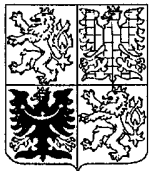


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 12.02.1998
(32) Datum podání prioritní přihlášky: 12.02.1997
(31) Číslo prioritní přihlášky: 1997/41410
(33) Země priority: JP
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 12.01.2000
(Věstník č. 1/2000)
(86) PCT číslo: PCT/JP98/00568
(87) PCT číslo zveřejnění: WO98/35698

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 2854

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/395

C 07 K 16/30

C 07 K 16/46

C 12 P 21/08

//(C 12 N 15/13, C 12 P 21/08, C 12 R 1:91)

(71) Přihlašovatel:
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA,
Tokyo, JP;

(72) Původce:
Koishihara Yasuo, Gotenba-shi, JP;
Yoshimura Yasushi, Gotenba-shi, JP;

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
140 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Léčebné činidlo pro lymfatické nádory,
protilátka, chimerní protilátka a pozměněná
protilátka**

(57) Anotace:

Léčebné činidlo pro lymfatické nádory /kromě myelomů/, které obsahuje jako svou aktivní složku protilátku, která se specificky váže k proteinu, jehož aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID NO:1 a která má cytotoxickou aktivitu.

Léčebné činidlo pro lymfatické nádory, protilátka, chimerní protilátka a pozměněná protilátka.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se vztahuje k léčebným činidlům pro lymfatické nádory (vyjma myelomů), která obsahují jako aktivní složku protilátky, jež se specificky vážou k proteinům, exprimovaným těmito lymfatickými nádory. Předkládaný vynález se také vztahuje k léčebným činidlům pro nádory T buněk nebo B buněk (vyjma myelomů).

Dále se předkládaný vynález vztahuje k protilátkám, jež se specificky vážou k proteinům, exprimovaným v lymfatických nádorech a které mají cytotoxickou aktivitu.

Dosavadní stav techniky

Lymfatické buňky jsou hlavně zodpovědné za imunitu živých organismů. Všechny lymfatické buňky jsou odvozeny od stejných krvetvorných kmenových buněk, jež jsou uvolňovány do periferní krve po opakované diferenciaci, která probíhá pod vlivem působení různých diferenciaci indukujících faktorů nebo růstových faktorů v kostním morku nebo jiných orgánech. Následkem rozdílů v průběhu této diferenciaci se lymfocyty dělí na B buňky a T buňky. Za B buňky jsou považovány ty, které mají schopnost produkovat protilátky, zatímco za T buňky jsou považovány ty, které mají schopnost prezentace antigenu, působí cytotoxicky a podobně. Když tyto buňky projdou nádorovými změnami z nějakého důvodu nebo během určitých stádií své diferenciaci a začnou nekontrolovatelným způsobem proliferovat v kostním morku, lymfatických tkáních, krvi a podobně, je tento stav nazýván lymfatickým nádorem.

V důsledku zavádění nových technologií, zvláště pokročilých technologií, které užívají monoklonální protilátky proti diferenciacním antigenům na povrchu buněk, se stalo možným určit původ anebo diferenciacní stav lymfatických buněk. Současně s tím se také stalo možným určit nejen zda jsou takové nádorové buňky odvozeny z T buněk nebo B buněk, ale též určit stupeň zralosti nádorových buněk.

Základní klasifikace lymfatických nádorů je na nádory B buněk a na nádory T buněk, což je založeno původu a stupni zralosti nádorových buněk. Na základě stupně zralosti nádorových buněk jsou nádory B buněk klasifikovány jako akutní B lymfatická leukémie (B-ALL), chronická B lymfatická leukémie (B-CLL), pre-B lymfom, Burkittův lymfom, folikulární lymfom, lymfom folikulárního obalu, difúzní lymfom a podobně. Na

druhé straně jsou nádory T buněk na základě stupně zralosti nádorových buněk klasifikovány na akutní T lymfatickou leukémii (T-ALL), chronickou T lymfatickou leukémii (T-CLL), leukémii zralých T buněk (ATL), non-ATL periferní T lymfom (PNTL) a podobně (Zukai Rinsho (GAN) (Illustrated Clinical: Cancer), série č.17 Leukemia and lymphoma, Takashi Sugimura a kol., Medical View Co., Ltd., 1987, B cell tumors, Kiyoshi Takatsuki, Nishimura Shoten, 1991).

Je pravdou, že bez ohledu na nedávné pokroky v lékařských technikách, léčení lymfatických nádorů není uspokojivé. Např. procento vyléčení akutní lymfatické leukémie (ALL) je stále 20% nebo nižší a u lymfomu je v pokročilém stavu asi 50%, ačkoli se říká, že procento vyléčení u B lymfomů je relativně vysoké, díky pokroku v multidrokové léčbě. Navíc T lymfom je odolnější a jeho procento vyléčení je asi 30 %, procento úspěšného vyléčení u leukémie dospělých T buněk (ATL) je v současné době menší než 10 %.

Na druhé straně Goto, T. a kol. popsali monoklonální protilátku (protilátka anti-HM1.24), která byla získána imunizací myši lidskými myelomovými buňkami (Blood (1994) 84, 1922-1930). Když byla podána myši s transplantovanými lidskými myelomovými buňkami, protilátka se hromadila specifickým způsobem v nádorové tkáni (Masaaki Kosaka a kol., Nippon Rinsho (Japan Clinical) (1995) 53, 627-635), což naznačuje, že protilátka anti-HM1.24 může být používána při diagnóze umístění nádoru pomocí radioizotopového značení, při cílených terapiích jako je radioimunoterapie apod. Není však známo, zda je možno použít protilátku anti-HM1.24 pro léčení ostatních lymfatických nádorů.

Podstata vynálezu

Léčebné metody u lymfatických nádorů, které jsou v současnosti používány, zahrnují různé druhy chemoterapií, transplantaci kostního morku a podobně. Jak bylo výše uvedeno, žádná z nich však není dostatečně uspokojivá, a tedy se stále očekává vznik převratných léčebných činidel nebo metod, které budou schopny mírnit lymfatické nádory a prodloužit dobu přežití pacienta.

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout nové léčebné činidlo pro lymfatické nádory, kromě myelomů.

Aby bylo možno poskytnout takové léčebné činidlo, vynálezci prováděli rozsáhlé *in vitro* studie, včetně analýzy pomocí průtokové cytometrie (FCM), určování

cytotoxických aktivit jako je ADCC aktivita, CDC aktivita atd. a *in vivo* studie protinádorových účinků za pomoci protilátek anti-HM1.24 (Goto, T. a kol., Blood (1994) 84, 1922-1939) a studie izolace antigenního proteinu, k němuž se protilátka anti-HM1.24 specificky váže. Výsledkem bylo zjištění, že antigenní protein, rozpoznávaný protilátkou anti-HM1.24 je exprimován na lymfatických nádorech a že protilátka anti-HM1.24 má protinádorový účinek na lymfatické nádory a to tvoří materiál předkládaného vynálezu.

Předkládaný vynález tedy popisuje léčebné činidlo pro lymfatické nádory (vyjma myelomů), které jako svojí aktivní součást obsahuje protilátku, která se specificky váže k proteinu, jež má aminokyselinovou sekvenci, jak je uvedeno v SEQ ID No: 1 a která má cytotoxickou aktivitu.

Předkládaný vynález také popisuje léčebné činidlo pro nádory T buněk nebo léčebné činidlo pro nádory B buněk (vyjma myelomů), které jako svojí aktivní součást obsahuje protilátku, která se specificky váže k proteinu, jež má aminokyselinovou sekvenci, jak je uvedeno v SEQ ID No: 1 a která má cytotoxickou aktivitu.

Předkládaný vynález také popisuje léčebné činidlo pro nádory T buněk nebo léčebné činidlo pro nádory B buněk (vyjma myelomů), které jako svojí aktivní součást obsahuje monoklonální protilátku, která se specificky váže k proteinu, jež má aminokyselinovou sekvenci, jak je uvedeno v SEQ ID No: 1 a která má cytotoxickou aktivitu.

Předkládaný vynález také popisuje léčebné činidlo pro nádory T buněk nebo léčebné činidlo pro nádory B buněk (vyjma myelomů), které jako svojí aktivní součást obsahuje monoklonální protilátku, která se specificky váže k proteinu, jež má aminokyselinovou sekvenci, jak je uvedeno v SEQ ID No: 1 a která má jakožto svoji cytotoxickou aktivitu ADCC aktivitu nebo CDC aktivitu.

Předkládaný vynález také popisuje léčebné činidlo pro nádory T buněk nebo léčebné činidlo pro nádory B buněk (vyjma myelomů), které jako svojí aktivní součást obsahuje monoklonální protilátku, která se specificky váže k proteinu, jež má aminokyselinovou sekvenci, jak je uvedeno v SEQ ID No: 1, která má cytotoxickou aktivitu a které má jako konstantní oblast Cy z lidské protilátky.

Předkládaný vynález také popisuje léčebné činidlo pro nádory T buněk nebo léčebné činidlo pro nádory B buněk (vyjma myelomů), které jako svojí aktivní součást obsahuje chimerní protilátku nebo pozměněnou protilátku, která se specificky váže

k proteinu, jež má aminokyselinovou sekvenci, jak je uvedeno v SEQ ID No: 1 a která má cytotoxickou aktivitu.

Předkládaný vynález také popisuje léčebné činidlo pro nádory T buněk nebo léčebné činidlo pro nádory B buněk (vyjma myelomů), které jako svojí aktivní součást obsahuje protilátku, která se specificky váže k epitopu, rozpoznávanému protilátkou anti-HM1.24.

Předkládaný vynález také popisuje léčebné činidlo pro nádory T buněk nebo léčebné činidlo pro nádory B buněk (vyjma myelomů), které jako svojí aktivní součást obsahuje protilátku anti-HM1.24.

Dále se předkládaný vynález vztahuje k protilátce, která se specificky váže k proteinu, exprimovanému na lymfatických nádorech a která má cytotoxickou aktivitu. Postupy, použité při provedení vynálezu.

1. Příprava protilátek

1-1. Příprava hybridomů

Hybridomy produkující protilátky, používané v předkládaném vynálezu, mohou být v podstatě vytvořeny pomocí známého postupu, popsaného níže. Tedy antigenní protein HM1.24 nebo buňky, které jej exprimují, mohou být použity jako senzibilizující antigen a jsou použity k imunizaci, provedené běžným imunizačním postupem. Takto získané imunní buňky jsou pak fúzovány se známými rodičovskými buňkami, za použití běžného způsobu buněčné fúze, poté je provedeno hromadné vyšetření běžným hromadně vyšetřovacím postupem, aby byly selektovány buňky, produkující monoklonální protilátky.

Přesněji řečeno, monoklonální protilátky mohou být získány následujícím způsobem. Např. jako buňky exprimující HM1.24 antigen, který je sensibilizující antigen pro získání protilátky, může být použita buněčná linie KPMM2 z mnohočetného myelomu (Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 7-236475) nebo buněčná linie KPC-32 (Goto, T. a kol., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 3, 1400). Popřípadě může být jako sensibilizující antigen použit protein, který má aminokyselinovou sekvenci, která je uvedena v SEQ ID No: 1, nebo peptid či polypeptid, obsahující epitop rozpoznávaný protilátkou anti-HM1.24.

Zde je to provedeno tak, že cDNA, kódující protein, který má aminokyselinovou sekvenci, která je uvedena v SEQ ID No: 1, byl vložen do štěpného místa pro XbaI vektoru pUC19, čímž byl zkonstruován plazmid pRS38-pUC19. E. coli, obsahující tento

plazmid byla uložena pro mezinárodní použití podle ustanovení Budapešťské smlouvy jako *Escherichia coli* DH5 α (pRS38-pUC19) 5. října 1993 v National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, jako FERM BP-4434 (viz Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 7-196694). Fragment cDNA, obsažený v tomto plazmidu pRS38-pUC19, může být použit při využití technologie genetického inženýrství, pro přípravu peptidu nebo polypeptidu, obsahujícího epitop rozpoznávaný protilátkou anti-HM1.24.

Pro imunizaci sensibilizujícím antigenem jsou používáni převážně savci a při výběru se bere v úvahu jejich kompatibilita s rodičovskými buňkami při buněčné fúzi. Obecně se jedná, mimo jiné, o hlodavce jako jsou myši, krysy a podobně.

Imunizace savců sensibilizujícím antigenem se provádí běžně známými postupy. Obecný postup, např. zahrnuje intraperitoneální nebo subkutánní podání sensibilizujícího antigenu savci. Přesněji řečeno, sensibilizující antigen, který byl zředěn a suspendován ve vhodném množství solného roztoku pufovaného fosfátem (PBS) nebo fyziologického solného roztoku atd., je smíchán jak je požadováno, s vhodným množstvím kompletního Freudova adjuvans. Po emulgaci je s výhodou podáván savcům několikrát každé 4 až 21 dnů. Alternativně je možno použít v době imunizace se sensibilizujícím antigenem vhodný nosič.

Po imunizaci a potvrzení, že došlo ke zvýšení hladiny požadovaných protilátek v séru, jsou imunní buňky ze zvířete odebrány a je s nimi provedena buněčná fúze, při které se přednostně jako imunní buňky užívají buňky sleziny.

Jako savčí myelomové buňky, jakožto druhé rodičovské buňky, se kterými je prováděna buněčná fúze s výše uvedenými imunními buňkami, se přednostně užívají různé známé buněčné linie, jako jsou P3X63AG8.653 (*J. Immunol.* (1979) 123: 1548-1550), P3X63AG8U.1 (*Current Topics in Microbiology and Immunology* (1978) 81: 1-7) NS-1 (Kohler, G. a Milstein, C., *Eur. J. Immunol.* (1976) 6: 511-519), MPC-11 (Margulies, D.H. a kol., *Cell* (1976) 8: 405-415), SP2/0 (Shulman, M. a kol., *Nature* (1978) 276: 269-270), FO (de St. Groth, S.F. a kol., *J. Immunol. Methods* (1980) 35: 1-21), S194 (Trowbridge, I.S., *J. Exp. Med.* (1978) 148: 313-323), R210 (Galfre, G. a kol., *Nature* (1979) 277: 131-133) a podobné.

Buněčná fúze mezi výše uvedenými imunními buňkami a myelomovými buňkami může být v podstatě provedena podle známého postupu, jaký je popsán v Milstein a kol., (Kohler, G. a Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46) či podobného.

Přesněji řečeno, výše uvedená buněčná fúze je provedena v běžném živném bujónu, za přítomnosti, např. urychlovače buněčné fúze. Jako urychlovač buněčné fúze, může být použit např. polyetylglykol (PEG), virus Sendai (HVJ) a navíc může být pro zvýšení efektivity fúze přidán adjuvans, jako je dimethylsulfoxid atd.

Výhodný poměr imunních a myelomových buněk, který se má použít, je např. jedenkrát až desetkrát více imunních buněk než myelomových buněk. Příklady kultivačních médií, která se používají pro výše uvedenou buněčnou fúzi, jsou médium RPMI 1640 a médium MEM, vhodná pro růst výše uvedených myelomových buněčných linií a běžné kultivační médium, užívané pro tento typ buněčné kultury, kromě toho může být přidáno jako doplněk sérum, jako např. fetální telecí sérum (FCS).

Při buněčné fúzi jsou smíchána předem stanovená množství imunních buněk a myelomových buněk důkladně promíchány v uvedeném kultivačním médiu, k němuž byl přidán roztok PEG, předem zahřátý na 37 °C, např. roztok PEG s průměrnou molekulovou hmotností 1000 až 6000, je přidán v koncentraci 30 až 60 % (w/v) a míchány, až se dosáhne požadované fúze buněk (hybridomy). Poté opakováním postupného přidávání vhodného kultivačního média a centrifugací, po které se odstraní supernatant, může být odstraněno činidlo, podporující buněčnou fúzi, které je však nežádoucí pro růst hybridomů.

Uvedené hybridomy jsou vybírány pomocí kultivace v běžném selektivním médiu, např. kultivační médium HAT (kultivační roztok obsahující hypoxantin, aminopterin a tymidin). Kultivace v uvedeném kultivačním médiu HAT probíhá obecně po dobu, dostatečnou pro usmrcení buněk, jiných než požadované hybridomy (nezfúzované buňky), což je obecně několik dnů až několik týdnů. Pak se provede běžná metoda koncového ředění, pomocí níž jsou vybrány hybridomy, které produkují požadované protilátky, a jsou dále monoklonálně klonovány.

Vedle získávání výše uvedených hybridomů pomocí imunizace živočichů jiných než je člověk s pomocí antigenu, je také možno senzibilizovat lidské lymfocyty *in vitro* pomocí antigenu nebo pomocí buněk, exprimujících antigen HM1.24 a výsledné senzibilizované lymfocyty jsou fúzovány s lidskými myelomovými buňkami, např. s U266, aby byla získána požadovaná lidská protilátka, mající schopnost vázat se

k antigenu HM1.24 nebo k buňkám, exprimujícím antigen HM1.24 (viz Japanese Post-examined Patent Publication (Kohoku) No. 1-59878). Další možností je, že transgenní živočich, který má soubor všech lidských protilátkových genů, je imunizován antigenem, tj. HM1.24 nebo buňkami exprimujícími antigen HM1.24, čímž je získána požadovaná lidská protilátka, jak bylo již dříve popsáno (viz International Patent Applications WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/ 25585, WO 96/34096 a WO 96/33735).

Takto konstruované hybridomy produkující monoklonální protilátky, mohou být kultivovány v běžném kultivačním médiu nebo mohou být uloženy po dlouhou dobu v tekutém dusíku.

Pro získání monoklonálních protilátek z uvedených hybridomů lze uvést postup, při kterém je hybridom kultivován běžným způsobem a protilátky jsou získány v supernatantu, nebo postup při kterém je hybridom podán a kultivován v těle živočicha, jež je kompatibilní pro uvedený hybridom a protilátky jsou získány z ascitů. Prvně uvedený postup je vhodný pro získání vysoce čistých protilátek, zatímco druhý je vhodný pro produkci protilátek ve velkém množství.

Přesněji řečeno, hybridomy produkující protilátky anti-HM1.24, mohou být zkonstruovány způsobem podle Goto T. a kol., (Blood (1994) 84: 1922-1930). Toto může být provedeno tím způsobem, že hybridom produkující protilátky anti-HM1.24, který byl uložen pro mezinárodní použití za podmínek Budapešťské smlouvy jako FERM BP-5233 dne 14. září 1995 organizací National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, je intraperitoneálně podán myši BALB/c (vypěstována v CLEA Japan) aby byl získán ascitus, ze kterého je purifikována protilátka anti-HM1.24: nebo způsobem, kdy výše uvedený hybridom je kultivován ve vhodném kultivačním médiu jako je médium RPMI 1640, obsahující 10 % fetálního telecího séra a 5 % BM-Condimed H1 (vyrobena Boehringer-Mannheim), médium pro hybridomy SFM (vyrobena GIBCI-BRL), médium PFHM-II (vyrobena GIBCI-BRL) či v podobných a protilátky mohou být purifikovány ze supernatantu.

1-2. Rekombinantní protilátky

Rekombinantní protilátka, která byla produkována pomocí rekombinantní genové technologie, při níž protilátkový gen byl klonován z hybridomu a zabudován do vhodného vektoru jež byl pak vnesen do hostitele, může být v předkládaném vynálezu

použita jako monoklonální protilátka (viz např. Carl, A. K., Borrebaeck, and James, W. Larrick, THERAPEUTICAL MONOCLONAL ANTIBODIES, publikováno v MACMILLAN PUBLISHERS LTD. 1990, Velká Británie).

Přesněji řečeno, mRNA kódující variabilní oblast (V oblast, V region) požadované protilátky je izolována z hybridomu, který tuto protilátku produkuje. Izolace mRNA je provedena tak, že se připraví celková RNA pomocí např. známého postupu jako je guanidinová ultracentrifugační metoda (Chirgwin, J. M. a kol., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), AGPC metodou (Chomczynski, P. a kol., Analytical Biochemistry (1987) 162, 156-159) a poté je mRNA z celkové RNA purifikována pomocí soupravy mRNA Purification kit (vyrobena Pharmacia) nebo podobně. Jinou možností je připravit mRNA pomocí soupravy Quick Prep mRNA kit (vyrobena Pharmacia).

cDNA pro V oblast protilátky může být nasyntetizována z takto získané mRNA pomocí reverzní transkriptázy. cDNA může být nasyntetizována pomocí soupravy AMV Reverse Transkriptase First-strand cDNA Synthesis Kit či podobně. Jinou možností je pro syntézu a amplifikaci cDNA použít soupravu 5'-Ampli FINDER RACE Kit (vyrobena Clontech) a lze použít metodu 5'-RACE (Frohman, M. A. a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavski, A. a kol., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932), která využívá polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Požadovaný fragment DNA je ze získaného PCR produktu vyčištěn a může být ligován do vektorové DNA. Z toho je dále konstruován rekombinantní vektor a ten je poté vnesen do E. coli atd., z jejichž vybraných kolonií je požadovaný rekombinantní vektor připraven. Nukleotidová sekvence požadované DNA může být potvrzena pomocí známé metody, jako je např. dideoxy metoda.

Jakmile je jednou DNA, kódující V oblast požadované protilátky získána, může být ligována do DNA kódující konstantní oblast (C oblast) požadované protilátky, která je potom zabudována do expresního vektoru. Jinou možností je zabudovat DNA, kódující V oblast protilátky do expresního vektoru, který již obsahuje DNA, kódující C oblast protilátky.

Aby bylo možno produkovat protilátku, používanou v předkládaném vynálezu, protilátkový gen je zabudován způsobem, který je popsán níže, do expresního vektoru tak, aby byl exprimován pod kontrolou expresně regulační oblasti, např. zesilovače transkripce anebo promotoru. Následně může být expresní vektor transformován do hostitelské buňky a protilátka může být exprimována v ní.

1-3. Pozměněné protilátky

Podle předkládaného vynálezu může být za účelem snížení heterologní antigenicity proti člověku použita uměle pozměněná rekombinantní protilátka, jako je chimerní protilátka nebo pozměněná protilátka. Tyto pozměněné protilátky mohou být vytvořeny pomocí známých postupů.

Chimerní protilátku lze získat ligováním získané DNA, kódující V oblast protilátky do DNA, kódující C oblast lidské protilátky, která je pak vložena do expresního vektoru a vnesena do hostitele, vhodného pro produkci protilátek (viz European Patent Application EP 125023 a International Patent Application WO 96/02576). Za pomoci těchto známých metod lze získat chimerní protilátky, použitelné pro předkládaný vynález.

Např. E. coli, nesoucí plazmid, který obsahuje DNA kódující L řetězec V oblasti nebo H řetězec V oblasti chimerní protilátky anti-HM 1.24 protilátky byla uložena pro mezinárodní použití za podmínek Budapeštské smlouvy jako Escherichia coli DH5 α (pUC19-1.24L-gk) a Escherichia coli DH5 α (pUC19-1.24H-g γ 1), dne 29. srpna 1996 organizací National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, jako FERM BP-5646 a FERM BP-5644 (viz Japanese Patent Application No. 9-271536).

Pozměněná protilátka, která je též označována pozměněná lidská protilátka byla vytvořena připojením oblasti, která určuje komplementaritu (CDR) v protilátce jiného savce než je člověk, např. myši, do CDR lidské protilátky. Obecné DNA rekombinanční technologie pro přípravu takových protilátek jsou rovněž známy (viz European Patent Application EP 125023 a International Patent Application WO 96/02576).

Podrobněji řečeno, DNA sekvence navržená tak, aby byla spojena CDR myši protilátky s podpůrnou oblastí (FR - framework region) lidské protilátky, je syntetizována pomocí metody PCR z několika oddělených oligonukleotidových úseků, které se vzájemně překrývají na svých koncích. Takto získaná DNA je spojena s DNA, kódující C oblast lidské protilátky a poté je vložena do expresního vektoru, jež je potom vnesen do hostitele (viz European Patent Application EP 239400 a International Patent Application WO 96/02576).

Podpůrné oblasti (FR - framework region) lidské protilátky, spojené pomocí oblastí, které určují komplementaritu (CDR) jsou vybrány tak, aby oblasti určující

komplementaritu vytvořily místo, které je schopno vázat požadovaný antigen. Pokud je potřeba, aminokyseliny v podpurných oblastech variabilních částí protilátek mohou být zaměněny tak, že oblasti určující komplementaritu v pozměněných protilátkách vytvoří místo, které je schopno vázat požadovaný antigen (Sato, K. a kol., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

Například E. coli, nesoucí plazmid, který obsahuje DNA kódující verzi a (SEQ ID NO: 2) L řetězce V oblasti a E. coli, nesoucí plazmid, který obsahuje DNA kódující verzi r (SEQ ID NO: 3) H řetězce V oblasti pozměněné anti-HM 1.24 protilátky byly uloženy pro mezinárodní použití za podmínek Budapešťské smlouvy jako Escherichia coli DH5 α (pUC19-RVLa-AHM-gk) a Escherichia coli DH5 α (pUC19-RVHr-AHM-gy1) dne 29. srpna 1996 organizací National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, jako FERM BP-5645 a FERM BP-5643 (viz Japanese Patent Application No. 9-271536). Dále E. coli, nesoucí plazmid, který obsahuje DNA kódující verzi s (SEQ ID NO: 4) H řetězce V oblasti pozměněné anti-HM 1.24 protilátky byla uložena pro mezinárodní použití za podmínek Budapešťské smlouvy jako Escherichia coli DH5 α (pUC19-RVHs-AHM-gy1) dne 29. srpna 1997 organizací National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, of 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, jako FERM BP-6127 (viz Japanese Patent Application No. 9-271536).

Pro chimerní protilátku nebo pozměněnou protilátku je používána C oblast lidské protilátky, přičemž nejvýhodnější je použít jakožto konstantní oblast lidské protilátky Cy jako jsou Cy1, Cy2, Cy3 a Cy4. Z takto připravených protilátek mají protilátky, které obsahují Cy1 a Cy3 silnou cytotoxickou aktivitu, tj. ADCC aktivitu a CDC aktivitu a tedy jsou s výhodou používány v předkládaném vynálezu.

Chimerní protilátky obsahují variabilní oblast protilátky odvozenou ze savčího druhu (nikoli však člověka) a C oblast odvozenou z lidské protilátky, zatímco u pozměněné protilátky jsou oblasti určující komplementaritu protilátky odvozené ze savčího druhu (nikoli však člověka) a podpurné oblasti (FRs) spolu s C oblastí protilátky odvozené z lidské protilátky. V souhlase s tím, jejich antigenicita v lidském těle je redukována tak, že jsou použitelné jako aktivní složky léčebných činidel, připravených podle předkládaného vynálezu.

Výhodné provedení pozměněné protilátky, vhodné pro použití v rámci předkládaného vynálezu zahrnuje pozměněné protilátky anti-HM 1.24 (viz Japanese Patent Application No. 9-271536). Výhodné provedení L řetězce V oblasti pozměněné protilátky anti-HM 1.24 zahrnuje takové, které má aminokyselinovou sekvenci kódovanou nukleotidovou sekvencí, která je uvedena v SEQ ID NO: 2. Výhodné provedení H řetězce V oblasti pozměněné protilátky anti-HM 1.24 zahrnuje takové, které má aminokyselinovou sekvenci kódovanou sekvencí bazí, která je uvedena v SEQ ID NO: 2 nebo SEQ ID NO: 4.

1-4. Exprese a produkce

Protilátkové geny, zkonstruované tak, jak bylo výše popsáno, mohou být exprimovány a získány tak protilátky, to vše pomocí známých postupů. V případě savčích buněk může být exprese docílena za použití expresního vektoru, který obsahuje běžně užívaný užitečný promotor, protilátkový gen, který má být exprimován a DNA, v níž je operativně vázán signál poly-A ve směru 3' od tohoto genu (ve směru transkripce), nebo vektor, obsahující uvedenou DNA. Příkladem promotoru/zesilovače transkripce může být bezprostředně časný promotor/zesilovač cytomegaloviru.

Dále lze jako promotor/zesilovač pro expresi protilátky pro použití v předkládaném vynálezu, využít virové promotory/zesilovače jako jsou retrovirus, polyomavirus, adenovirus a opičí virus 40 (SV40), dále promotory/zesilovače odvozené ze savčích buněk, jako je např. lidský elongační faktor 1 α (HEF1 α).

Např. exprese může být snadno docílena pomocí metody Mulligan a kol., (Nature (1979) 277, 108), kdy je použit promotor/zesilovač z SV40, nebo metoda Mizushima a kol., (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322), kdy je použit promotor/zesilovač HEF1 α .

V případě E. coli lze dosáhnout exprese operativním připojením běžně užívaného promotoru, signální sekvence pro sekreci protilátky a genu pro protilátku, jež má být exprimována, po čemž následuje vlastní exprese tohoto genu. Jako příklad promotoru lze zmínit lacZ promotor a araB promotor. Metodu podle Ward a kol., (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) je možno uplatnit při použití promotoru lacZ, zatímco metodu podle Better a kol., (Science (1988) 240, 1041-1043) je možno uplatnit při použití promotoru araB.

Jako signální sekvenci pro sekreci protilátky, když je produkována do perioplazmatického prostoru E. coli, je možno použít signální sekvenci pelB (Lei, S. P. a

kol., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379). Po oddělení protilátky, produkované do periplazmatického prostoru, je struktura protilátky před použitím vhodným způsobem upravena (viz např. WO 96/30394).

Jako počátek replikace je možno použít počátek replikace odvozený z SV40, polyomaviru, adenoviru, hovězího papillomaviru (BPV) a podobně. Navíc pro zmnožení počtu kopií genu v hostitelském buněčném systému, může expresní vektor obsahovat jakožto selektivní marker gen pro aminoglykozid transferázu (APH), gen pro thymidin kinázu, gen pro xanthin guaninfosforyl transferázu (Ecogpt) *E. coli* a podobně.

Pro produkci protilátek, používaných v předkládaném vynálezu, je možno použít jakýkoli produkční systém. Produkční systém pro přípravu protilátek zahrnuje *in vitro* a *in vivo* produkční systém. Jako *in vitro* produkční systém je možno zmínit produkční systém, který využívá eukaryotické buňky a produkční systém, který využívá prokaryotické buňky.

Pokud jsou používány eukaryotické buňky, jedná se o produkční systémy, které využívají živočišné buňky, rostlinné buňky či buňky hub. Známé živočišné buňky zahrnují (1) savčí buňky jako jsou buňky CHO, COS buňky, myelomové buňky, buňky z novorozených křečků (baby hamster cells – BHK), HeLa buňky a Vero buňky, (2) buňky obojživelníků, jako je oocyty druhu *Xenopus* nebo (3) hmyzí buňky, jako jsou sf9, sf21 a Tn5. Mezi známé rostlinné buňky lze zahrnout např. ty, které jsou odvozené z rodu *Nicotiana*, přesněji buňky odvozené z *Nicotiana tabacum*. Jako známé buňky hub je možno uvést kvasinky, jako je rod *Saccharomyces*, přesněji *Saccharomyces cereviceae*, nebo vláknité houby, jako je rod *Aspergillus*, přesněji *Aspergillus niger*.

Pokud jsou používány prokaryotické buňky, jedná se o produkční systémy, které využívají bakteriální buňky. Jako známé bakteriální buňky je možno uvést *Escherichia coli* (*E. coli*) a *Bacillus subtilis*.

Tím, že je pomocí transformace gen požadované protilátky vnesen do těchto buněk a takto transformované buňky jsou kultivovány *in vitro*, je možno dosáhnout produkce protilátek. Kultivování je prováděno známými metodami. Např. jako kultivační média mohou být použity DMEM, MEM, RPMI1640 a IMDM, jako sérový doplněk média je možno použít fetální telecí sérum (FCS). Dále mohou být protilátky produkovány *in vivo* tak, že buňky, do kterých byl vnesen gen pro protilátku, jsou implantovány do břišní dutiny živočicha.

Jako další in vivo produkční systémy je možno uvést ty, které využívají živočichy a ty, které využívají rostliny. Pokud jsou využíváni živočichové, jedná se o produkční systémy, které využívají savce a hmyz.

Ze savců mohou být využity kozy, vepři, ovce, myši a hovězí dobytek (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Pokud se týká hmyzu, je možno využít bource morušového.

Pokud se týká rostlin, lze např. využít tabák.

Geny pro protilátku jsou vneseny do těchto živočichů nebo rostlin, protilátky jsou v těchto živočiších nebo rostlinách produkovány a z nich získávány. Např. gen pro protilátku je vnesen doprostřed genu, kódujícího protein, který je přirozeně produkován v mléku, jako např. kozí β kasein, tímto způsobem je vytvořen fúzní gen. Fragmenty DNA, které obsahují fúzní gen, do něhož byl vložen gen pro protilátku, jsou injikovány do kozích embryí a tato embrya jsou vložena do kozy. Požadovaná protilátka je získána z mléka, produkovaného transgenní kozou, která se narodila koze, jež obdržela toto embryo, nebo z mléka jeho potomka. Aby se zvýšilo množství mléka obsahujícího požadovanou protilátku a produkované transgenní kozou, pokud je to vhodné, lze transgenní koze podávat hormony. (Ebert, K. M. a kol., Bio/Technology (1994) 12, 699-702).

Pokud je použit bourec morušový, pak bakulovirem, do něhož byl vložen gen pro požadovanou protilátku, je infikován bourec morušový a požadovanou protilátku je možno získat z tělní tekutiny bource morušového (Susumu, M. a kol., Nature (1985) 315, 592-594). Dále, pokud je použit tabák, gen pro požadovanou protilátku je vložen do expresního vektoru pro rostliny, např. do pMON 530 a poté je vektor vnesen do bakterie jako je *Agrobacterium tumefaciens*. Touto bakterií je dále infikován tabák, jako je *Nicotiana tabacum*, aby bylo možno získat požadovanou protilátku z tabákových listů (Julian, K. – C. Ma a kol., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

Když je protilátka produkována in vitro či in vivo produkčními systémy, jak je popsáno výše, DNA kódující těžký řetězec (H řetězec) nebo lehký řetězec (L řetězec) protilátky může být vložena do expresních vektorů odděleně ale hostitelské buňky jsou jimi transformovány současně, nebo DNA kódující H řetězec a L řetězec mohou být spojeny v jednom expresním vektoru a hostitelské buňky jsou jím transformovány (viz International Patent Application WO 94/11523).

Protilátka, produkovaná výše popsaným způsobem, může být vázána k různým molekulám jako je polyetylenglykol (PEG) a použita jakožto modifikovaná protilátka. Výraz „protilátka“, jak je užíván zde, zahrnuje i tyto modifikované protilátky. Aby byla získána taková modifikovaná protilátka, získaná protilátka může být modifikována chemicky. Takové metody již byly v oboru zavedeny.

2. Oddělení a čištění protilátky.

2-1. Oddělení a čištění protilátky

Protilátky, které jsou produkovány a exprimovány výše uvedeným způsobem, mohou být odděleny zevnitř buňky, od buňky nebo z hostitele a poté vyčištěny do homogenního stavu. Oddělení a čištění protilátky pro použití v rámci tohoto vynálezu lze provést afinitní chromatografií. Jako sloupce, vhodné pro takovou afinitní chromatografii, je možno uvést sloupec s Proteinem A a sloupec s Proteinem G. Příklady nosičů, použité pro sloupec s Proteinem A, jsou Hyper A, POROS, Sepharosa F. F. a podobně.

Popřípadě zde lze použít bez jakéhokoli omezení i ostatní metody pro oddělení a čištění, běžně užívané pro proteiny. Oddělení a čištění protilátky pro použití v rámci tohoto vynálezu lze provádět různým kombinováním i jiných vhodných chromatografických postupů, než je výše uvedená afinitní chromatografie, dále filtrace, ultrafiltrace, vysolování, dialýza a podobně. Chromatografie zahrnuje např. iontoměnnou chromatografii, hydrofobní chromatografii, filtrace na gelu a podobně. Tyto chromatografické postupy mohou být provedeny na HPLC. Jinou možností je chromatografie na reverzní fázi.

2-2. Určení koncentrace protilátek

Koncentrace protilátek, získaných ve výše uvedeném bodě 2-1 může být určena měřením absorbance, nebo ELISA testem (enzyme-linked immunosorbent assay) a podobně. Když je tedy použito měření absorbance, je protilátka, pro použití v tomto vynálezu, nebo vzorek, protilátku obsahující, vhodně naředěn pomocí PBS(-), poté je při 280 nm měřena absorbance a následuje výpočet pomocí absorpčního koeficientu, který uvádí 1,35 OD při koncentraci 1 mg/ml. Když je pro měření koncentrace protilátek použita metoda ELISA, postup probíhá následovně. Sto μ l kozího protilidského IgG (vyrobena BIO SOURCE) zředěného na koncentraci 1 μ g/ml v 0,1 M pufru kyselého uhličitanu sodného, pH 9,6, je nakapáno na 96-jamkovou destičku (vyrobena NUNC) a je inkubováno přes noc při teplotě 4 °C, aby došlo k navázání protilátek.

Po blokování je přidáno 100 μ l vhodné ředěné protilátky, připravené podle tohoto vynálezu, nebo vzorku, obsahujícího protilátky, nebo 100 μ l lidského IgG o známé koncentraci (jako standard) a inkubováno 1 hodinu při teplotě místnosti. Po promytí je přidáno 100 μ l 5000-krát zředěné protilidské IgG protilátky, značené alkalickou fosfatázou (vyrobena BIO SOURCE) a inkubováno 1 hodinu při teplotě místnosti. Po promytí je přidán roztok substrátu, inkubováno a následovalo měření absorbance při 405 nm na přístroji MICROPLATE READER Model 3550 (vyrobena Bio-Rad), na jehož základě byla spočtena koncentrace požadované protilátky.

3. FCM analýza

Reaktivita protilátky, vhodné pro použití v předkládaném vynálezu pro reakci s lymfatickými nádorovými buňkami, může být zjišťována metodou průtokové cytometrické analýzy (FCM – flow cytometry analysis). Je možno použít buď buňky z již ustavených buněčných linií, tak buňky čerstvě izolované. Z ustavených buněčných linií je možno použít jakožto T buněčnou linii např. RPMI 8402 (ATCC CRL-1994), CCRF-CEM (ATCC CCL-119) odvozené z akutní lymfoblastické leukémie, HPB-ALL (FCCH1018) odvozené z akutní lymfatické leukémie, HPB-MLT (FCCH1019) odvozené z T lymfomu, JM (FCCH1023) odvozené z akutní lymfatické leukémie, MOLT-4 (ATCC CRL-1582) odvozené z akutní lymfoblastické leukémie, Jurkat (FCCH1024) odvozené z akutní lymfatické leukémie, CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1) odvozené z akutní lymfoblastické leukémie, MT-1 (FCCH1043) odvozené z leukémie zralých T buněk, KT-3 odvozené z Lennertova lymfomu (Shimizu, S. a kol., Blood (1988) 71, 196-203) apod., jakožto B buněčnou linii např. buňky CESS, transformované EB virem (ATCC TIB-190), na EB virus pozitivní B buňky SKW 6.4 (ATCC TIB-215), MC116 (ATCC CRL-1649) odvozené z B lymfomu, CCRF-SB (ATCC CCL-120) odvozené z akutní lymfoblastické leukémie, B buňky RPMI 6410 (FCCH6047) odvozené z pacienta s akutní myelocytickou leukémií, Daudi (ATCC CCL-213) odvozené z Burkittova lymfomu, Jijoye (ATCC CCL-87) odvozené z Burkittova lymfomu, Raji (ATCC CCL-86) odvozené z Burkittova lymfomu, a jakožto non-T, non-B buněčnou linii HL-60 (ATCC CCL-240) odvozené z akutní myelocytické leukémie, THP-1 (ATCC TIB-202) odvozené z akutní monocytické leukémie, U-937 (ATCC CRL-1593) odvozené z vazivového lymfomu, K-562 (ATCC CCL-243) odvozené z chronické myelocytické leukémie, a podobné.

Po promytí výše uvedených buněk v PBS(-) je k nim přidáno 100 μ l protilátek nebo kontrolních protilátek, zředěných na 25 μ g/ml v pufru FACS (PBS(-) obsahující 2 % fetálního hovězího séra a 0,1 % azidu sodného) a inkubováno na ledu 30 minut. Po promytí pufrům FACS je přidáno 100 μ l 25 μ g/ml kozí protimyšší protilátky značené FITC (GAM, vyrobeno Becton Dickinson) a inkubováno na ledu 30 minut. Po promytí pufrům FACS jsou buňky suspendovány v 600 μ l nebo 1 ml pufru FACS a u každé buňky může být změřena intenzita fluorescence pomocí skenovacího přístroje (FACScan, vyrobeno Becton Dickinson).

Z naměřené hodnoty intenzity fluorescence u každé buňky, lze zjistit reaktivitu protilátky, používané v předkládaném vynálezu, s každou jednotlivou buňkou. Tedy z naměřené hodnoty intenzity fluorescence u každé buňky, lze zjistit zda antigen HM1.24 je exprimován na jednotlivých buňkách (buňka je pozitivní či negativní) a též stupeň této exprese. Přítomnost a intenzita exprese antigenu HM1.24 v buňkách lymfatického nádoru je popsána v příkladu 2.2. FCM analýza, uvedeném dále.

Nádorové buňky lymfatických nádorů, které mohou být léčebným cílem předkládaného vynálezu, exprimují antigen HM1.24. Přesněji řečeno, nádorové buňky lymfatických nádorů jsou přednostně ty, v nichž procento positivity na antigen HM1.24 není nižší než 5 %. Přesněji řečeno, nádorové buňky lymfatických nádorů jsou přednostně ty, v nichž procento positivity na antigen HM1.24 je 20 % nebo vyšší. Přesněji řečeno, nádorové buňky lymfatických nádorů jsou přednostně ty, v nichž procento positivity na antigen HM1.24 je 50 % nebo vyšší. Přesněji řečeno, nádorové buňky lymfatických nádorů jsou přednostně ty, v nichž procento positivity na antigen HM1.24 je 80 % nebo vyšší.

4. Cytotoxická aktivita

4-1. Měření CDC aktivity

Protilátka vhodná pro použití v předkládaném vynálezu je např. taková, která má CDC aktivitu jakožto cytotoxickou aktivitu.

CDC aktivita léčebného činidla proti lymfatickým nádorům, připraveného podle předkládaného vynálezu, může být měřena následujícím způsobem. Zprv je ve vhodném médiu, např. v médiu RPMI1640, obsahujícím 10 % fetálního hovězího séra (vyrobena GIBCO-BRL), připraveny cílové buňky v koncentraci 4×10^5 buněk/ml. Jako cílové buňky lze použít CCRF-CEM (ATCC CCL-119), CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1), HPB-MLT (FCCH1019), EB-3 (ATCC CCL-85), M116 (ATCC CRL-1649) CCRF-

SB (ATCC CCL-120), K-562 (ATCC CCL-243) a podobně. Padesát μ l těchto buněk je přidáno do 96-jamkové destičky (s rovným dnem) (vyrobena FALCON) a destička je inkubována přes noc v CO₂ inkubátoru při 37 °C.

Poté je přidána protilátka, jejíž CDC aktivita je měřena, inkubace pokračuje 60 minut a poté je přidán vhodně ředěný komplement, např. Baby Rabitt Complement (vyrobena CEDARLANE) a inkubován 2 hodiny. Do každé jamky je přidáno 10 μ l Alamar Bule (vyrobena BIO SOURCE), inkubováno 4 hodiny a poté je měřena intenzita fluorescence (excitační vlnová délka 530 nm, emisní vlnová délka 590 nm) za použití měřicího systému CytoFluor 2350 (vyrobena MILLIPORE). Cytotoxickou aktivitu (%) je možno spočítat jako $(A-C) / (B-C) \times 100$, kde A je intenzita fluorescence při inkubaci v přítomnosti protilátky, B je intenzita fluorescence při inkubaci samotného média bez protilátek a C je intenzita fluorescence v jamce bez buněk.

4-2. Měření ADCC aktivity

Protilátka vhodná pro použití v předkládaném vynálezu je např. taková, která má ADCC aktivitu jakožto cytotoxickou aktivitu.

ADCC aktivita léčebného činidla proti lymfatickým nádorům, připraveného podle předkládaného vynálezu, může být měřena následujícím způsobem. Zprvce jsou centrifugační metodou z lidské periferní krve nebo kostního morku izolovány mononukleární buňky, které budou v testu použity jakožto efektorové buňky. Jako cílové buňky jsou CCRF-CEM (ATCC CCL-119), CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1), HPB-MLT (FCCH1019), EB-3 (ATCC CCL-85), M116 (ATCC CRL-1649) CCRF-SB (ATCC CCL-120), K-562 (ATCC CCL-243) nebo podobné označeny ⁵¹Cr. Poté je ke značeným cílovým buňkám přidána protilátka, u které je měřena ADCC aktivita a inkubováno. K cílovým buňkám jsou pak ve vhodném poměru přidány buňky efektorové a pokračováno v inkubaci.

Po inkubaci je sebrán supernatant a měřena jeho aktivita pomocí měřiče γ záření, přičemž 1% NP-40 je možno použít pro změření maximální volné radioaktivity. Cytotoxickou aktivitu (%) je možno spočítat jako $(A-C) / (B-C) \times 100$, kde A je radioaktivita (cpm) uvolněná v přítomnosti protilátky, B je radioaktivita (cpm) uvolněná pomocí NP-40 a C je radioaktivita (cpm) uvolněná samotným médiem bez protilátek.

4-3. Zesílení cytotoxické aktivity

Aby se projevila cytotoxická aktivita, jako je ADCC aktivita a CDC aktivita, je výhodné použít jakožto konstantní oblast (C oblast) protilátek u lidí Cy, zvláště Cy1 a

Cy3. Dále je možno indukovat silnější ADCC aktivitu nebo CDC aktivitu přidáním, záměnou nebo modifikací části aminokyselin v C oblasti protilátky.

Jako příklad je možno zmínit konstrukci polymeru z IgG, napodobujícího IgM (IgM-like) pomocí substituce aminokyselin (Smith, R. I. F. & Morrison, S. L. *BIO/TECHNOLOGY* (1994) 12, 683-688), konstrukci polymeru z IgG, napodobujícího IgM (IgM-like) pomocí přidání aminokyselin (Smith, R. I. F. a kol., *J. Immunology* (1995) 154, 2226-2236), exprese tandemově vázaného genu, kódujícího L řetězec (Shuford, W. a kol., *Science* (1991) 252, 724-727), dimerizaci IgG pomocí substituce aminokyselin (Caron P. C. a kol., *J. Exp. Med.* (1992) 176, 1191-1195, Shopes, B., *J. Immunology* (1992) 148, 2918-2922), dimerizaci IgG pomocí chemické modifikace (Wolff, E. A. a kol., *Cancer Res.* (1993) 53, 2560-2565) a zavedení efektorové funkce pomocí změny aminokyseliny (aminokyselin) v kloubové oblasti protilátky (Norderhaug, L. a kol., *Eur. J. Immunol.* (1991) 21, 2379-2384) a podobně. Tyto přístupy mohou být uskutečněny buď využitím místně-specifické mutagenese pomocí primeru, přidáním sekvence bází pomocí restričního štěpného místa, použitím chemického modifikujícího činidla, které vytváří kovalentní vazbu.

5. Potvrzení léčebných účinků

Účinky léčebného činidla, používaného v zde předloženém vynálezu pro lymfatické nádory, mohou být potvrzeny tím, že je zvířatům, kterým byly transplantovány lymfatické nádorové buňky podána protilátka, používaná v předloženém vynálezu, a je hodnocen její protinádorový účinek na tato zvířata.

Jako lymfatické nádorové buňky podávané zvířatům mohou být použity buď buňky z již ustavených buněčných linií, tak i buňky čerstvě izolované. Z ustavených buněčných linií je možno použít buňky CCRF-CEM (ATCC CCL-119), HPB-MLT (FCCH1019), MOLT-4 (ATCC CRL-1582), CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1) a podobné, jakožto T buněčné linie, a CESS (ATCC TIB-190), SKW 6.4 (ATCC TIB-215), CCRF-SB (ATCC CCL-120), RPMI 6410 (FCCH6047), EB-3 (ATCC CCL-85) a podobné, jakožto B buněčné linie.

U zvířat, která jsou transplantována, jsou imunologické funkce převážně redukovány, nebo zcela chybějí. Například lze použít nahé myši, myši SCID, běžové myši, nahé krysy a podobně. Protinádorové účinky, které mají být hodnoceny, mohou být potvrzeny měřením objemu a váhy nádoru nebo dobou přežívání zvířete či podobně.

Jak je uvedeno dále v příkladech, podání protilátky anti-HM1.24 má za následek potlačení zvětšování objemu nádoru a navíc prodloužení doby přežívání u myši s transplantovaným nádorem. Tyto skutečnosti ukazují, že protilátka anti-HM1.24 má protinádorový účinek na lymfatické nádory.

6. Způsob podání a farmaceutická příprava

Léčebná činidla pro lymfatické nádory, připravená podle předkládaného vynálezu, mohou být podávána buď systémově nebo místně, parenterální cestou, např. intravenózní injekcí jako je kapková infuze, intramuskulární injekcí, intraperitoneální injekcí a subkutánní injekcí. Způsob podání může být zvolen v závislosti na věku a stavu pacienta. Účinné dávkování je vybráno z oblasti 0,01 mg až 100 mg na kg tělesné váhy na jednu dávku. Popřípadě lze zvolit dávkování v oblasti 1 až 1000 mg, výhodněji 5 až 50 mg na pacienta.

Léčebná činidla pro lymfatické nádory, připravená podle předkládaného vynálezu, mohou obsahovat farmaceuticky přijatelné nosiče nebo aditiva v závislosti na způsobu podávání. Příklady takových nosičů nebo aditiv jsou voda, farmaceuticky přijatelná organická rozpouštědla, kolagen, polyvinylalkohol, polyvinylpyrolidon, karboxyvinylový polymer, sodná sůl karboxymethylcelulózy, sodná sůl polyakrylové kyseliny, alginát sodný, ve vodě rozpustný dextran, karboxymethylový škrob, pektin, karboxymethylcelulóza, ethylcelulóza, xanthanová klovatina, arabská klovatina, kasein, agar, diglycerin, propylenglykol, polyethylenglykol, vazelína, parafin, stearylalkohol, kyselina stearová, lidský sérumalbumin (HSA), manitol, sorbitol, laktóza a farmaceuticky přijatelné povrchově aktivní látky a podobně. Použitá aditiva jsou vybrána mimo jiné z výše uvedených látek nebo jejich kombinace v závislosti na dávkovací formě.

Nemoci léčené podle předloženého vynálezu, jsou lymfatické nádory (kromě myelomů), které mají na nádorových buňkách antigeny, ke kterým se váží protilátky, používané v předkládaném vynálezu. Specificky lze uvést akutní B lymfatickou leukémii (B-ALL), chronickou B lymfatickou leukémii (B-CLL), pre-B lymfom, Burkittův lymfom, folikulární lymfom, lymfom folikulárního obalu, difúzní lymfom, akutní T lymfatickou leukémii (T-ALL), chronickou T lymfatickou leukémii (T-CLL), leukémii zralých T buněk (ATL), non-ATL periferní T lymfom (PNTL) a podobně. Léčebná činidla, připravená podle předkládaného vynálezu, jsou užitečná jako léčebná činidla pro tyto lymfatické nádory.

Popis obrázků

Obr. 1 ukazuje histogram uvedené B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 2 ukazuje histogram uvedené B buněčné linie, která byla analyzována FCM nepřímou metodou za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 3 ukazuje histogram uvedené B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 4 ukazuje histogram uvedené B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 5 ukazuje histogram uvedené B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 6 ukazuje histogram uvedené B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 7 ukazuje histogram uvedené B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 8 ukazuje histogram uvedené B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 9 ukazuje histogram uvedené B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 10 ukazuje histogram uvedené T buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 11 ukazuje histogram uvedené T buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 12 ukazuje histogram uvedené T buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 13 ukazuje histogram uvedené T buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 14 ukazuje histogram uvedené T buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 15 ukazuje histogram uvedené T buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 16 ukazuje histogram uvedené T buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 17 ukazuje histogram uvedené T buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 18 ukazuje histogram uvedené T buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 19 ukazuje histogram uvedené T buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 20 ukazuje histogram uvedené non-T, non-B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 21 ukazuje histogram uvedené non-T, non-B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 22 ukazuje histogram uvedené non-T, non-B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 23 ukazuje histogram uvedené non-T, non-B buněčné linie, která byla analyzována nepřímou metodou FCM za použití protilátky anti-HM1.24 a kontrolního myšního IgG2a.

Obr. 24 je graf, ukazující, že protilátka anti-HM1.24 působí cytotoxicky na T buněčné nádorové linie CCRF-CEM, CCRF-HSB-2 a HPB-MLT, přičemž účinek závisící na podané dávce.

Obr. 25 je graf, ukazující, že protilátka anti-HM1.24 působí cytotoxicky na B buněčné nádorové linie EB-3, MC116 a CCRF-SB, přičemž účinek závisící na podané dávce.

Obr. 26 je graf, ukazující, že zvětšování objemu nádoru u myši s transplantovaným lidským lymfatickým nádorem je potlačeno ve skupině, které byly podávány protilátky ve srovnání se skupinou, které byl podáván kontrolní myšící IgG2a.

Obr. 27 je graf, ukazující, že doba přežívání u myši s transplantovaným lidským lymfatickým nádorem se prodloužila ve skupině, které byly podávány protilátky anti-HM1.24 ve srovnání se skupinou, které byl podáván kontrolní myšící IgG2a.

Příklady provedení vynálezu

Předkládaný vynález bude dále vysvětlen podrobněji na následujících příkladech. Zdůrazňujeme, že předkládaný vynález není žádným způsobem na tyto příklady omezen.

Příklad 1. Konstrukce protilátky anti-HM1.24.

1. Příprava myších ascitů, obsahujících protilátku anti-HM1.24

Hybridomy, produkující protilátku anti-HM 1.24, byly získány podle metody Goto, T. a kol., (Blood (1994) 84, 1922-1930).

Myším BALB/c (vypěstovány CLEA Japan), které 11 a 3 dny předem obdržely intraperitoneálně vždy 500 μ l 2,6,10,14-tetramethylpentadekanu (vyrobena Waco Pure Chemical Industries, Ltd.), bylo intraperitoneálně injikováno 5×10^6 hybridomových buněk. Od 10. dne po injekci hybridomových buněk byly ascity, které se hromadily v břišní dutině myší, odebírány pomocí jehly Happycas č. 19 (vyrobena Medikit), zavedené po delší dobu. Odebrané ascity byly dvakrát centrifugovány při rychlosti 1000 a 3000 otáček za minutu na nízkoobrátkové centrifuze RLX-131 (vyrobena Tomy Seiko), aby byly odstraněny hybridomy a kontaminanty, jako jsou krevní buňky a podobně.

2. Čištění protilátek anti-HM 1.24 z myších ascitů

Čištění protilátky anti-HM 1.24 z výše uvedených myších ascitů bylo provedeno následujícím způsobem. Po přidání stejného množství PBS(-) k myším ascitům, byla směs filtrována na filtru Mediaprep z dutých vláken (vyrobena MILLIPORE) a poté afinitně čištěno pomocí zařízení ConSep LC1000 na vysokorychlostní čištění protilátek (vyrobena MILLIPORE) a sloupce Hyper D Protein A (objem sloupce 20 ml, vyrobena Nihon Gaisi) za použití PBS(-) jako absorbčního pufru a 0,1 M pufru citrátu sodného (pH 4) jako elučního pufru podle přiloženého návodu. Eluované frakce byly okamžitě upraveny na pH 7,4 přidáním 1 M Tris-HCl pufru (pH 8,0), poté koncentrovány a současně byl zaměněn pufr za PBS(-) pomocí centrifugačního ultrafiltračního koncentrátoru Centriprep 10, dále sterilizovány filtrací na membránovém filtru MILLEX-GV (vyrobena MILLIPORE) s velikostí pórů 0,22 μ m a tím získána čištěná protilátka anti-HM 1.24.

3. Určení koncentrace protilátky

Koncentrace čištěné protilátky byla určena pomocí měření absorbance. Čištěná protilátka byla tedy zředěna v PBS(-), změřena absorbance při 280 nm a koncentrace vypočtena za předpokladu, že 1,35 OD odpovídá 1 mg/ml.

Příklad 2. Studium reaktivity protilátky anti-HM 1.24 s buňkami lymfatických nádorů

1. Čištění kontrolního myšího IgG2a

Kontrolní myší IgG2a byl čištěn následujícím způsobem. Komerčně dostupné IgG2a (KAPPA) (UPC 10) ascity (vyrobena CAPPEL) byly rozpuštěny v čištěné vodě a PBS(-). Roztok byl filtrován na membránovém filtru Acrodisc (vyrobena Gelman Sciences) s velikostí pórů 0,2 μm a) a poté afinitně čištěno pomocí zařízení ConSep LC1000 na vysokorychlostní čištění protilátek (vyrobena MILLIPORE) a sloupce Hyper D Protein A (objem sloupce 20 ml, vyrobeno Nihon Gaisi) za použití PBS(-) jako absorbčního pufru a 0,1 M pufru citrátu sodného (pH 4) jako elučního pufru podle přiloženého návodu. Eluované frakce byly okamžitě upraveny na pH 7,4 přidáním 1 M Tris-HCl pufru (pH 8,0), poté koncentrovány a současně byl zaměněn pufr za PBS(-) pomocí centrifugačního ultrafiltračního koncentrátoru Centriprep 10, dále sterilizovány filtrací na membránovém filtru MILLEX-GV (vyrobena MILLIPORE) s velikostí pórů 0,22 μm a tím získán čištěný kontrolní myší IgG2a.

Určení koncentrace kontrolního myšího IgG2a byla provedena podle výše uvedeného bodu 3. Určení koncentrace protilátky.

2. FCM analýza

Reaktivita anti-HM 1.24 protilátky s buňkami lymfatického nádoru byla zkoumána průtokovou cytometrickou analýzou (FCM). Po promytí buněk T buněčné linie RPMI 8402 (ATCC CRL-1195), CCRF-CEM (ATCC CCL-119) odvozených z akutní lymfoblastické leukémie, HPB-ALL (FCCH1018) HPB-MLT (FCCH1019) odvozených z T lymfomu, JM (FCCH1023) odvozených z akutní lymfatické leukémie, MOLT-4 (ATCC CRL-1582) odvozených z akutní lymfoblastické leukémie, Jurkat (FCCH1024) odvozených z akutní lymfatické leukémie, CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1) odvozených z akutní lymfoblastické leukémie, MT-1 (FCCHG1043) odvozených z leukémie zralých T buněk a KT-3 odvozených z Lennertova lymfomu (Shimizu, S. a kol., Blood (1988) 71,196-203), jakožto B buněčné linie je možno použít EB virem transformovanou linii CESS (ATCC TIB-190), na EB virus pozitivní B buňky SKW 6.4 (ATCC TIB-215), MC116 (ATCC CRL-1649) odvozené z B lymfomu, CCRF-SB (ATCC

CCL-120) odvozené z akutní lymfoblastické leukémie, B buňky RPMI 6410 (FCCH6047) odvozené z pacienta s akutní myelocytickou leukémií, Daudi (ATCC CCL-213) odvozené z Burkittova lymfomu, Jijoye (ATCC CCL-87) odvozené z Burkittova lymfomu, Raji (ATCC CCL-86) odvozené z Burkittova lymfomu, a jakožto non-T, non-B buněčnou linii HL-60 (ATCC CCL-240) odvozené z akutní myelocytické leukémie, THP-1 (ATCC TIB-202) odvozené z akutní monocytické leukémie, U-937 (ATCC CRL-1593) odvozené z vazivového lymfomu a K-562 (ATCC CCL-243) odvozené z chronické myelocytické leukémie v PBS(-), je k nim přidáno 100 μ l protilátek nebo čištěného, zředěných na 25 μ g/ml v pufru FACS (PBS(-) obsahující 2 % fetálního hovězího séra a 0,1 % azidu sodného) a inkubováno na ledu 30 minut.

Po promytí puftrem FACS je přidáno 100 μ l 25 μ g/ml kozí protimyšší protilátky značené FITC (GAM) a inkubováno na ledu 30 minut. Po promytí puftrem FACS byly buňky suspendovány v 600 μ l nebo 1 ml pufru FACS a u každé buněčné suspenze byla měřena intenzita fluorescence pomocí přístroje FACScan (vyrobena Becton Dickinson). Výsledky uvedené na obrázcích 1 až 23 potvrzují, že všechny T buněčné linie a všechny B buněčné linie (vyjma Daudi a Raji, které nereagují), reagovaly s anti-HM 1.24 protilátkou a silně exprimovaly antigen HM 1.24. Na druhé straně žádná non-T, non-B buněčná linie nereagovala s anti-HM 1.24 protilátkou a exprese antigenu HM 1.24 nebyla zjištěna v žádné z nich.

V histogramech uvedených na obrázcích 1 až 23 byly histogramové podmínky nastaveny tak, že negativní buňky tvoří 98 % a pozitivní buňky 2 % při barvení pomocí kontrolního myšího IgG2a. Podle těchto podmínek histogramů bylo spočítáno procento buněk pozitivních na antigen HM 1.24 v případě, že byla použita anti-HM 1.24 protilátka a výsledek je uveden v Tabulce 1. Podle procenta buněk pozitivních na antigen HM 1.24, byla síla exprese rozlišena do pěti stavů: -, +/-, +, ++ a +++. Bylo potvrzeno, že všechny T buněčné linie a B buněčné linie (vyjma Daudi a Raji) silně exprimovaly antigen HM 1.24, podobně jak je uvedeno ve výsledcích na obrázcích 1 až 23. Též ve všech případech non-T, non-B buněčných linií bylo procento buněk pozitivních na antigen HM 1.24 nulové nebo menší než 5 %, což ukazuje, že exprese antigenu neprobíhá nebo je velmi malá.

Tabulka 1

| | Název buněk | Úroveň exprese | |
|-------------------------------|-------------|----------------|-------|
| B buněčné linie | CESS | +++ | 94,5 |
| | SKW 6.4 | +++ | 92,8 |
| | MC116 | ++ | 65,0 |
| | CCRF-SB | +++ | 98,4 |
| | RPMI 6410 | +++ | 94,5 |
| | EB-3 | +++ | 88,3 |
| | Jijoye | +++ | 92,3 |
| | Daudi | - | 2,8 |
| | Raji | - | 2,0 |
| T buněčné linie | RPMI 8402 | +++ | 94,0 |
| | CCRF-CEM | +++ | 97,8 |
| | HPB-ALL | ++ | 63,8 |
| | HPB-MLT | +++ | 94,6 |
| | JM | +++ | 99,6 |
| | MOLT-4 | +++ | 84,1 |
| | Jurkat | ++ | 70,9 |
| | CCRF-HSB-2 | +++ | 100,0 |
| | MT-1 | +++ | 95,9 |
| | KT-3 | +++ | 96,0 |
| non-T, non-B buněčné linie | HL-60 | - | 2,9 |
| | THP-1 | - | 1,5 |
| | U-297 | - | 1,1 |
| | K-562 | - | 3,9 |

-, <5%; +/-, 5-20%; +, 20-50%; ++, 50-80%; +++, >80%

Příklad 3. Určování CDC aktivity

CDC aktivita anti-HM 1.24 protilátky proti buňkám lymfatického nádoru byla určována následujícím způsobem.

1. Příprava cílových buněk

Jako cílové buňky byly připraveny CCRF-CEM (ATCC CCL-119) odvozené z akutní lymfoblastické leukémie, CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1) odvozené z akutní lymfoblastické leukémie, HPB-MLT (FCCH1019) odvozené z T lymfomu, EB-3 (ATCC CCL-85) odvozené z Burkittova lymfomu, MC116 (ATCC CRL-1649) odvozené z B lymfomu, CCRF-SB (ATCC CCL-120) odvozené z akutní lymfoblastické leukémie a K-562 (ATCC CCL-243) odvozené z akutní myelocytické leukémie v koncentraci 4×10^5 buněk/ml v médiu RPMI1640, obsahujícím 10 % fetálního hovězího séra (vyrobena GIBCO-BRL). Padesát μ l suspenze každých těchto buněk bylo přidáno do 96-jamkové destičky (s rovným dnem) (vyrobena FALCON) a inkubováno v 5% CO_2 v inkubátoru s vysokou vlhkostí vzduchu (vyrobena TABAI) přes noc při 37 °C.

2. Příprava anti-HM 1.24 protilátky

Čištěná anti-HM 1.24 protilátka získaná ve výše uvedeném příkladu 1 byla připravena v koncentraci 0, 0,2, 2 a 20 $\mu\text{g/ml}$ v médiu RPMI1640, obsahujícím 10 % fetálního hovězího séra (vyrobena GIBCO-BRL) a 50 μ l těchto protilátek bylo přidáno do 96-jamkové destičky (s rovným dnem), připravené ve výše uvedeném odstavci 1. Po inkubaci destičky v 5% CO_2 v inkubátoru s vysokou vlhkostí vzduchu (vyrobena TABAI) při 37 °C po dobu 60 minut, byla centrifugována v nízkoobrátkové centrifuze 05PR-22 (vyrobena Hitachi) při 1000 otáček za minutu po dobu 5 minut a poté bylo 50 μ l supernatantu odstraněno.

3. Příprava komplementu

Baby Rabbit Complement (vyrobena CEDARLANE) byl rozpuštěn v čištěné vodě po 1 ml na lahvičku, která byla dále naředěna v 5 ml média RPMI1640 (vyrobena GIBCO-BRL), které neobsahovalo fetální telecí sérum (FCS). Padesát μ l tohoto roztoku bylo rozplněno do 96-jamkové destičky (s rovným dnem), připravené ve výše uvedeném odstavci 2 a inkubováno v 5% CO_2 v inkubátoru s vysokou vlhkostí vzduchu (vyrobena TABAI) při 37 °C po dobu 2 hodin.

4. Určení CDC aktivity

Po skončení inkubace bylo ke každé jamce 96-jamkové destičky (s rovným dnem) přidáno 10 μ l Alamar Bule (vyrobena BIO SOURCE), připravené ve výše uvedeném odstavci 3 a bylo inkubováno v 5% CO_2 v inkubátoru s vysokou vlhkostí vzduchu (vyrobena TABAI) při 37 °C po dobu 4 hodin. U každé jamky byla pak měřena intenzita fluorescence (excitační vlnová délka 530 nm, emisní vlnová délka 590 nm) za

použití měřicího systému CytoFluor 2350 (vyrobena MILLIPORE). Cytotoxickou aktivitu (%) je možno spočítat jako $(A-C) / (B-C) \times 100$, kde A je intenzita fluorescence při inkubaci v přítomnosti protilátky, B je intenzita fluorescence při inkubaci samotného média bez protilátek a C je intenzita fluorescence v jamce bez buněk.

Výsledky ukázaly, jak je uvedeno v obrázcích 24 a 25, že buňky K562, které nereagují při FCM analýze s anti-HM 1.24 protilátkou, nevykazují žádnou cytotoxickou aktivitu ani po přidání anti-HM 1.24 protilátky, zatímco CCRF-CEM, CCRF-HSB-2, HPB-MLT, EB-3, MC116 a CCRF-SB, které reagují s anti-HM 1.24 protilátkou, vykazují cytotoxickou aktivitu, jejíž rozsah je závislý na koncentraci anti-HM 1.24 protilátky. To jasně prokazuje, že anti-HM 1.24 protilátka projevuje CDC aktivitu proti lymfatickým nádorům, které mají na povrchu svých buněk antigenní protein, ke kterému se anti-HM 1.24 protilátka specificky váže.

Příklad 4. Protinádorové účinky anti-HM 1.24 protilátky u myši s transplantovaným lidským lymfatickým nádorem

1. Příprava protilátky pro podání

1-1. Příprava anti-HM 1.24 protilátky

Čištěná anti-HM 1.24 protilátka, získaná ve výše uvedeném příkladu 1, byla

1-2. Příprava kontrolního myšního IgG2a

Čištěná protilátka, získaná ve výše uvedeném příkladu 2, byla připravena v koncentraci 1 mg/ml v PBS(-) sterilizovaném filtrací a byla použita v následujících pokusech.

2. Protinádorové účinky anti-HM 1.24 protilátky u myši s transplantovaným lidským lymfatickým nádorem

2-1. Příprava myši s transplantovaným lidským lymfatickým nádorem

Myši s transplantovaným lidským lymfatickým nádorem byly připraveny následujícím způsobem. Buňky CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1), odvozené z akutní lymfoblastické leukémie, které byly pěstovány in vivo na myších SCID (CLEA Japan) byly naředěny na koncentraci 1×10^8 buněk/ml v médiu RPMI1640, obsahujícím 10 % fetálního hovězího séra (vyrobena GIBCO-BRL). Takto připravené buněčné suspenze byly subkutánně podány do břicha myši SCID (samci, 6 týdnů staří), z nichž každému bylo předchozí den intraperitoneálně podáno 100 μ l anti-asialo GM1 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

2-2. Podávání protilátek

Sedmý den po transplantaci nádoru byl kaliperem měřen průměr nádoru v místě, kde byly transplantovány buňky CCRF-HSB-2. Po spočtení objemu nádoru byla zvířata seskupena tak, že průměrný objem nádoru byl v každé skupině téměř stejný (8 zvířat ve skupině, 3 skupiny). Od téhož dne bylo každé skupině intraperitoneálně podáváno 100 μ l anti-HM 1.24 protilátky v koncentracích 1 mg/ml nebo 200 μ g/ml, nebo 1 mg/ml kontrolního myšího IgG2a, které byly připraveny, jak je uvedeno ve výše uvedeném odstavci 1. Protilátky byly podávány 2x v týdnu, celkově 19x, vždy podobným způsobem. Během této doby byl 2x týdně měřen kaliperem průměr nádoru a spočítán jeho objem.

2-3. Hodnocení protinádorového účinku anti-HM 1.24 protilátky u myší s transplantovaným lidským lymfatickým nádorem

Protinádorový účinek anti-HM 1.24 protilátky byl hodnocen podle změn v objemu nádoru a délce doby přežívání u myší. Výsledkem bylo to, jak je ukázáno na obrázku 26, že zvyšování objemu nádoru bylo potlačeno ve skupině, které byla podávána anti-HM 1.24 protilátka, ve srovnání se skupinou, které byl podáván kontrolní myší IgG2a. Také jak je ukázáno na obrázku 27, bylo pozorováno prodloužení doby přežívání ve skupině, které byla podávána anti-HM 1.24 protilátka, ve srovnání se skupinou, které byl podáván kontrolní myší IgG2a. Tyto skutečnosti ukazují, že anti-HM 1.24 protilátka má protinádorový účinek u myší s transplantovaným lidským lymfatickým nádorem.

Referenční příklad 1. Příprava hybridomů, které produkují myší anti-HM 1.24 monoklonální protilátku

Hybridomy produkující myší anti-HM 1.24 protilátku byly připraveny podle metody Goto, T. a kol., Blood (1994) 84, 1992-1930).

Buněčná linie plazmatických buněk KPC-32 (1×10^7), odvozená z kostního morku pacienta s mnohočetným lidským myelomem (Goto, T. a kol., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 1400), byla každých šest týdnů dvakrát injekčně vpravena do břišní dutiny myší BALB/c (vyrobena Charles River).

Tři dny před usmrcením zvířat jim bylo do sleziny injekčně podáno $1,5 \times 10^6$ buněk KPC-32, aby se dále zvětšila schopnost produkovat protilátky (Goto, T. a kol., Tokushima J. Exp. Med. (1990) 37, 89). Po usmrcení zvířat jim byla odebrána slezina a s odebraným orgánem byla provedena buněčná fúze s myelomovými buňkami SP2/0 podle metody Groth, de St. & Schreidegger (Cancer Research (1981) 41, 3465).

Pomocí testu ELISA, využívajícího buňky KPC-32 (Posner, M. R. a kol., J. Immunol. Methods (1982) 48, 23), byl supernatant hybridomových kultur testován na přítomnost protilátek. 5×10^4 buněk KPC-32 bylo suspendováno v 50 ml PBS a poté rozděleno do 96-jamkové destičky (dno tvaru „U“, Corning, vyrobeno Iwaki), která byla poté vysušena na vzduchu při teplotě 37 °C přes noc. Po blokování pomocí PBS, obsahujícího 1 % hovězího sérumalbuminu (BSA), byl přidán supernatant hybridomových kultur a inkubováno při 4 °C po dobu 2 hodin. Potom byla provedena reakce 1 hodinu při 4 °C s kozí protilátkou proti myšimu IgG (vyrobena ZYMED), která byla značena peroxidázou. Po promytí byl přidán roztok o-fenylendiaminu (vyrobena Sumimoto Bakelite) a reakce probíhala při teplotě místnosti 30 minut.

Reakce byla zastavena přidáním 2 N kyseliny sírové a absorbance byla měřena při 492 nm na odečítacím zařízení pro destičky ELISA reader (vyrobena Bio-Rad). Aby byl odstraněn hybridom, který vytváří protilátky proti lidskému imunoglobulinu, supernatant pozitivního hybridomu byl předem absorbován s lidským sérem a reaktivita s jinými buněčnými liniemi byla zjišťována ELISA testem. Byly vybrány pozitivní hybridomy a jejich reaktivita s různými buněčnými liniemi byla zjišťována průtokovou cytometrií. Poslední vybraný hybridomový klon byl dvakrát klonován a injekčně vpraven do břišní dutiny myši BALB/c léčených pristanem, a z nich byly získány ascity.

Monoklonální protilátky z myších ascitů byly čištěny srážením síranem amonným a soupravou Protein A affinity chromatography kit (Ampure PA, vyrobeno Amersham). Čištěné protilátky byly značeny FITC pomocí soupravy Quick Tag FITC binding kit (vyrobena Boehringer Mannheim).

Výsledkem bylo, že monoklonální protilátky, produkované 30 hybridomovými klony, reagovaly s buňkami KPC-32 a RPMI 8226.

Po klonování byla zkoumána reaktivita supernatantu těchto hybridomů s jinými buněčnými liniemi nebo mononukleárními buňkami periferní krve.

Tři z těchto klonů produkovaly monoklonální protilátky, jež specificky reagovaly s plazmatickými buňkami. Z těchto tří klonů byl vybrán klon, který byl nejužitečnější pro průtokovou cytometrickou analýzu a měl CDC aktivitu vůči RPMI 8226, a byl označen jako HM1.24. Podtřída monoklonální protilátky produkované tímto hybridomem, byla určena testem ELISA za použití králíčích antimyších protilátek, specifických pro jednotlivé podtřídy (vyrobena Zymed). Anti-HM 1.24 protilátka byla podtřídou IgG2a k. Hybridom HN1.24, který produkuje anti-HM 1.24 protilátky byl uložen pro mezinárodní

použití podle ustanovení Budapešťské smlouvy jako FERM BP-5233 14. září 1995 v National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan.

Referenční příklad 2. Příprava pozměněné anti-HM 1.24 protilátky

Pozměněná anti-HM 1.24 protilátka byla získána následujícím způsobem.

Z hybridomu HM1.24, připraveného v referenčním příkladu 1, byla běžným postupem připravena celková RNA. Podle ní byla syntetizována cDNA, kódující V oblast myší protilátky, amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a metodou 5'- RACE. Byl získán fragment DNA, který obsahuje gen, kódující myší V oblast, ten byl ligován do klonovacího vektoru pUC a poté vnesen do kompetentních buněk E. coli a získány tak transformanty E. coli. Výše uvedený plazmid byl z transformantů získán. Nukleotidová sekvence cDNA kódující oblasti v plazmidu byla zjištěna běžným postupem a pro každou V oblast byla určena oblast určující komplementaritu (CDR).

Aby bylo možno zkonstruovat vektor exprimující chimerní anti-HM 1.24 protilátku, cDNA kódující V oblast každého L řetězce a H řetězce myší anti-HM 1.24 protilátky byla vložena do vektoru HEF. Dále, aby byla zkonstruována pozměněná anti-HM 1.24 protilátka, V oblast CDR myší anti-HM 1.24 protilátky byla připojena k lidské protilátce. L řetězec lidské protilátky REI byl použit jako L řetězec lidské protilátky, FR 1 až 3 lidské protilátky HG3 byly použity jako podpůrné oblasti (FRs) 1 až 3 H řetězce lidské protilátky a FR4 lidské protilátky JH6 byl použit pro FR4. Některé aminokyseliny v FR V oblasti H řetězce byly zaměněny tak, že CDR takto pozměněné protilátky může vytvářet vhodné místo pro vazbu antigenu.

Aby bylo možno exprimovat geny pro L řetězec a H řetězec a tak zkonstruovat pozměněnou anti-HM 1.24 protilátku v savčí buňce, každý gen byl zvlášť vnesen do vektoru HEF, čímž byly vytvořeny vektory exprimující buď L řetězec nebo H řetězec pozměněné anti-HM 1.24 protilátky.

Současným vnesením těchto dvou exprimujících vektorů do CHO buněk byla vytvořena buněčná linie, která produkuje pozměněnou anti-HM 1.24 protilátku. Vazebná aktivita k antigenu a vazebně inhibiční aktivita pozměněné anti-HM 1.24 protilátky, získané pěstováním této buněčné linie, pro lidskou amnionovou buněčnou linii WISH byla zjišťována testem ELISA za použití buněk. Výsledky ukázaly, že pozměněná anti-HM 1.24 protilátka má stejnou vazebnou aktivitu k antigenu jako

chimerní protilátka a při použití biotinylované myší anti-HM 1.24 protilátky byla rovněž zjištěna stejná vazebně inhibiční aktivita, jako u chimerní protilátky nebo myší protilátky.

Mimoходом, E. coli nesoucí plazmid, který obsahuje DNA, kódující V oblast L řetězce chimerní protilátky a E. coli nesoucí plazmid, který obsahuje DNA, kódující V oblast H řetězce chimerní protilátky byly uloženy pro mezinárodní použití podle ustanovení Budapešťské smlouvy jako Escherichia coli DH5 α (pUC19-1.24L-gk) a Escherichia coli DH5 α (pUC19-1.24H-gy1) 29. srpna 1996 v National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, jako FERM BP-5646 a FERM BP-5644. Dále E. coli nesoucí plazmid, který obsahuje DNA, kódující verzi a (SEQ ID NO: 2) V oblasti L řetězce a E. coli nesoucí plazmid, který obsahuje DNA, kódující verzi r (SEQ ID NO: 3) V oblasti H řetězce pozměněné anti-HM 1.24 protilátky byly uloženy pro mezinárodní použití podle ustanovení Budapešťské smlouvy jako Escherichia coli DH5 α (pUC19-RVLa-AHM-gk) a Escherichia coli DH5 α (pUC19-RVHr-AHM-gy1) 29. srpna 1996 v National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, jako FERM BP-5645 a FERM BP-5643. Dále E. coli nesoucí plazmid, který obsahuje DNA, kódující verzi s (SEQ ID NO: 4) V oblasti L řetězce pozměněné anti-HM 1.24 protilátky byla uložena pro mezinárodní použití podle ustanovení Budapešťské smlouvy jako Escherichia coli DH5 α (pUC19-RVHs-AHM-gy1) 29. září 1997 v National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, jako FERM BP-6127.

Referenční příklad 3. Klonování cDNA kódující protein antigenu HM1.24

cDNA kódující protein antigenu HM1.24, který je specificky rozpoznáván anti-HM 1.24 protilátkou byl klonován.

1. Konstrukce cDNA knihovny

1) Příprava celkové RNA

Z buněčné linie KPMM2, pocházející z lidského mnohočetného myelomu, byla získána celková RNA pomocí metody Chirgwin a kol., (Biochemistry, 18, 5294 (1979)). Tedy 2×10^8 buněk KPMM2 bylo kompletně homogenizováno v 20 ml 4 M guanidin izothiokyanátu (vyrobena Nacalai Tesque Inc.). Homogenát byl navrstven na 5,3 M chlorid cesný v centrifugační zkumavce, která byla poté centrifugována v rotoru

Backman SW40 při 31 000 otáček/min při 20 °C po dobu 24 hodin, aby došlo k vysrážení RNA. Sraženina RNA byla promyta 70% etanolem a rozpuštěna v 300 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), který obsahoval 1 mM EDTA a 0,5 % SDS. Byla přidána pronáza (vyrobena Boehringer) do koncentrace 0,5 mg/ml a provedena inkubace 30 minut při 37 °C. Směs byla extrahována směsí fenolu s chloroformem a RNA byla sražena etanolem. Sraženina RNA byla pak rozpuštěna v 200 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), který obsahujícího 1 mM EDTA.

2) Příprava poly(A)+RNA

Poly(A)+RNA byla čištěna za použití 500 µg materiálu celkové RNA, připravené jak bylo popsáno výše, pomocí soupravy Fast Track 2.0 mRNA Isolation kit (vyrobena Invitrogen) podle návodu přiloženého k soupravě.

3) Konstrukce knihovny cDNA

Dvouřetězcová cDNA byla syntetizována a jako materiál bylo použito 10 µg výše uvedené poly(A)+RNA pomocí soupravy pro syntézu cDNA TimeSaver cDNA Synthesis Kit (vyrobena Pharmacia) podle návodu přiloženého k soupravě, dále ligována k EcoRI adaptéru, obsaženému v soupravě za pomoci soupravy Directional Cloning Toolbox (vyrobena Pharmacia) podle návodu přiloženého k soupravě. Kinázování a štěpení EcoRI adaptéru restriční enzymem NotI byly provedeny podle návodu přiloženého k soupravě. Dále byla dvouřetězcová cDNA s připojeným adaptérem, která má velikost 500 párů bází nebo více, oddělena a čištěna za použití 1,5% nízkotajícího agarózového gelu (vyrobena Sigma) a bylo získáno 40 µl dvouřetězcové cDNA s připojeným adaptérem.

Takto konstruovaná dvouřetězcová cDNA s připojeným adaptérem byla ligována pomocí T4 ligázy (vyrobena GIBCO-BRL) do vektoru pCOS1 (Japanese Patent Application 8-255196), který byl předtím opracován restričními enzymy EcoRI a NotI a alkalickou fosfatázou (vyrobena Takara Shuzo) a tak byla konstruována cDNA knihovna. Konstruovaná cDNA knihovna byla vnesena do E. coli kmene DH5α (vyrobena GIBCO-BRL) a následně byl ustanovena jako nezávislý klon, který má celkovou velikost $2,5 \times 10^6$.

2. Klonování přímou expresní metodou

1) Transfekce buněk COS-7

Přibližně 5×10^5 klonů výše uvedené transdukované E. coli bylo pěstováno v médiu 2-YT (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring

Harbor Laboratory Press (1989)), obsahujícím 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu, aby došlo k amplifikaci cDNA, pak byly zpracovány alkalickou metodou (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), aby byla získána plazmidová DNA z *E. coli*. Takto získaná plazmidová DNA byla elektroporační metodou vpravena do buněk COS-7 pomocí zařízení Gene Pulser (vyrobena Bio-Rad).

Deset μg čištěné plazmidové DNA bylo přidáno do 0,8 ml roztoku buněk COS-7, v němž byly buňky suspendovány v PBS na koncentraci 1×10^7 buněk/ml a směs byla podrobena pulsům o napětí 1500 V a kapacitě 25 μFD . Po 10 minutové zotavovací periodě při teplotě místnosti, byly elektroporézované buňky pěstovány v kultivačním médiu DMEM (vyrobena GIBCO-BRL), obsahujícím 10 % fetálního hovězího séra (vyrobena GIBCO-BRL) při 37 °C a v 5% CO_2 po dobu 3 dní.

2) Příprava adsorbční plotny

Adsorbční plotna pokrytá myší anti-HM 1.24 protilátkou byla připravena metodou podle B. Seed a kol., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3365-3369 (1987)). Myší anti-HM 1.24 protilátka byla přidána do 50 mM Tris-HCl, pH 9,5 v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Tři ml takto připraveného roztoku protilátek bylo přidáno na plotnu pro tkáňovou kultivaci o průměru 60 mm a inkubovány při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Poté byla plotna třikrát promyta roztokem 0,15 M NaCl a byl přidán PBS, obsahující 5 % fetálního hovězí séra, 1 mM EDTA, 0,02% NaN_3 . Po blokování byla takto připravená plotna použita pro následující klonování.

3) Klonování cDNA knihovny

Buňky COS-7 transfekované tak, jak bylo popsáno výše, byly rozptýleny v PBS, obsahujícím 5 mM EDTA. Po jednom promytí PBS, obsahujícím 5 % fetálního hovězího séra byly buňky suspendovány v PBS, obsahujícím 5 % fetálního hovězího séra a 0,02% NaN_3 na koncentraci 1×10^6 buněk/ml. Suspenze byla pak přidána k adsorbční plotně, připravené jak bylo popsáno výše, a inkubováno při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Po trojím opatrném promytí s PBS obsahujícím 5 % fetálního hovězího séra a 0,02% NaN_3 , byla plazmidová DNA izolována z buněk vázaných k adsorbční plotně, za použití roztoku obsahujícího 0,6% SDS a 10 mM EDTA.

Získaná plazmidová DNA byla transdukována do buněk *Escherichia coli* DH5 α . Po amplifikaci plazmidové DNA, jak je výše uvedeno, byla DNA izolována alkalickou metodou. Získaná plazmidová DNA byla transfekována elektroporační metodou do

buněk COS-7 a plazmidová DNA izolována z adsorbovaných buněk, jak je popsáno výše. Podobný postup byl opakován ještě jednou a získaná plazmidová DNA byla štěpena restričními enzymy EcoRI a NotI. Na závěr byla potvrzena koncentrace inzertu o velikosti 0,9 kbp. Dále byly buňky E. coli, transdukované částí získané plazmidové DNA byly naočkovány na plotny s agarem 2-YT, obsahujícím ampicilin o koncentraci 50 µg/ml. Po kultivaci přes noc byla z jedné kolonie izolována DNA. Ta byla štěpena restričními enzymy EcoRI a NotI a získán klon p3.19, nesoucí inzert 0,9 kbp.

Sekvence bázi tohoto klonu byla určena pomocí sekvenační soupravy PRISM, Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (vyrobena Perkin Elmer) podle návodu, přiloženého k soupravě a DNA sekvenátoru ABI 373A (vyrobena Perkin Elmer). Jeho nukleotidová sekvence a odpovídající sekvence aminokyselin jsou ukázány v SEQ ID NO: 1.

Průmyslová využitelnost

Výsledky FCM analýzy ukázaly, že anti-HM 1.24 protilátka silně reaguje s většinou buněk, odvozených z lidských lymfatických nádorů, což naznačuje, že v mnoha lymfatických nádorech je silně exprimován polypeptid obsahující epitop, rozpoznávaný anti-HM 1.24 protilátkou. Dále u myši s transplantovaným lidským nádorem, který reaguje s anti-HM 1.24 protilátkou, podání anti-HM 1.24 protilátky má za následek potlačení zvětšování objemu nádoru a navíc prodloužení doby přežití zvířete. Tyto skutečnosti ukazují, že anti-HM 1.24 protilátka nebo protilátky rozpoznávající polypeptid, který obsahuje epitop rozpoznávaný anti-HM 1.24 protilátkou, mají cytotoxickou aktivitu pro mnoho lymfatických nádorů. To naznačuje, že protilátka může být užitečná pro léčení pacientů s lymfatickými nádory.

Seznam organizmů, uložených podle Smlouvy o patentové spolupráci, Pravidlo 13-2 a
název ukládajícího institutu

Název: the National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of
Industrial Science and Technology, MITI

Adresa: Higashi 1-chome, Tsukuba City, Ibalaki pref., Japan

Mikroorganismus (1)

Jméno: *Escherichia coli* DH5 α (pRS38-pUC19)

Přístupové č.: FERM BP-4434

Datum uložení: 5. října 1993

Mikroorganismus (2)

Jméno: hybridom HM1.24

Přístupové č.: FERM BP-5233

Datum uložení: 14. září 1995

Mikroorganismus (3)

Jméno: *Escherichia coli* DH5 α (pUC19-RVHr-AHM-gy1)

Přístupové č.: FERM BP-5643

Datum uložení: 29. srpna 1996

Mikroorganismus (4)

Jméno: *Escherichia coli* DH5 α (pUC19-1.24H-gy1)

Přístupové č.: FERM BP-5644

Datum uložení: 29. srpna 1996

Mikroorganismus (5)

Jméno: *Escherichia coli* DH5 α (pUC19-RVLa-AHM-gk)

Přístupové č.: FERM BP-5645

Datum uložení: 29. srpna 1996

Mikroorganismus (6)

Jméno: *Escherichia coli* DH5 α (pUC19-1.24L-gk)

Přístupové č.: FERM BP-5646

Datum uložení: 29. srpna 1996

Mikroorganismus (7)

Jméno: Escherichia coli DH5 α (pUC19-RVHs-AHM-gy1)

Přístupové č.: FERM BP-6127

Datum uložení: 29. září 1997

SEZNAM SEKVENCÍ

- <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
- <120> Léčebné činidlo pro lymfatické nádory
- <130> E908
- <140> PCT/JP98/00568
- <141> 1998-02-12
- <150> JP 9-41410
- <151> 1997-02-02
- <160> 8
-
- <210> 1
- <211> 1013
- <212> DNA
- <213> Homosapiens
- <223> Nukleotidová sekvence kódující HM 1.24 antigen
- <400> 1
- ```

gaattcggca cgagggatct gg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc 49
 Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys
 1 5
aga gtg ccc atg gaa gac ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg 97
Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly
 10 15 20 25
ata gga att ctg gtg ctc ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg 145
Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu
 30 35 40
att atc ttc acc atc aag gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt 193
Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu
 45 50 55
cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag 241
Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu
 60 65 70
ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc 289
Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala
 75 80 85

```

```

acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag 337
Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu
 90 95 100 105
aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag gga gag atc act 385
Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr
 110 115 120
aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg 433
Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu
 125 130 135
aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac 481
Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr
 140 145 150
tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg 529
Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu
 155 160 165
att gtg ctg ctg ggc ctc agc gct ctg ctg cag tga gatcccagga 575
Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln
 170 175 180
agctggcaca tcttgggaagg tccgtcctgc tccgcttttc gcttgaacat tcccttgatc 635
tcatcagttc tgagcgggtc atggggcaac acggttagcg gggagagcac ggggtagccg 695
gagaagggcc tctggagcag gtctggaggg gccatggggc agtcctgggt ctggggacac 755
agtcgggttg acccagggt gtctccctcc agagcctccc tccggacaat ggtcccccc 815
tcttgtctcc caccctgaga ttgggcatgg ggtgcggtgt ggggggcatg tgctgctgt 875
tgttatgggt tttttttgcg gggggggttg cttttttctg ggggtcttga gctccaaaaa 935
aataaacact tccttgagg gagagcacac cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 995
aaaattcggg cggccgcc 1013

```

- <210> 2
- <211> 379
- <212> DNA
- <213> Uměle připravená sekvence
- <220>
- <221>
- <222>
- <223> Nukleotidová sekvence DNA kódující L řetězec V oblasti verze a pozměněné anti-HM 1.24 protilátky
- <400> 2

```

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc tcc ttg gta gca aca gct aca ggt 48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
-15 -10 -5
gtc cac tcc gac atc cag atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc 96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
-1 1 5 10
agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gct agt cag gat gtg 144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
15 20 25
aat act gct gta gcc tgg tac cag cag aag cca gga aag gct cca aag 192
Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
30 35 40 45

```

```

ctg ctg atc tac tcg gca tcc aac cgg tac act ggt gtg cca agc aga 240
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
ttc agc ggt agc ggt agc ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc 288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
 65 70 75
ctc cag cca gag gac atc gct acc tac tac tgc cag caa cat tat agt 336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser
 80 85 90
act cca ttc acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa c 379
Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 95 100 105

```

<210> 3

<211> 418

<212> DNA

<213> Uměle připravená sekvence

<220>

<221>

<222>

<223> Nukleotidová sekvence DNA kódující H řetězec V oblasti  
verze r pozměněné anti-HM 1.24 protilátky

<400> 3

```

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc ttc ttg ctg gct gta gct cca ggt 48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 -15 -10 -5
gct cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 -1 1 5 10
cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 15 20 25
act ccc tac tgg atg cag tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
gag tgg atg gga tct att ttt cct gga gat ggt gat act agg tac agt 240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser
 50 55 60
cag aag ttc aag ggc aga gtc acc atg acc gca gac aag tcc acg agc 288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 65 70 75
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90
tat tac tgt gcg aga gga tta cga cga ggg ggg tac tac ttt gac tac 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 95 100 105
tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca g 418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

```

- <210> 4  
 <211> 418  
 <212> DNA  
 <213> Uměle připravená sekvence  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> Nukleotidová sekvence DNA kódující H řetězec V oblasti verze s anti-HM 1.24 protilátky

<400> 4

```

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc ttc ttg ctg gct gta gct cca ggt 48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 -15 -10 -5
gct cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 -1 1 5 10
cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 15 20 25
act ccc tac tgg atg cag tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192
Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
gag tgg atg gga tct att ttt cct gga gat ggt gat act agg tac agt 240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser
 50 55 60
cag aag ttc aag ggc aga gtc acc atc acc gca gac aag tcc acg agc 288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 65 70 75
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90
tat tac tgt gcg aga gga tta cga cga ggg ggg tac tac ttt gac tac 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 95 100 105
tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca g 418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

```

- <210> 5  
 <211> 180  
 <212> PRT  
 <213> Homosapiens  
 <223> Aminokyselinová sekvence HM 1.24 antigenu  
 <400> 5

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys

1

5

Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly  
 10 15 20 25  
 Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu  
 30 35 40  
 Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu  
 45 50 55  
 Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu  
 60 65 70  
 Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala  
 75 80 85  
 Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu  
 90 95 105  
 Lys Ala Gln Gly Gln Lys LysVal Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr  
 110 115 120  
 Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu  
 125 130 135  
 Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr  
 140 145 150  
 Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu  
 155 160 165  
 Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln  
 170 175 180

- <210> 6
- <211> 126
- <212> PRT
- <213> Uměle připravená sekvence
- <220>
- <221>
- <222>
- <223> Aminokyselinová sekvence L řetězce V oblasti verze a  
 pozměněné anti-HM 1.24 protilátky

<400> 6  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 -15 -10 -5  
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 -1 1 5 10  
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val  
 15 20 25  
 Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 30 35 40 45  
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg  
 50 55 60  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser  
 65 70 75  
 Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser  
 80 85 90  
 Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 95 100 105

<210> 7  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> Uměle připravená sekvence  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> Aminokyselinová sekvence H řetězce V oblasti verze r  
 pozměněné anti-HM 1.24 protilátky

<400> 7  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
 -15 -10 -5  
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 -1 1 5 10  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 15 20 25  
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45  
 Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser  
 50 55 60  
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser  
 65 70 75  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 80 85 90  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 95 100 105  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 110 115 120

<210> 8  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> Uměle připravená sekvence  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> Aminokyselinová sekvence H řetězce V oblasti verze s  
 pozměněné anti-HM 1.24 protilátky

<400> 8  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
 -15 -10 -5  
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 -1 1 5 10  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 15 20 25

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Pro | Tyr | Trp | Met | Gln | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu |
| 30  |     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |
| Glu | Trp | Met | Gly | Ser | Ile | Phe | Pro | Gly | Asp | Gly | Asp | Thr | Arg | Tyr | Ser |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |
| Gln | Lys | Phe | Lys | Gly | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Thr | Ser |
|     | 65  |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |
| Thr | Ala | Tyr | Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val |
|     | 80  |     |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Leu | Arg | Arg | Gly | Gly | Tyr | Tyr | Phe | Asp | Tyr |
|     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |
| Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |
| 100 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Léčebné činidlo pro lymfatické nádory (kromě myelomů) vyznačující se tím, že obsahuje jako aktivní složku protilátku, která se specificky váže na protein, který má aminokyselinovou sekvenci jak je ukázáno v SEQ ID NO: 1 a která má cytotoxickou aktivitu.
2. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.1, vyznačující se tím, že lymfatický nádor je nádor T buněk.
3. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.1, vyznačující se tím, že lymfatický nádor je nádor B buněk (kromě myelomů).
4. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.1, vyznačující se tím, že protilátka je monoklonální protilátka.
5. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.1, vyznačující se tím, že cytotoxická aktivita je ADCC aktivita.
6. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.1, vyznačující se tím, že cytotoxická aktivita je CDC aktivita.
7. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.4, vyznačující se tím, že protilátka má konstantní oblast Cy lidské protilátky.
8. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.7, vyznačující se tím, že konstantní oblast lidské protilátky Cy je Cy1 nebo Cy3.
9. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.4, vyznačující se tím, že protilátka je anti-HM 1.24 protilátka.
10. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.4, vyznačující se tím, že protilátka je chimerní protilátka nebo pozměněná protilátka.

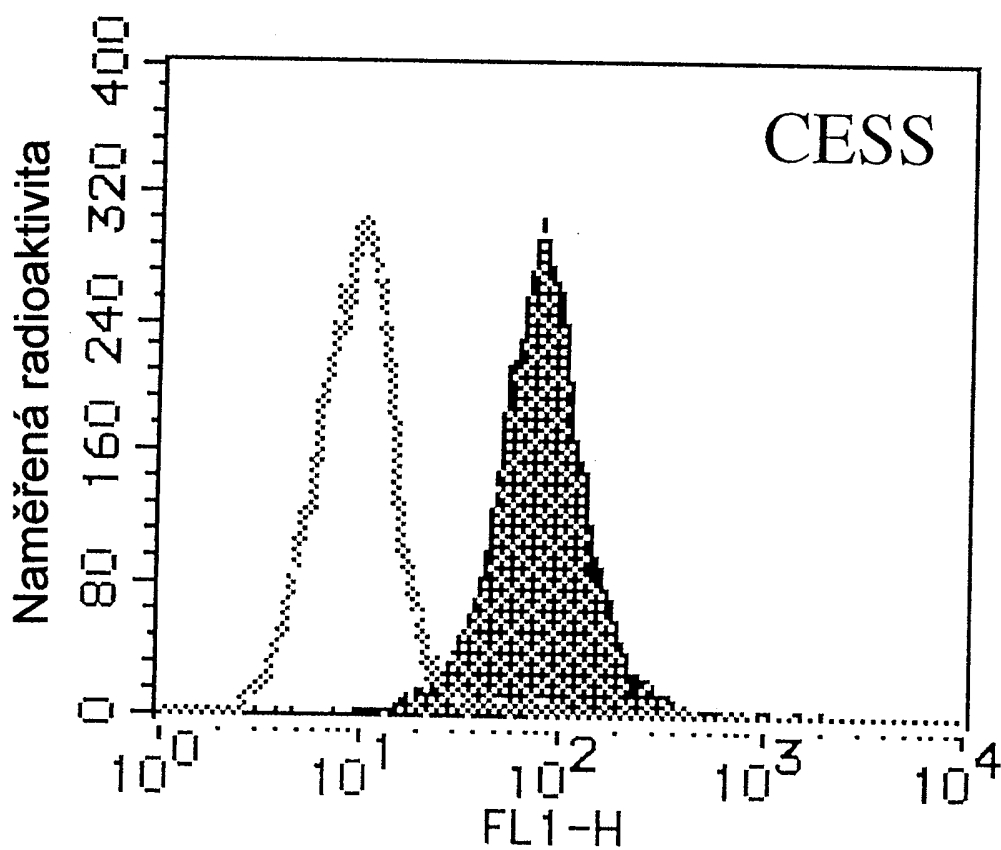
11. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že protilátka je chimerní anti-HM 1.24 protilátka.
12. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že protilátka je pozměněná anti-HM 1.24 protilátka.
13. Léčebné činidlo podle patentového nároku č.9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že protilátka se specificky váže k epitopu, rozpoznávanému anti-HM 1.24 protilátkou.
14. Protilátka, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se specificky váže k proteinu, který má aminokyselinovou sekvenci ukázanou v SEQ ID NO: 1 a která má cytotoxickou aktivitu.
15. Protilátka podle patentového nároku č.13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že cytotoxická aktivita je ADCC aktivita.
16. Protilátka podle patentového nároku č.13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že cytotoxická aktivita je CDC aktivita.

15.10.99

2854-99

Obr. 1

B-1

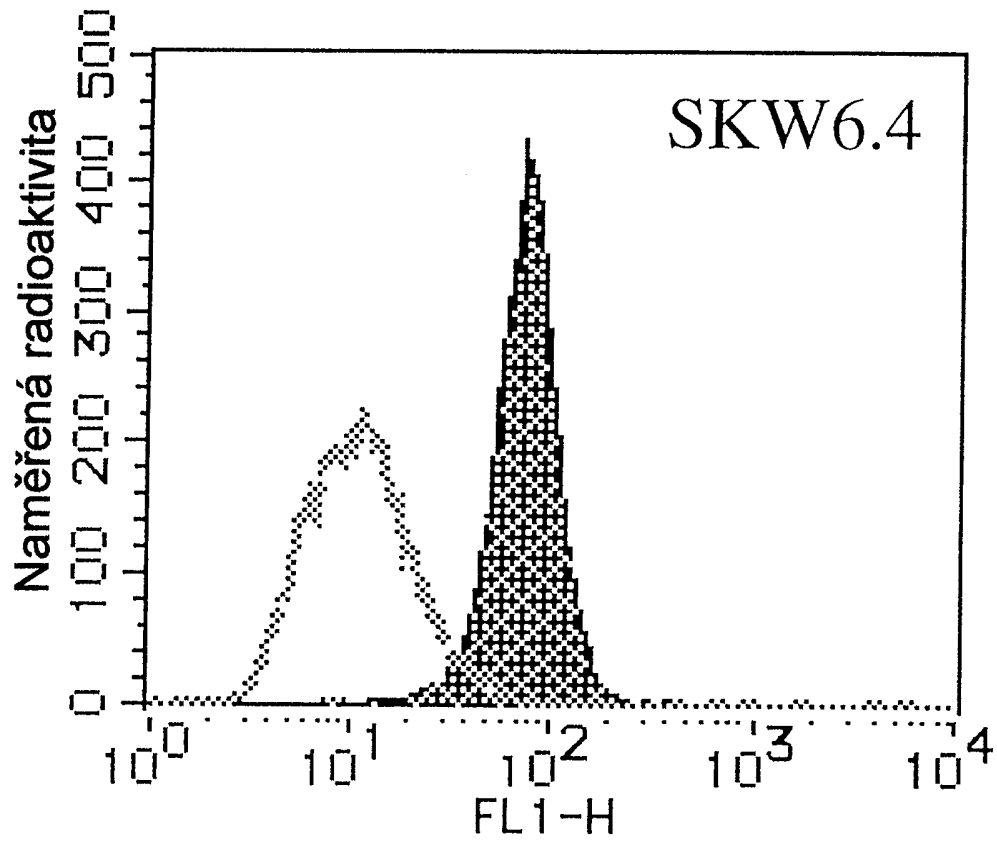


15.10.99

2854-99

Obr. 2

B-2

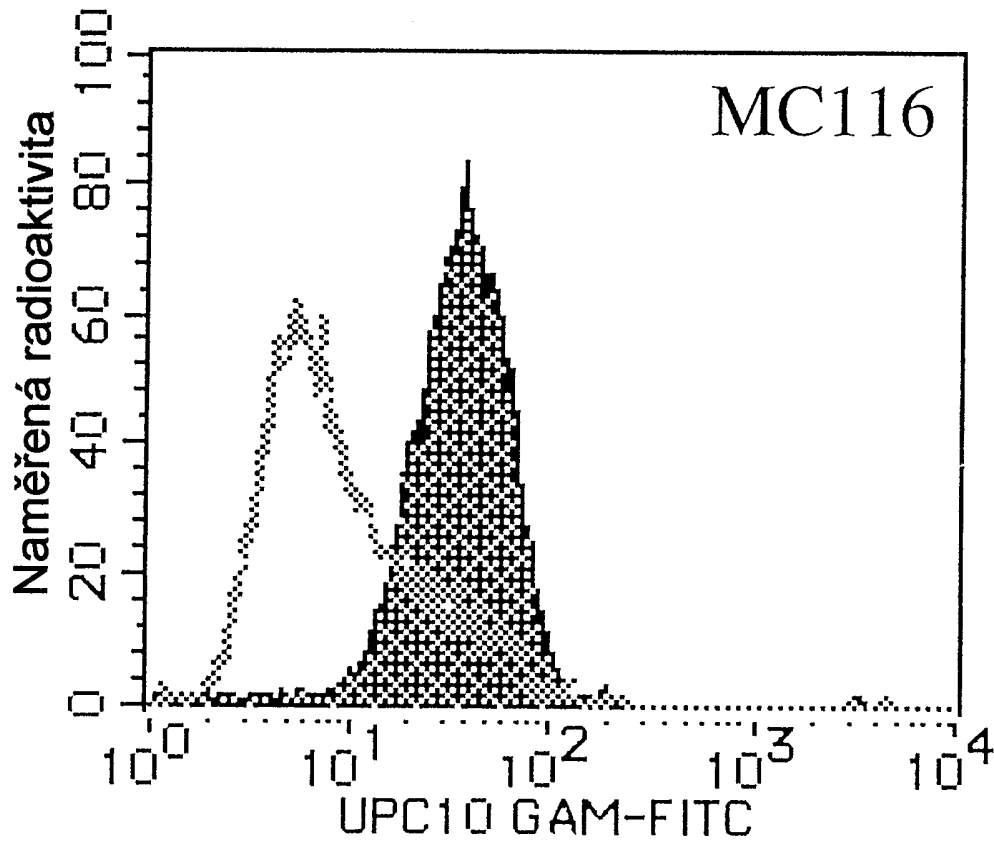


15.10.99

2854-99

Obr. 3

B-3

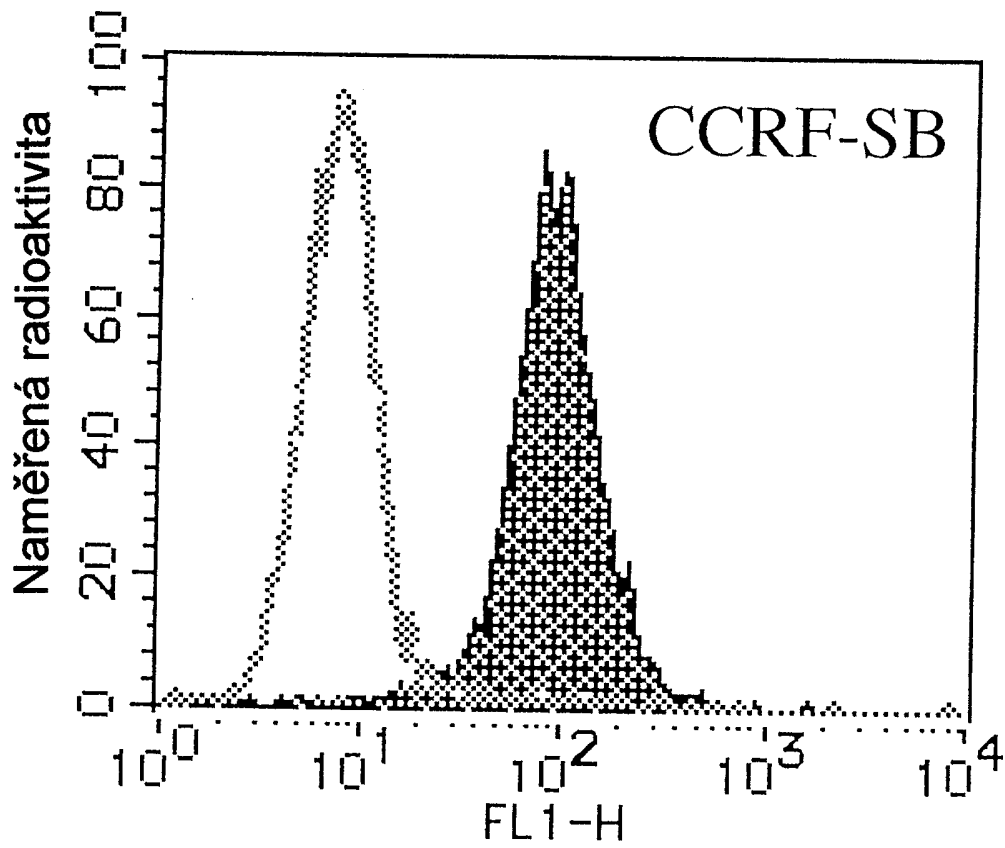


15.10.99

2854-99

Obr. 4

B-4

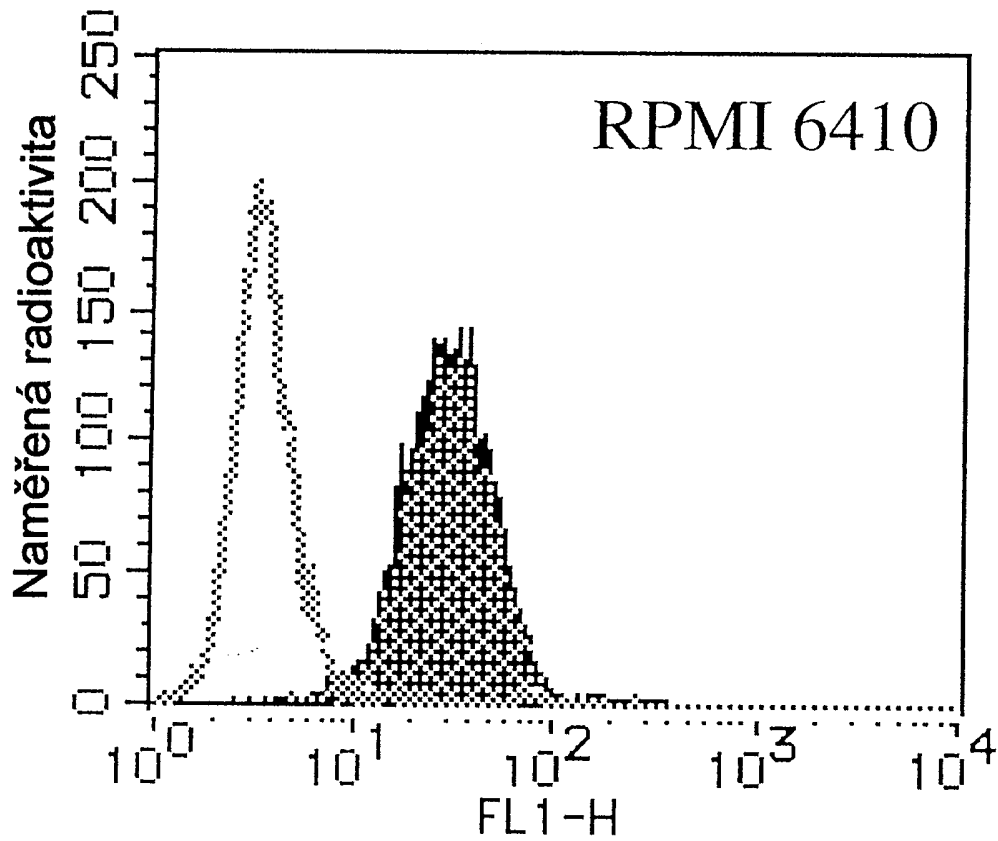


15.10.99

2854-99

Obr. 5

B-5

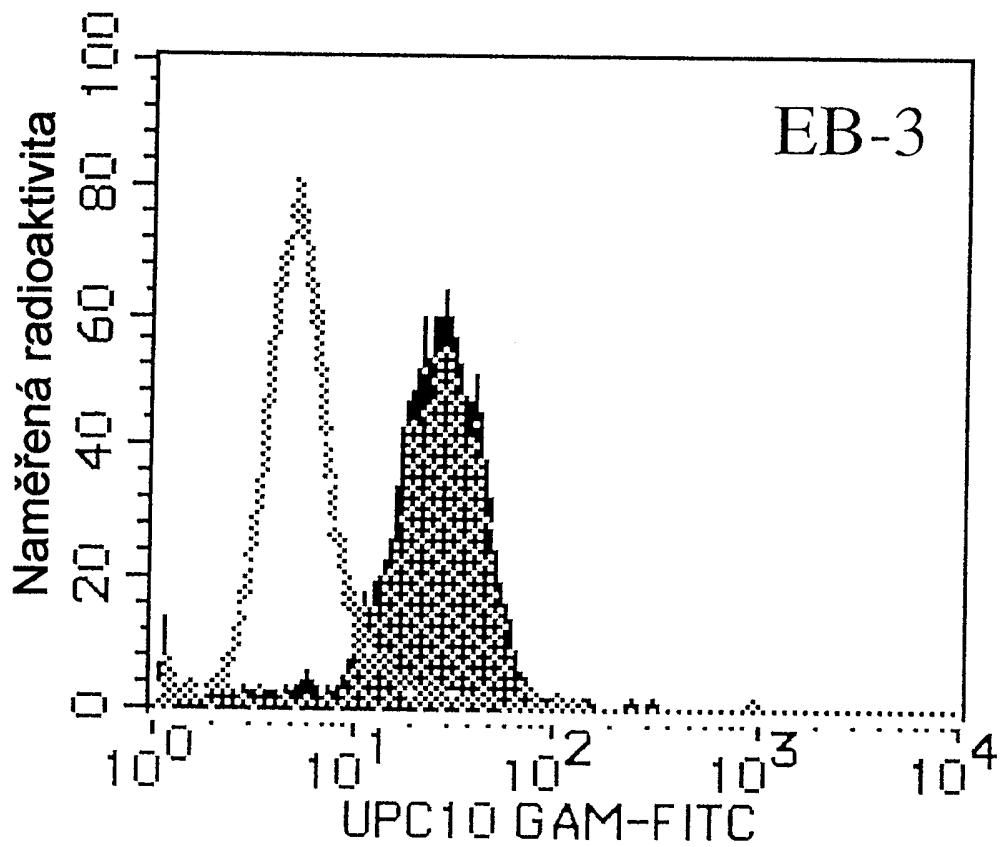


15.10.99

2854-99

Obr. 6

B-6

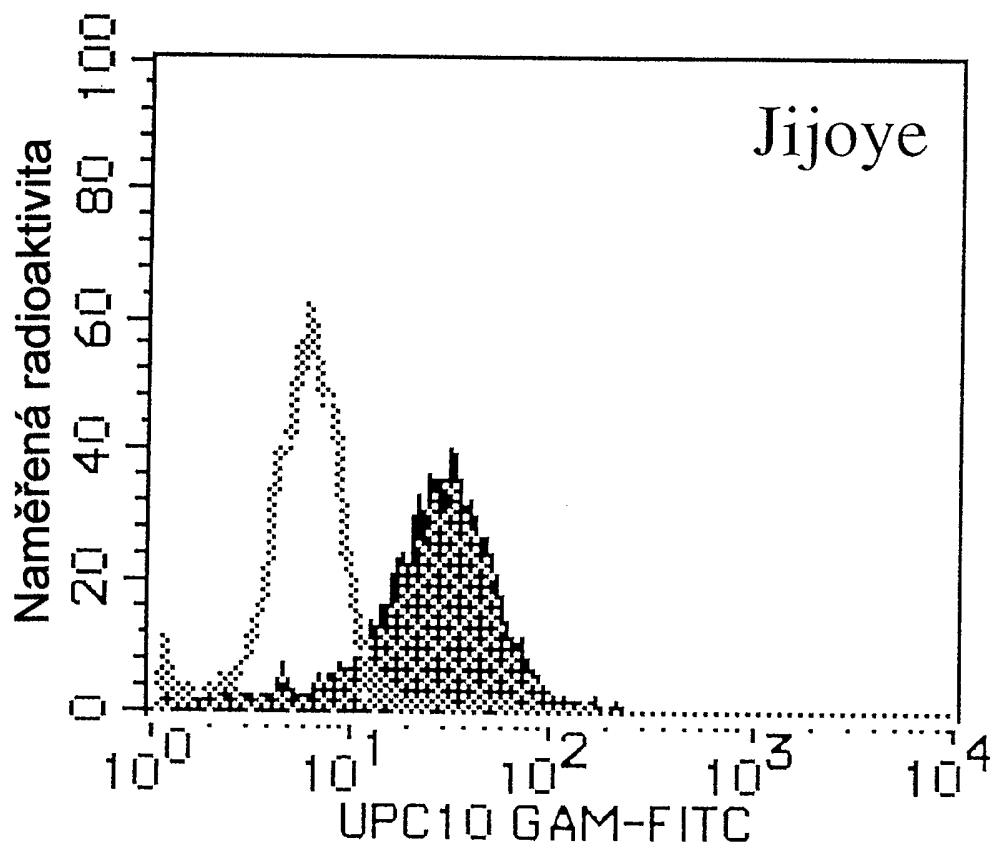


15.10.99

2854-99

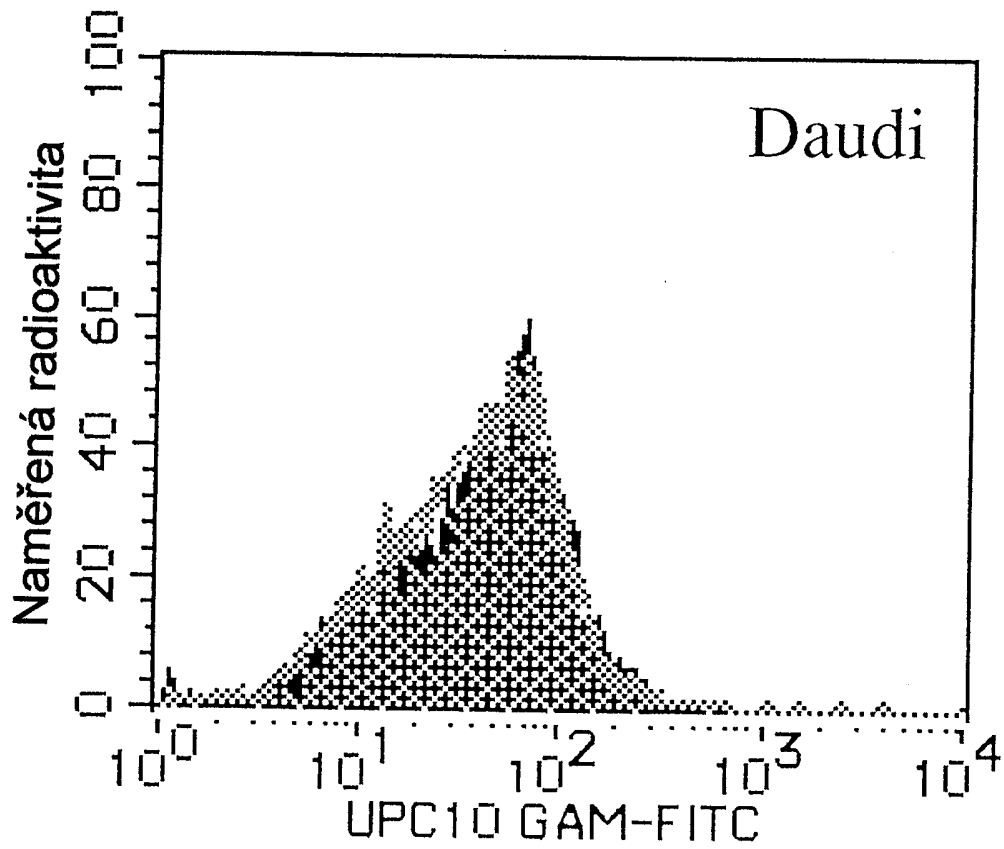
Obr. 7

B-7



Obr. 8

B-8

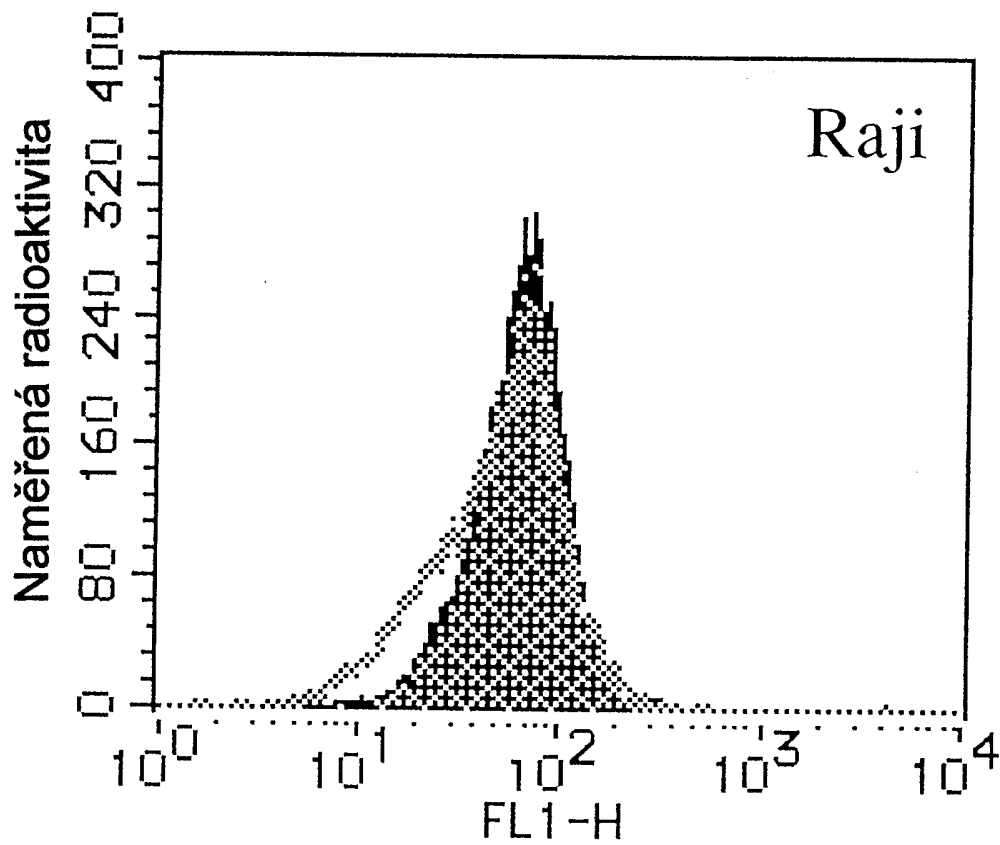


15.10.99

2854-99

Obr. 9

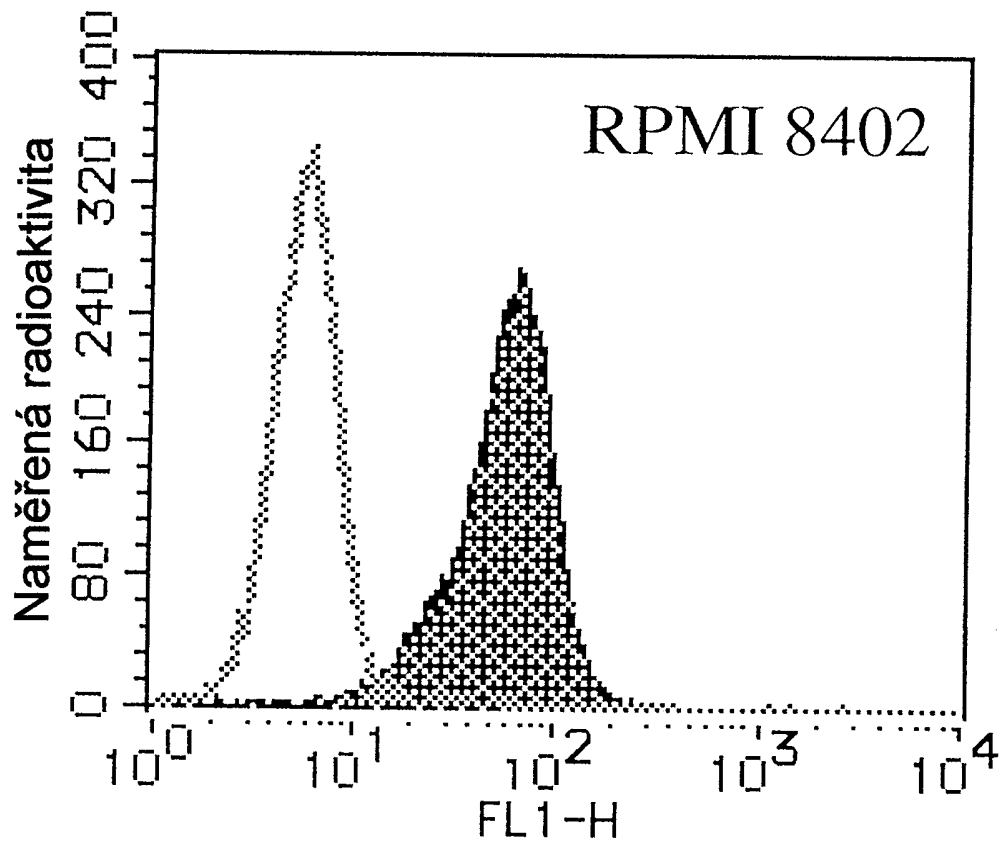
B-9



15. 10. 99  
2854-99  
66-7982

Obr. 10

T-1

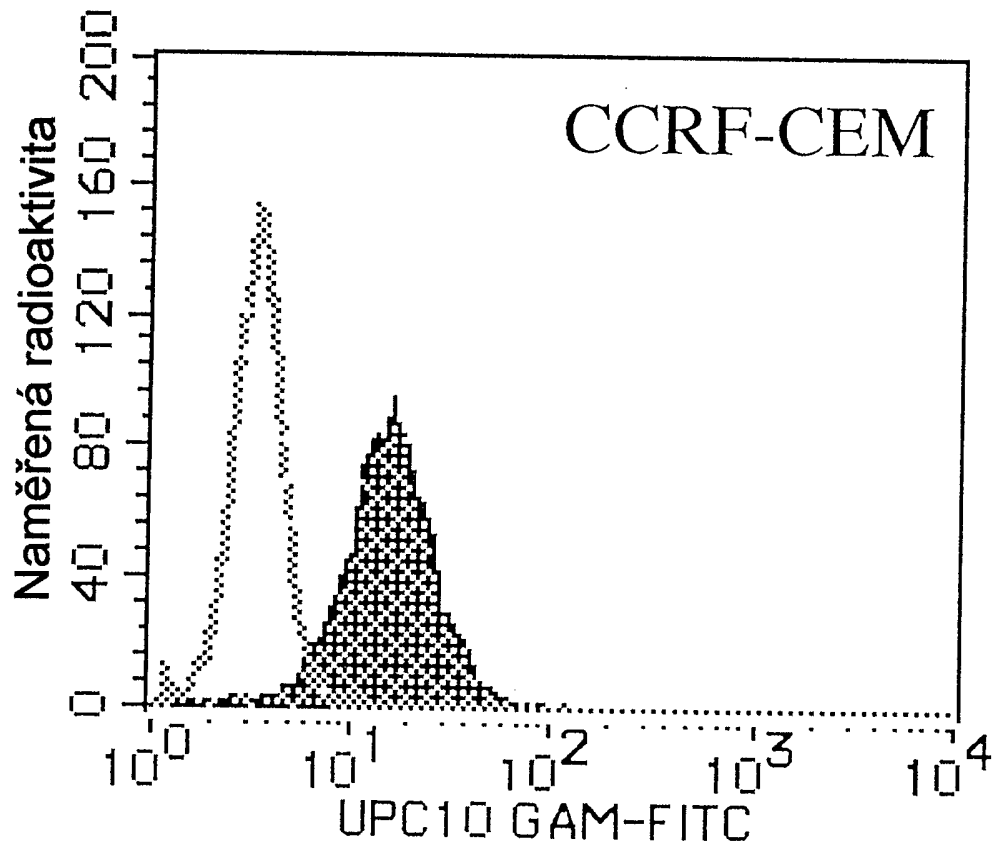


15.10.99

2854-99

Obr. 11

T-2

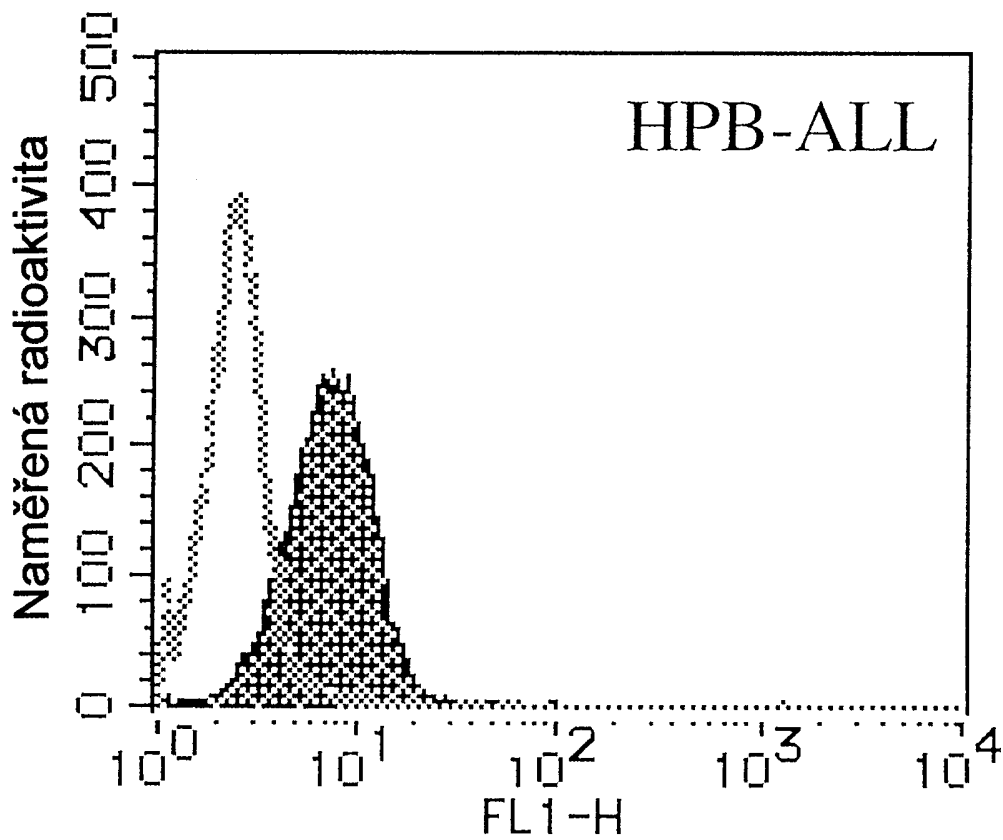


15.10.99

2854-99

Obr. 12

T-3

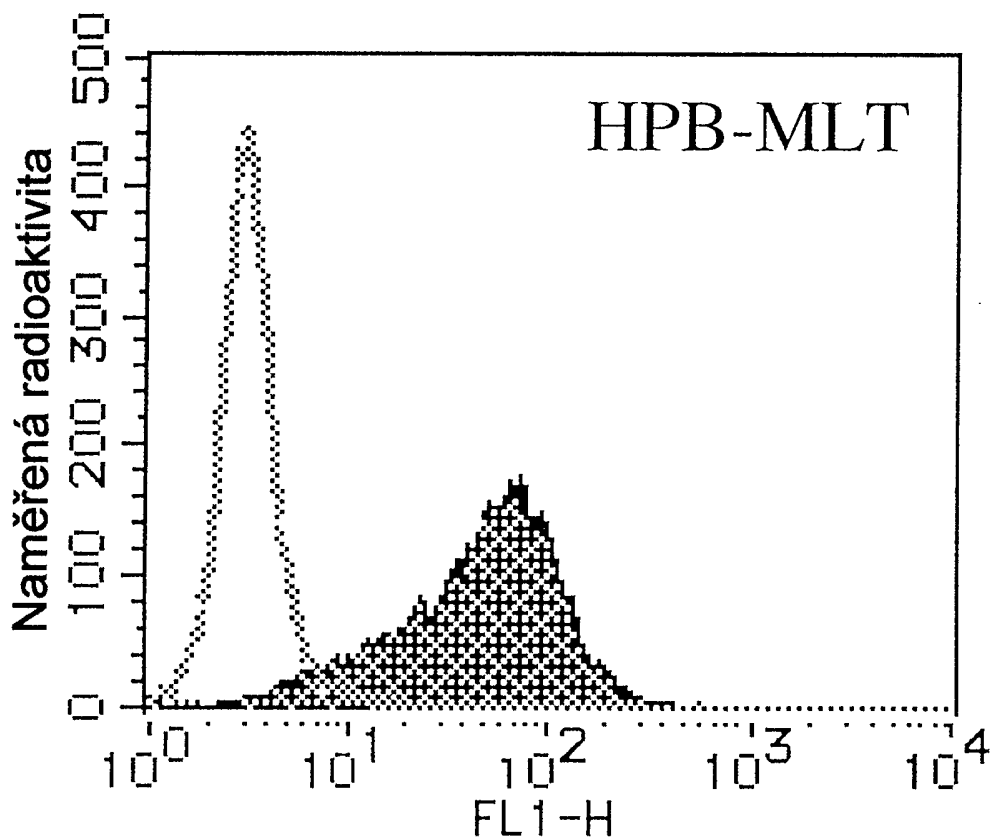


15.10.99

2854-99

Obr. 13

T-4

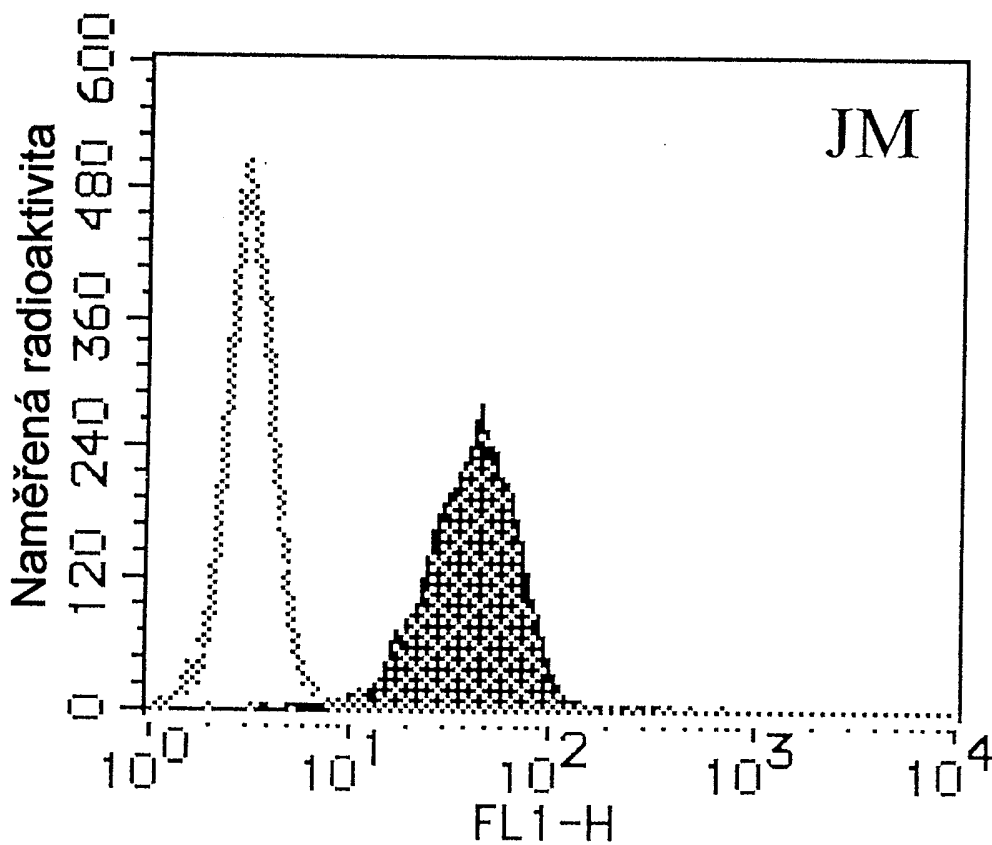


15.10.99

2854-99

Obr. 14

T-5

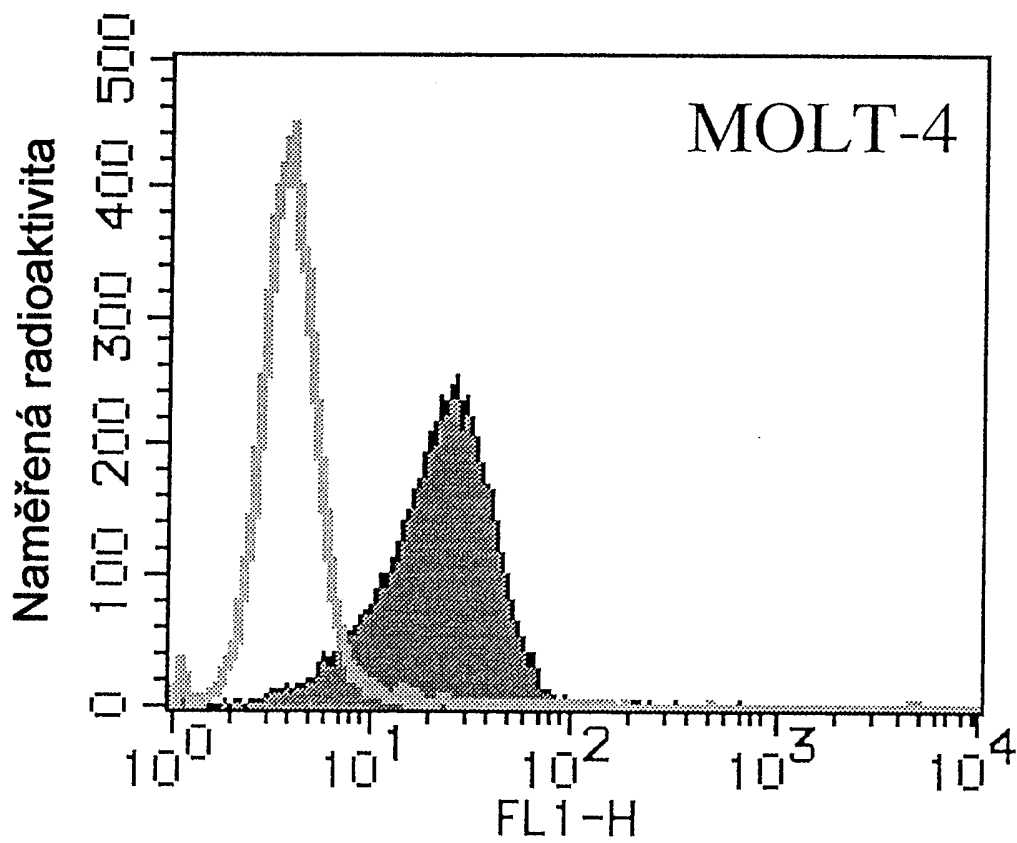


15.10.99

2854-99

Obr. 15

T-6

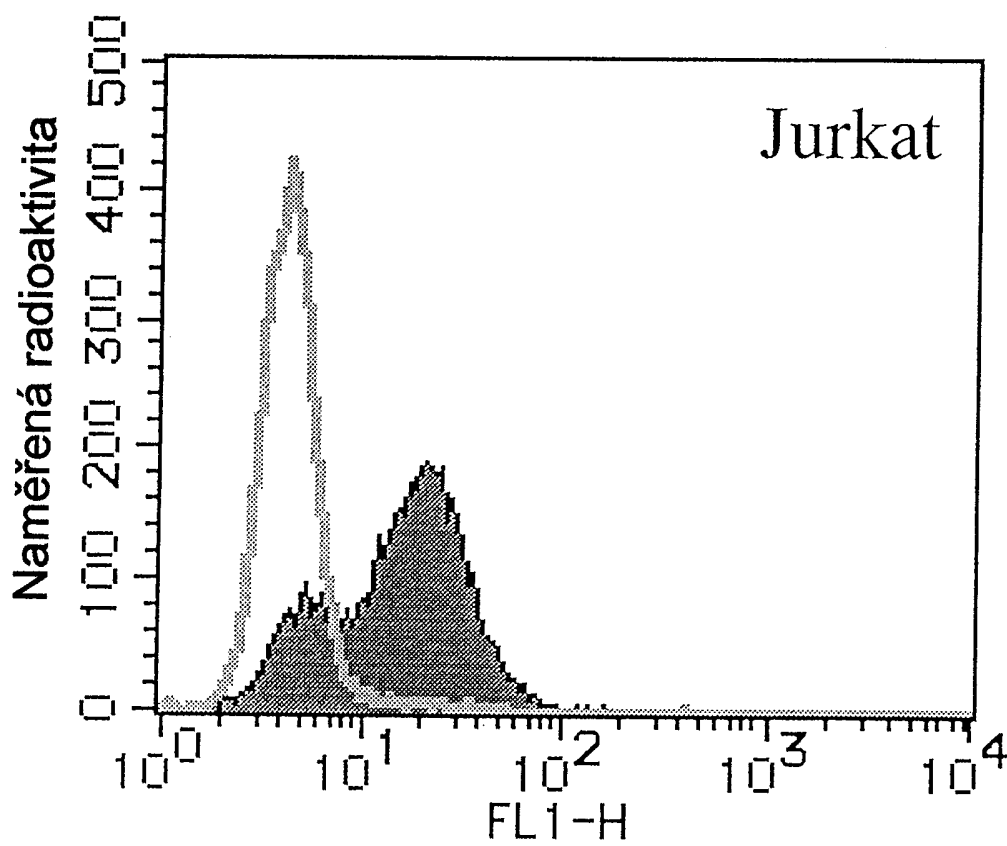


15.10.99

2854-99

Obr. 16

T-7

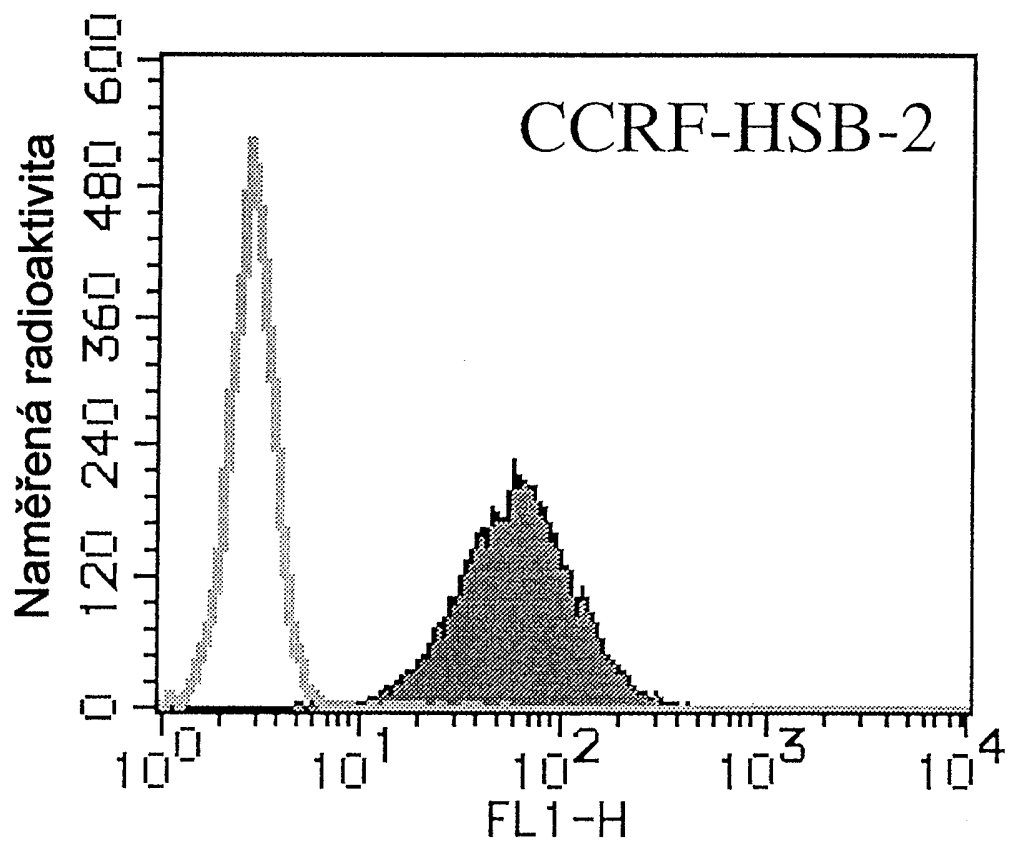


15.10.99

2234-99

Obr. 17

T-8

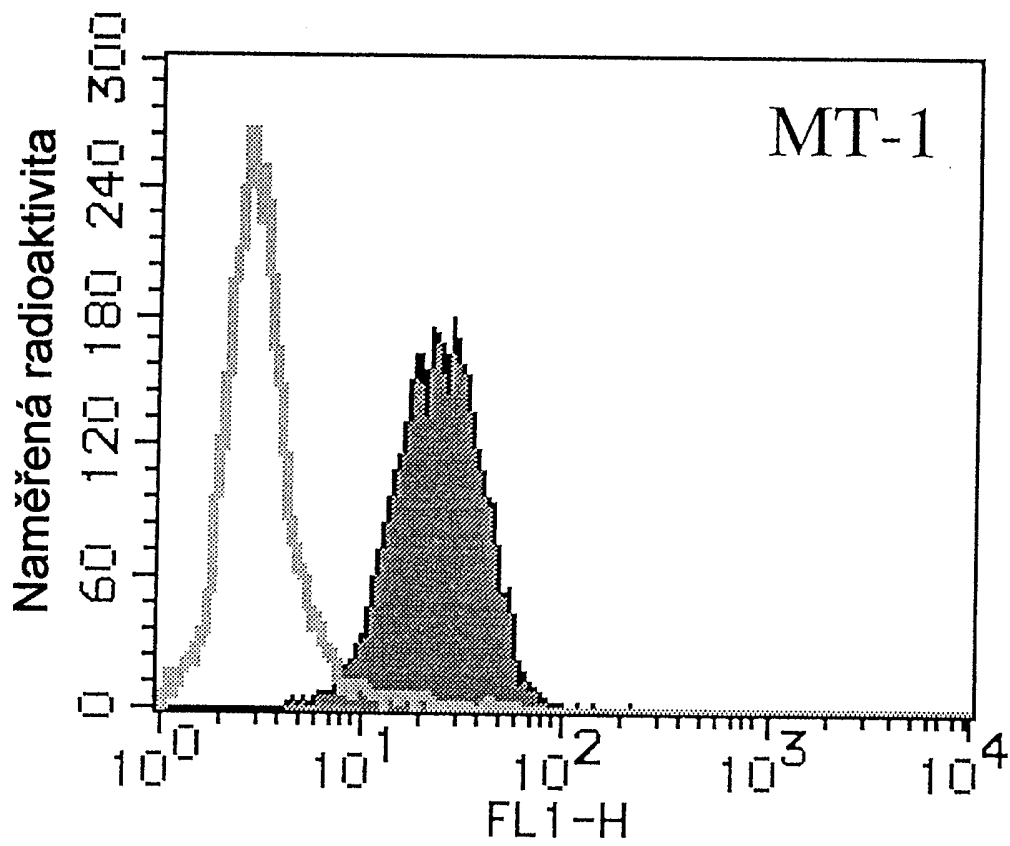


15.10.99

2854-99

Obr. 18

T-9

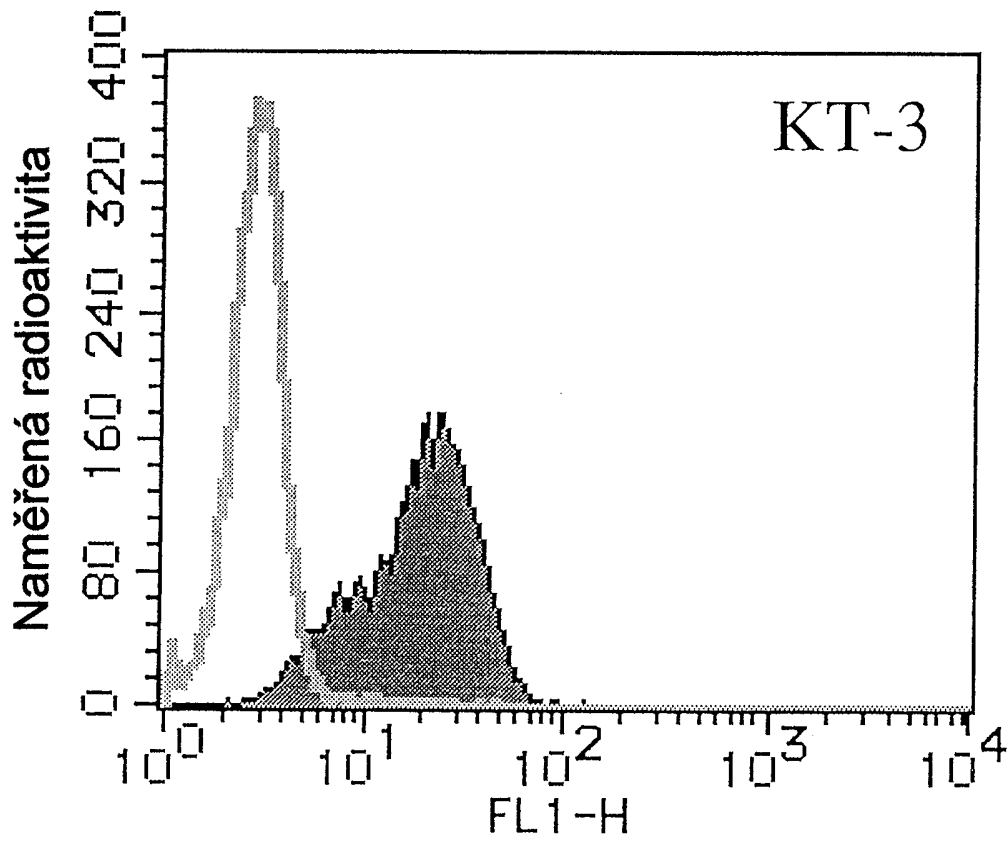


15.10.99

2854-99

Obr. 19

T-10

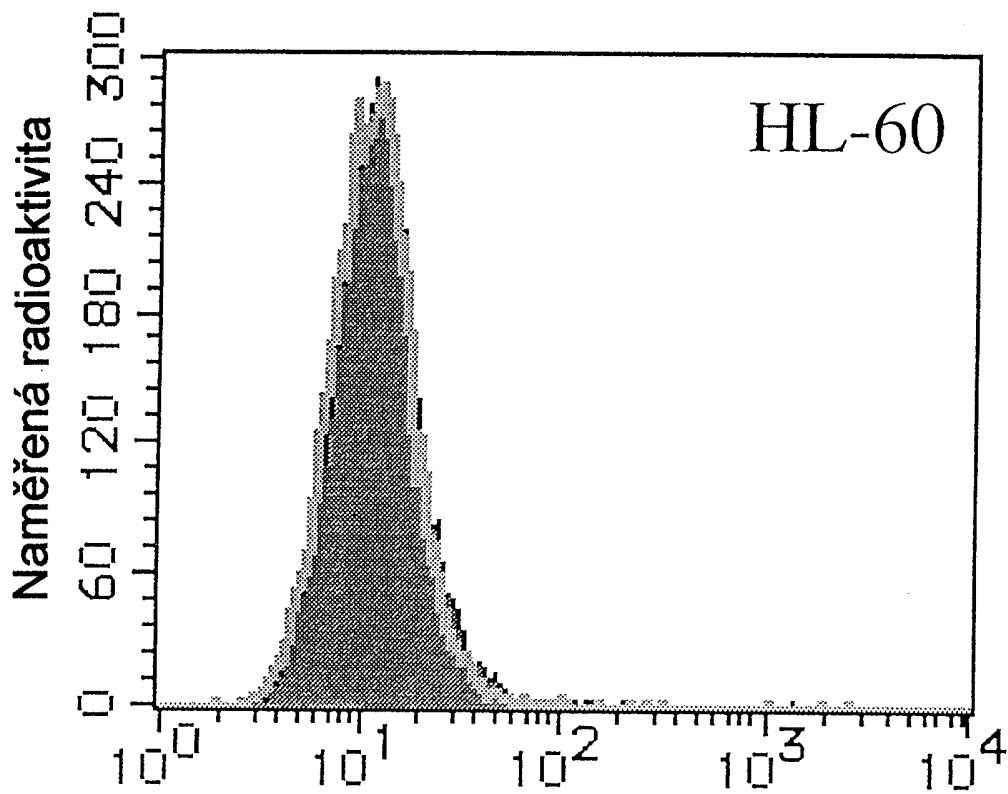


15.10.99

2854-99

Obr. 20

N-1

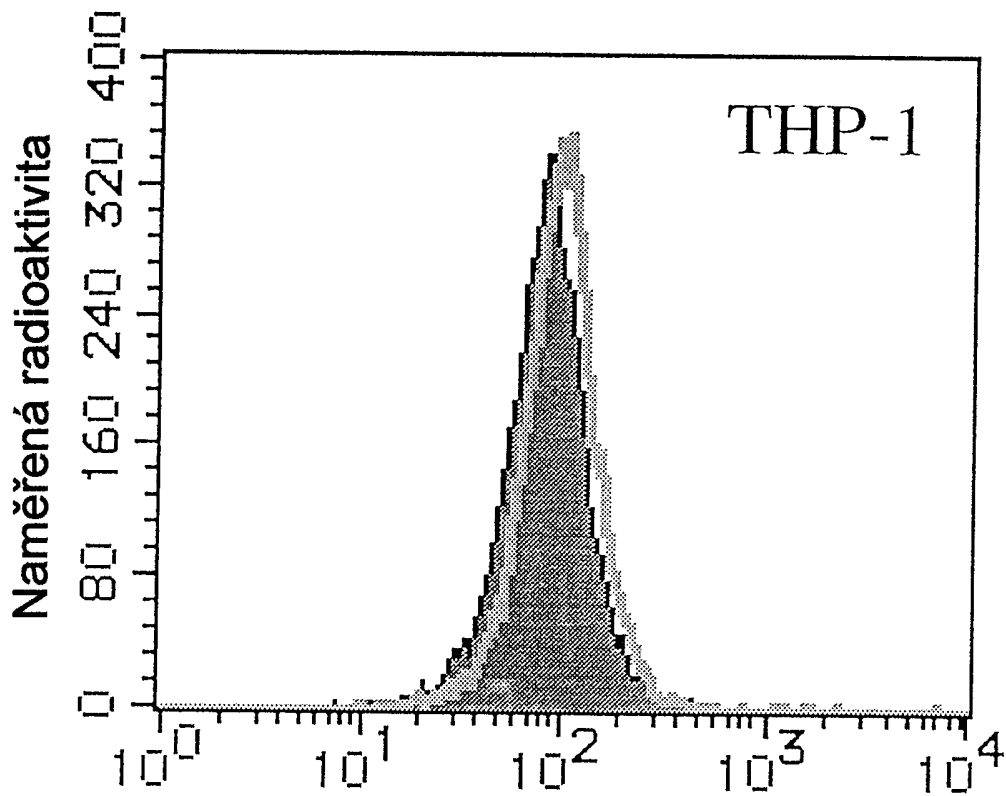


15.10.99

2854-99

Obr. 21

N-2

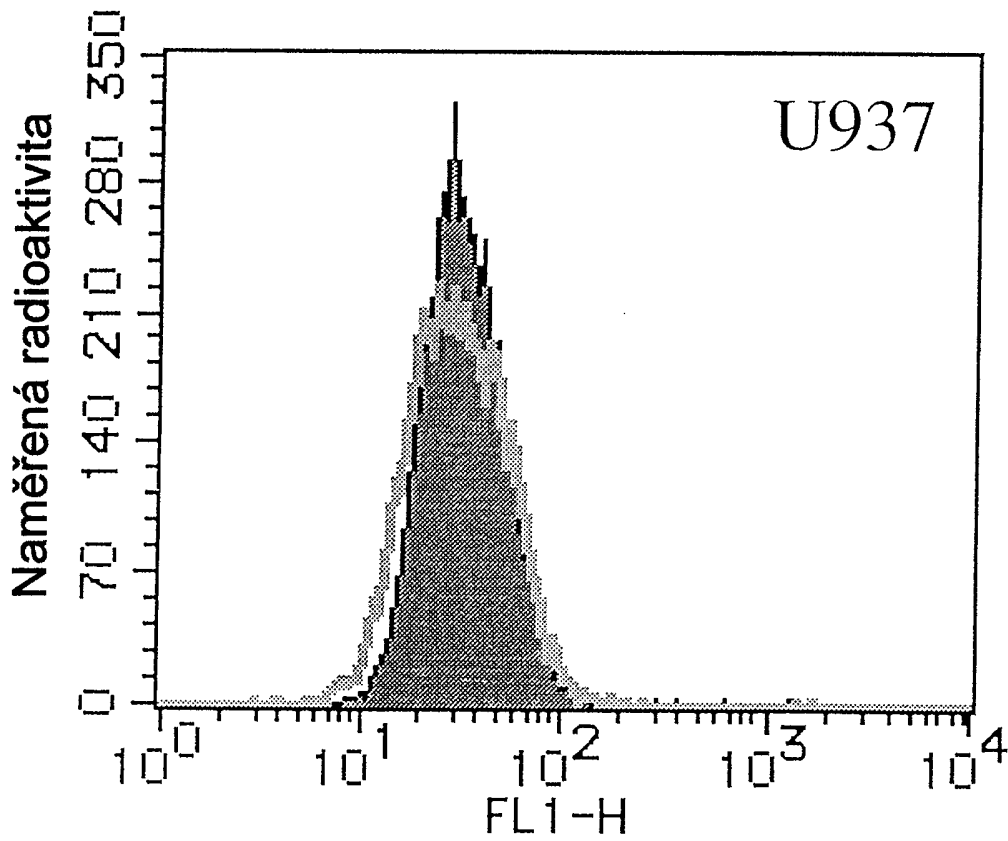


15.10.99

2854-99

Obr. 22

N-3

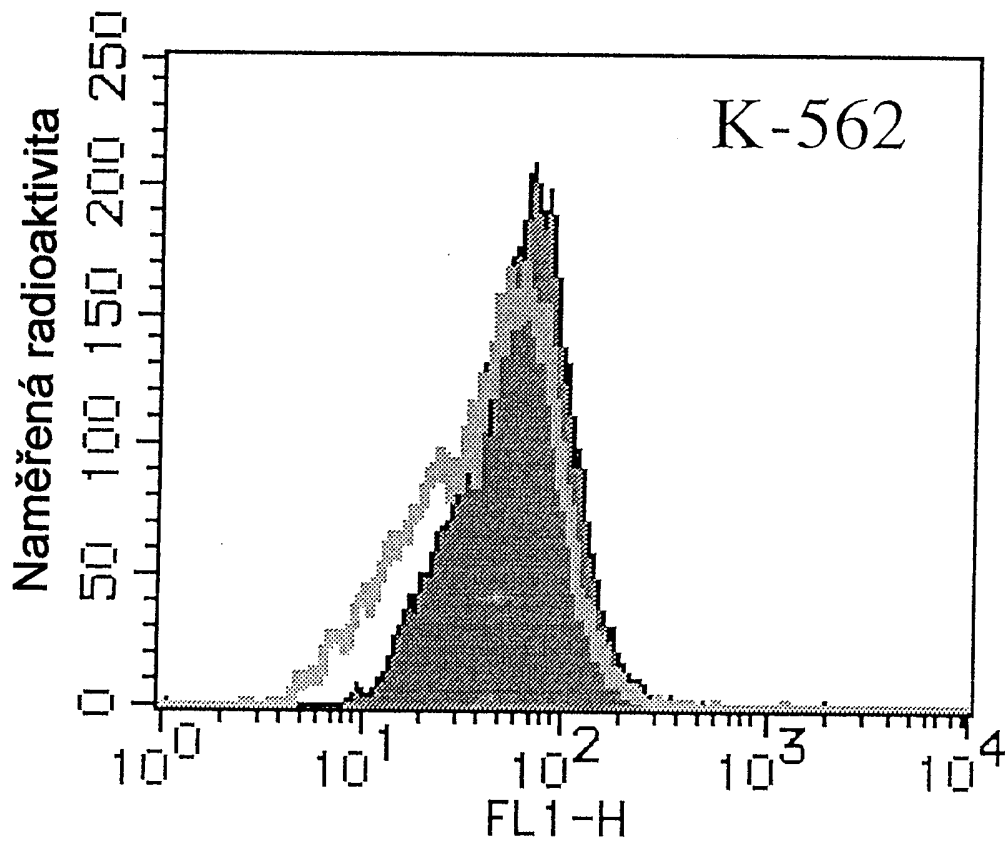


15.10.99

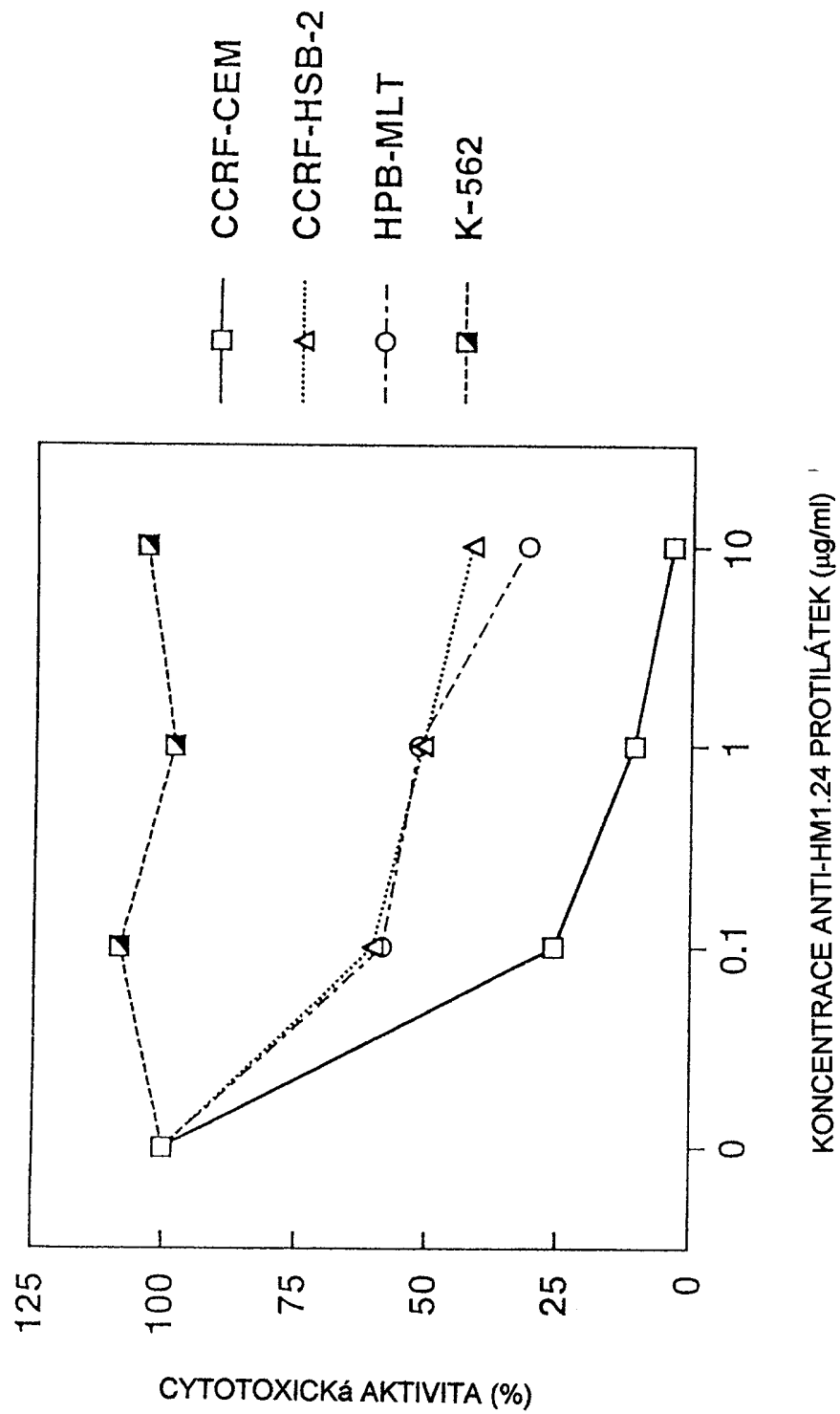
2854-99

Obr. 23

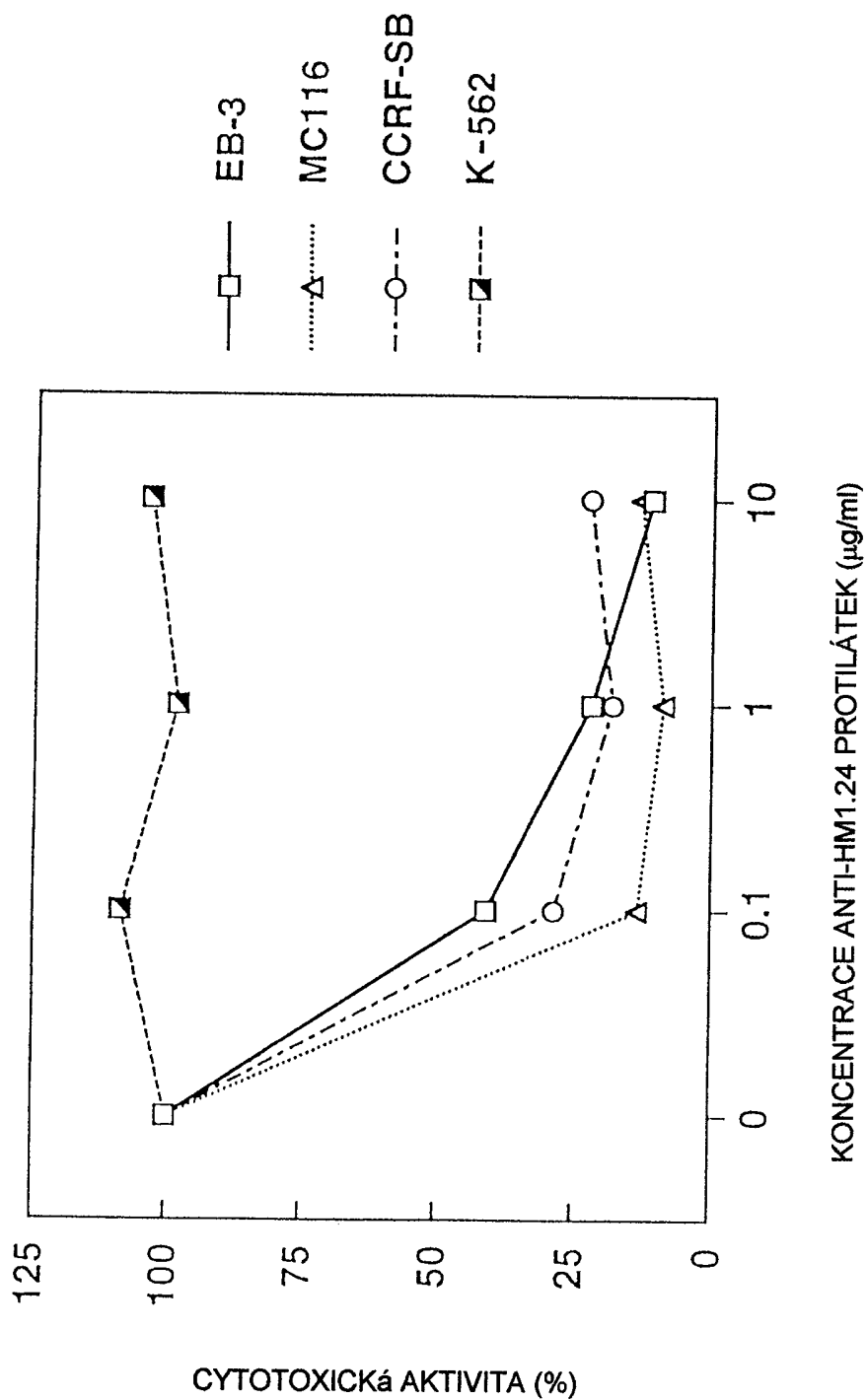
N-4



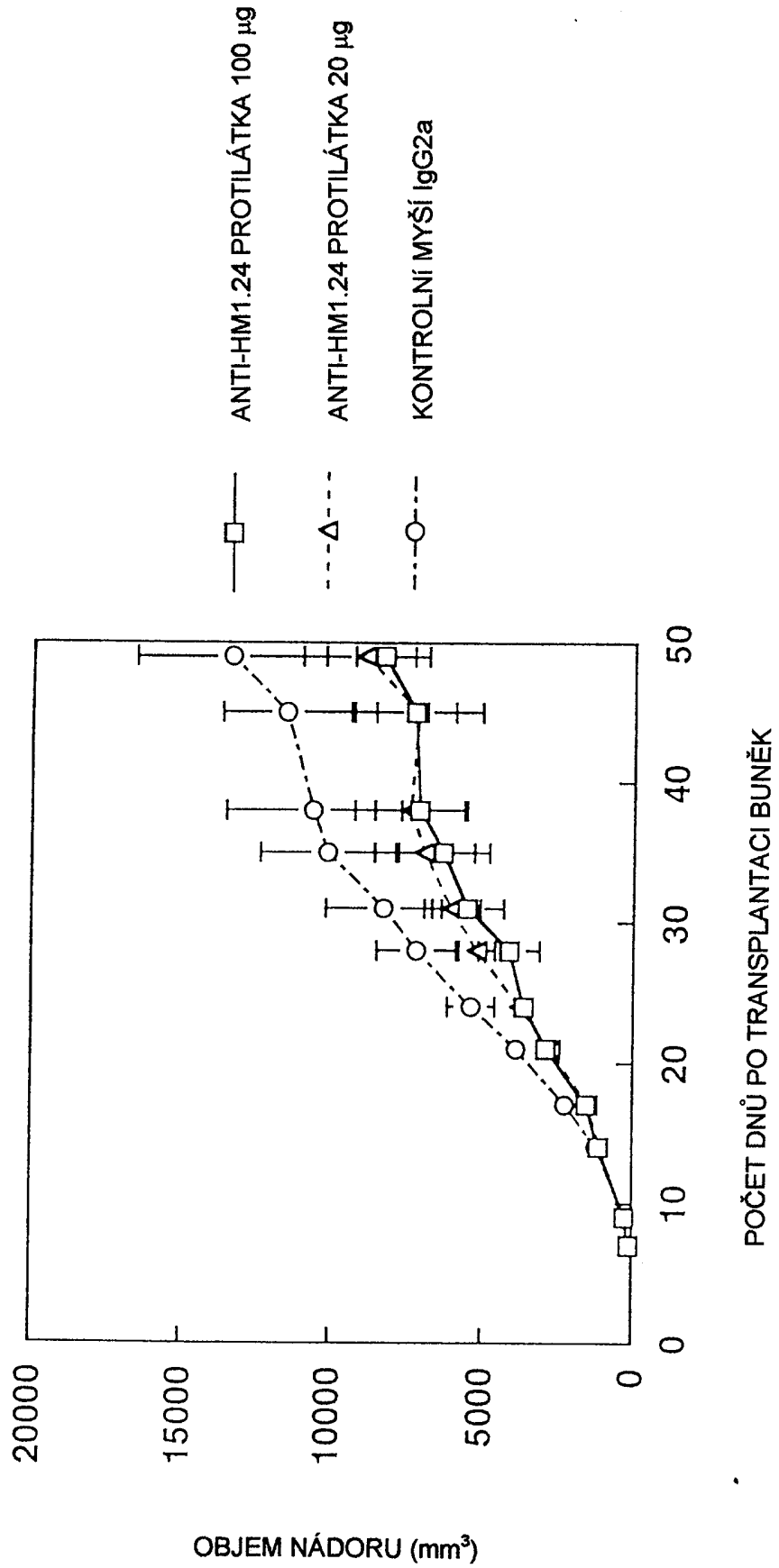
Obr. 24



Obr. 25



Obr. 26



Obr. 27

