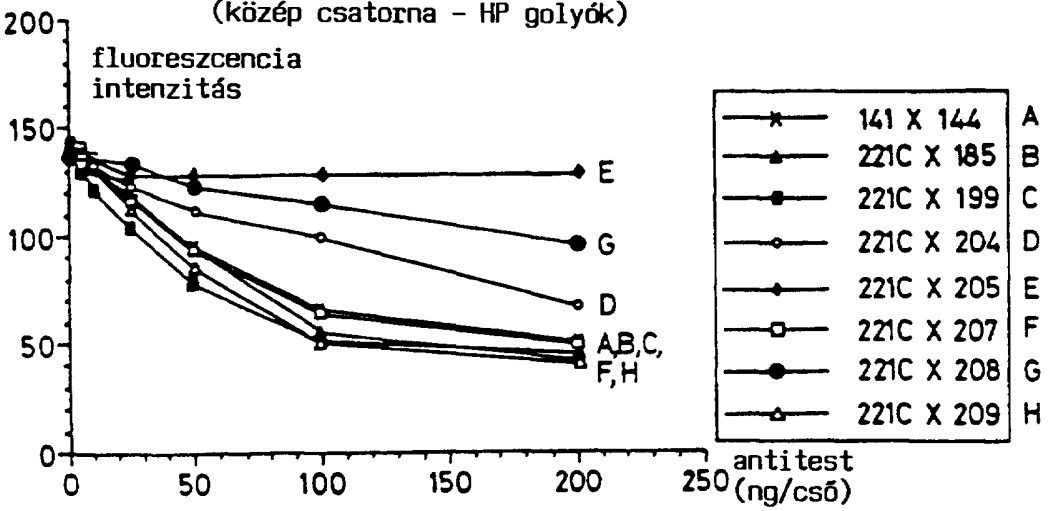

Blokkolás vizsgálat
(közép csatorna - HP golyók)
200
fluoreszcencia
intenzitás
150
100
0
50
100
150
200
250
antitest
(ng/cső)
A
E
B
D
C
A 221CX185-1
B 221CX197·
C 221CX183·
D 221CX184·
E 221CX185-2

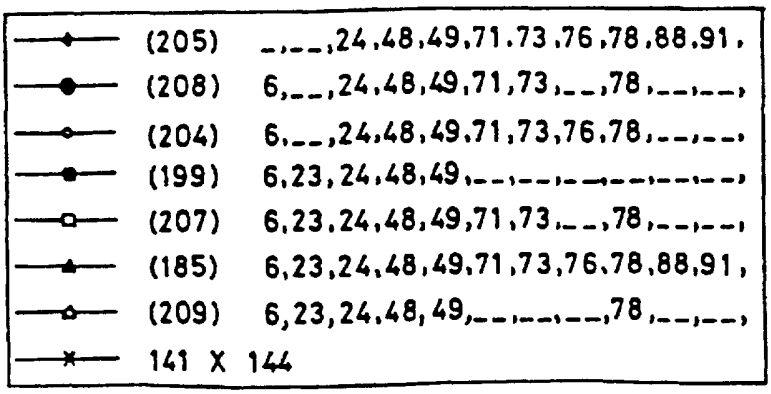
9. ábra

10. ábra OKT3 - ojtott nehéz láncok kötés vizsgálat (közép csatorna - HP golyók)

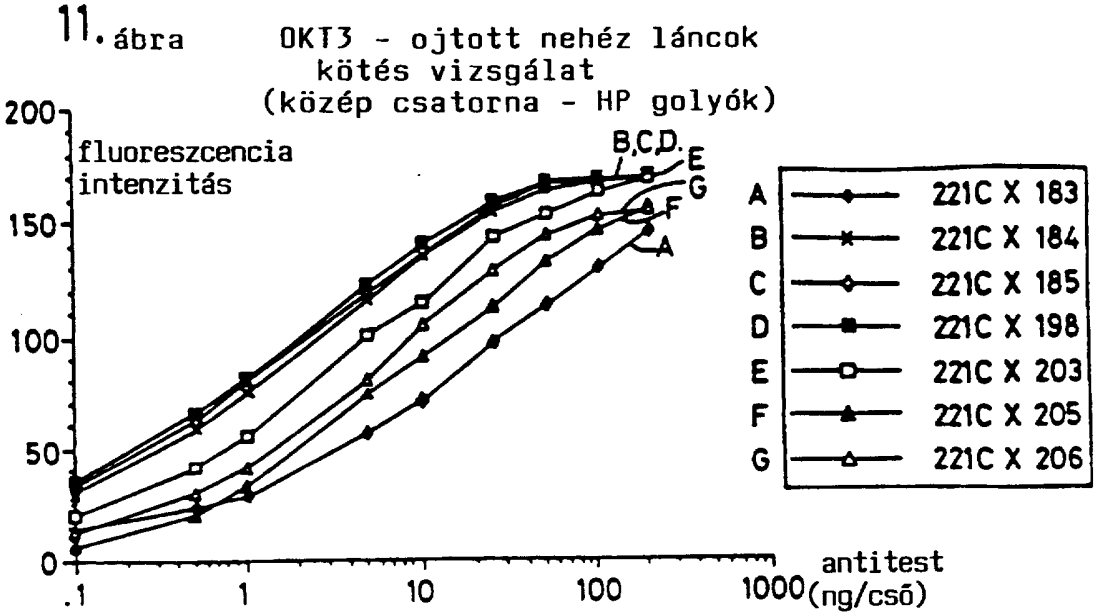


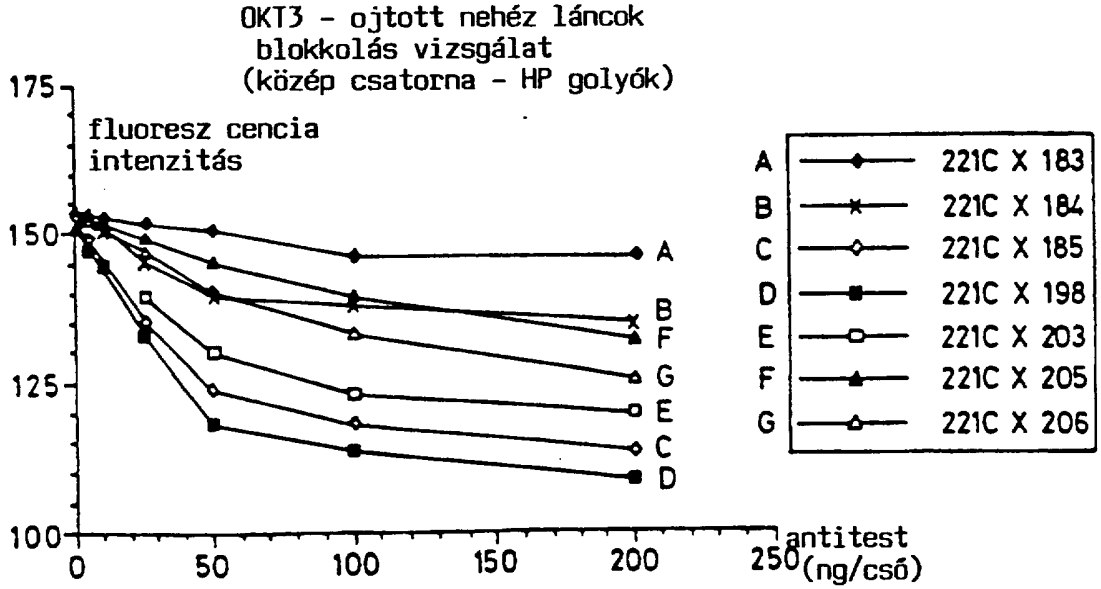
OKT3 - ojtott nehéz láncok blokkolás vizsgálat (közép csatorna - HP golyók)

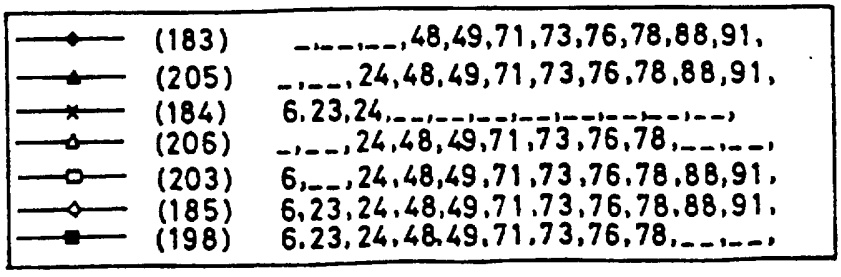




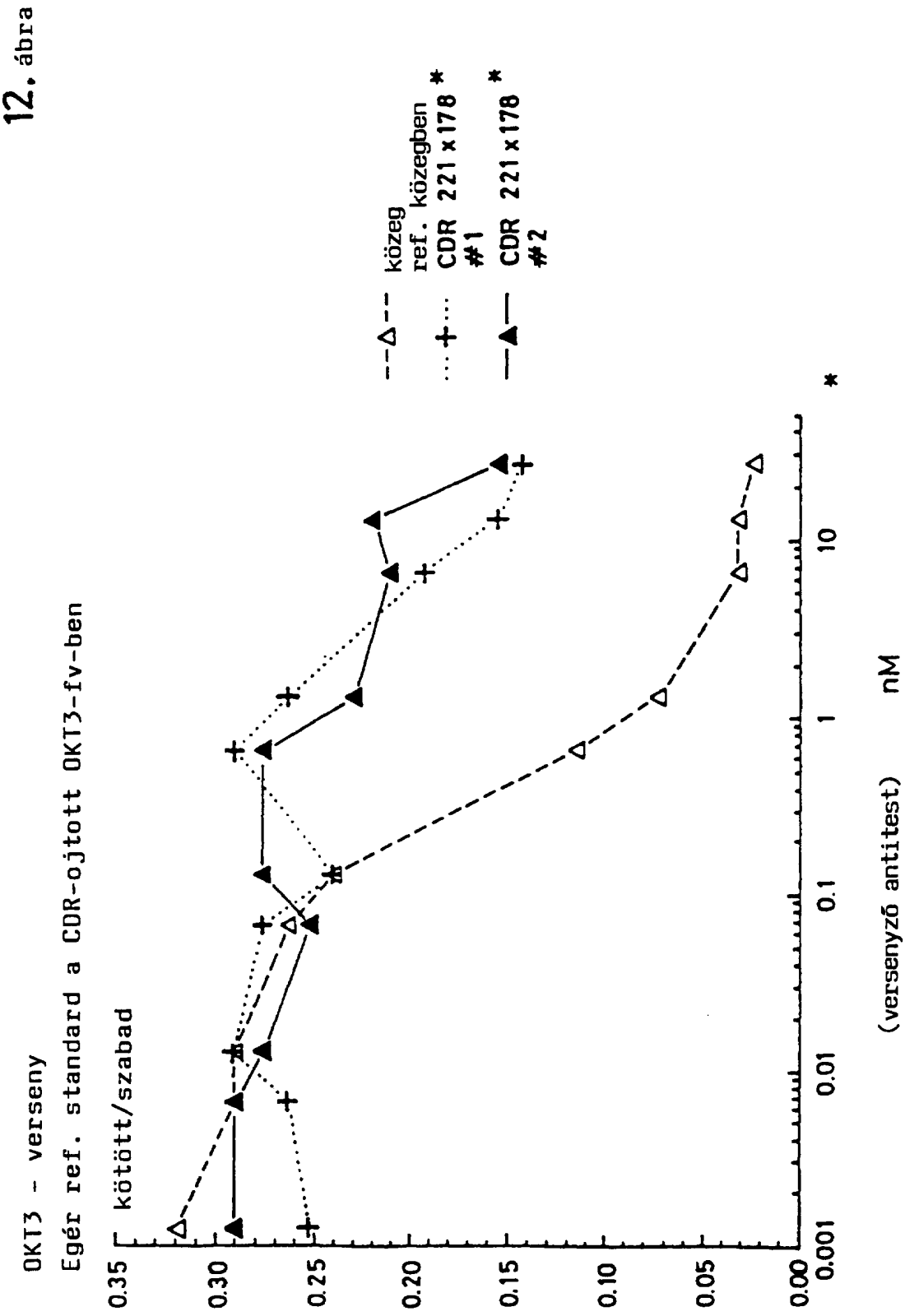
11. ábra


OKT3 - ojtott nehéz láncok
kötés vizsgálat
(közép csatorna - HP golyók)
fluoreszcencia
intenzitás
200
150
100
50
0
.1
1
10
100
1000
antitest
(ng/cső)
B,C,D
E
G
F
A
A 221C X 183
B 221C X 184
C 221C X 185
D 221C X 198
E 221C X 203
F 221C X 205
G 221C X 206

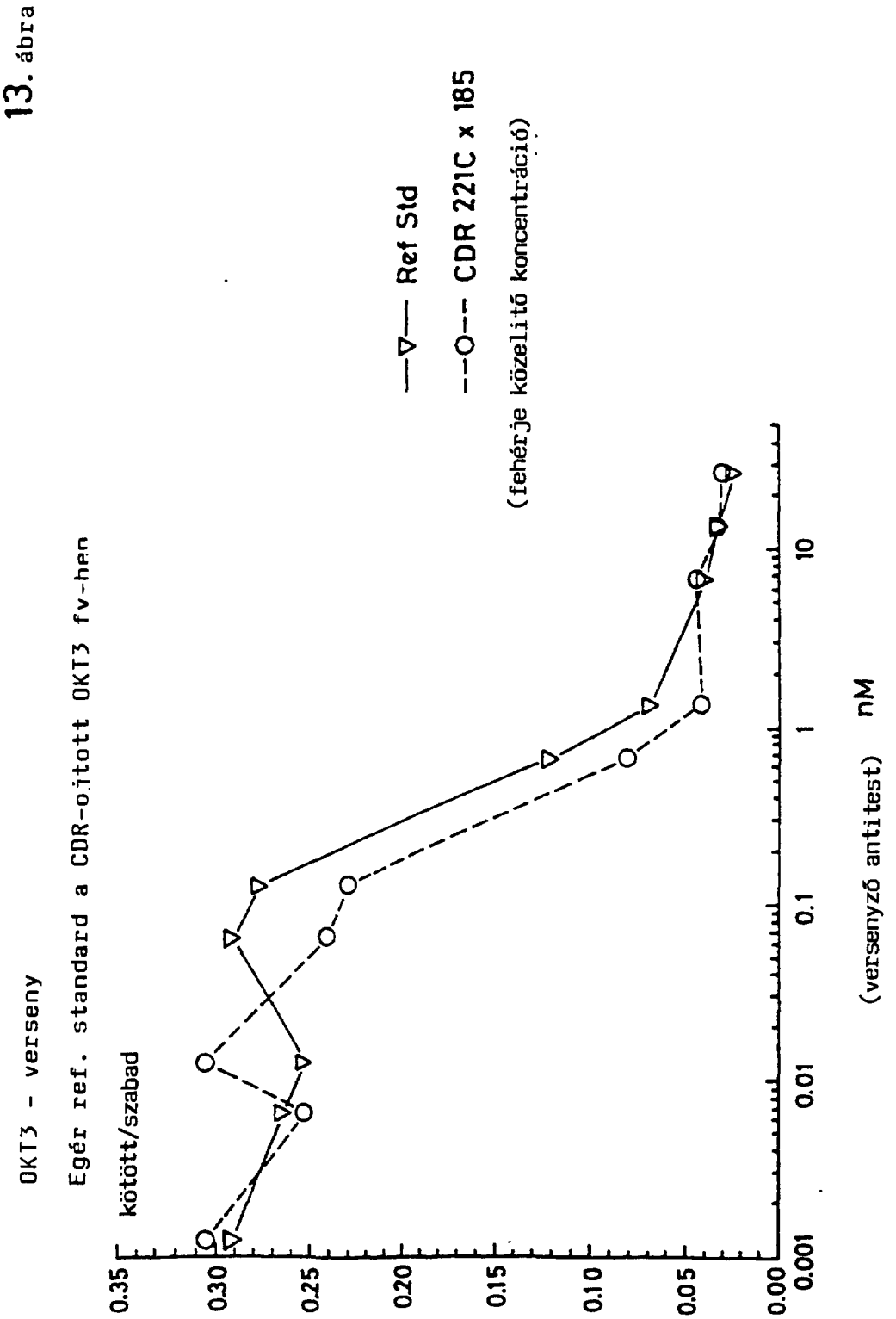

OKT3 - ojtott nehéz láncok
blokkolás vizsgálat
(közép csatorna - HP golyók)
fluoresz cencia
intenzitás
175
150
125
100
0
50
100
150
200
250
antitest
(ng/cső)
A
B
F
G
E
C
D
A 221C X 183
B 221C X 184
C 221C X 185
D 221C X 198
E 221C X 203
F 221C X 205
G 221C X 206


(183) _,_,_,_,48,49,71,73,76,78,88,91,
(205) _,_,_,24,48,49,71,73,76,78,88,91,
(184) 6,23,24,_,_,_,_,_,_,_,_,_,_,_,_,_,
(206) _,_,_,24,48,49,71,73,76,78,_,_,_,_,
(203) 6,_,_,24,48,49,71,73,76,78,88,91,
(185) 6,23,24,48,49,71,73,76,78,88,91,
(198) 6,23,24,48,49,71,73,76,78,_,_,_,_,

12. ábra


OKT3 - verseny
Egér ref. standard a CDR-ojtott OKT3-fv-ben
kötött/szabad
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
(versenyző antitest)
közeg
ref. közegben
CDR 221 x178 * #1
CDR 221 x178 * #2

13. ábra



Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Törőcsik Zsuzsanna osztályvezető
Windor Bt., Budapest